

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Mediche Cliniche e Sperimentali  
INDIRIZZO: Epatologia, Chirurgia Epatobiliare e Trapiantologia  
CICLO XXVI

**Coordinamento di *Trial* Clinici multicentrici finalizzati allo studio e all'ottimizzazione dell'*outcome* del trapianto epatico**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Gaetano Thiene \_\_\_\_\_

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Angelo Gatta \_\_\_\_\_

**Supervisore :** Ch.mo Prof. Umberto Cillo \_\_\_\_\_

**Dottorando :** Laura Saracino \_\_\_\_\_



# Sommario Generale

Parte I. Sopravvivenza a lungo termine dopo il trapianto di fegato.....	17
Introduzione.....	21
A. Metodi.....	27
1. Studio policentrico nazionale.....	27
2. Studio monocentrico approfondito.....	28
B. Risultati.....	29
1. Studio osservazionale retrospettivo multicentrico nazionale.....	29
2. Studio monocentrico approfondito.....	35
C. Discussione.....	56
D. Conclusioni.....	66
E. Bibliografia.....	67
Parte II. Introduzione precoce degli inibitori del mTOR e riduzione degli inibitori della calcineurina nel trapianto di fegato de novo.....	69
Introduzione.....	73
1. Inibitori della calcineurina.....	74
2. Gli inibitori del mTOR.....	76
3. Rapalogs.....	78
B. Metodi.....	83
1. Obiettivi e disegno dello studio.....	83
2. End-point.....	84
3. Criteri di inclusione ed esclusione.....	85
4. Terapia immunosoppressiva.....	89
5. Farmaci proibiti.....	93
6. Analisi Statistica.....	93
C. Risultati.....	97
1. Baseline.....	97
2. End-point primario.....	99
3. Immunosoppressione.....	99
4. Comorbidità.....	102
D. Discussione.....	107
E. Conclusioni.....	117
F. Bibliografia.....	118

## Indice delle Figure

Figura 1: Evoluzione del numero dei trapianti in Europa 1968–2008.....	24
Figura 2: Causa del decesso.....	31
Figura 3: Sopravvivenza a 20 anni, effetto del HCV.....	32
Figura 4: Sopravvivenza a 20 anni dei pazienti trapiantati di fegato.....	33
Figura 5: Sopravvivenza dei pazienti adulti (in rosso) e pediatrici (in verde ) a 10 anni dal trapianto di fegato.....	34
Figura 6: Perdita di anni vita pazienti trapiantati vs. popolazione italiana di riferimento.....	34
Figura 7: Sopravvivenza globale dei riceventi.....	39
Figura 8: Confronto sopravvivenza/speranza di vita paziente/popolazione < 30 anni.....	41
Figura 9: Confronto sopravvivenza/speranza di vita paziente/popolazione 30–50 anni.....	42
Figura 10: Confronto sopravvivenza/speranza di vita paziente/popolazione > 50 anni.....	42
Figura 11: Sopravvivenza nel ritrapianto.....	43
Figura 12: Sopravvivenza e bilirubina ad 1 anno.....	44
Figura 13: Sopravvivenza e creatinina ad 1 anno.....	44
Figura 14: Effetto dell'età del donatore sulla sopravvivenza.....	48
Figura 15: Causa dei decessi nel post-trapianto, confronto entro e dopo 6 mesi.....	49
Figura 16: Struttura chimica di (A) Everolimus, (B) Sirolimus.....	79
Figura 17: Livelli plasmatici degli immunosoppressori (A) Everolimus e (B) Tacrolimus....	100
Figura 18: Rigetti confermati da biopsia (BPAR) entro 3 mesi, confronto gruppo di studio vs. controllo.....	101
Figura 19: Rigetti nel gruppo di studio, confronto normo- vs. pauci-immunosoppresso.....	102
Figura 20: Rigetti entro 3 mesi, confronto gruppo di studio normo-immunosoppresso vs. controllo.....	102
Figura 21: Clearance della creatinina, confronto gruppo di studio vs. controllo.....	103
Figura 22: Clearance a 3 mesi, confronto tra normo- e pauci-immunosoppressi.....	104
Figura 23: Livelli plasmatici di colesterolo, confronto gruppo di studio vs. controllo.....	106

## Indice delle Tabelle

Tabella 1: Proporzioni dei pazienti HCC al trapianto.....	30
Tabella 2: Confronto dell'indicazione al trapianto per periodo storico.....	30
Tabella 3: Caratteristiche dei pazienti HCC al trapianto.....	31
Tabella 4: Parametri di laboratorio pre-trapianto (baseline).....	36
Tabella 5: Caratteristiche ricevente e donatore pre-trapianto (baseline).....	38
Tabella 6: Confronto con la sopravvivenza della popolazione generale per fasce d'età.....	41
Tabella 7: Sopravvivenza per eziologia di epatopatia.....	45
Tabella 8: Sopravvivenza in rapporto alle complicanze della cirrosi.....	47
Tabella 9: Causa della morte dei pazienti dopo il trapianto di fegato entro e dopo 6 mesi....	49
Tabella 10: Analisi univariata della sopravvivenza del paziente, escludendo mortalità entro 6 mesi.....	51
Tabella 11: Frequenza pre- e post-trapianto di comorbidità.....	54
Tabella 12: Insorgenza di neoplasie de novo.....	54
Tabella 13: Riepilogo delle differenze farmacocinetiche tra Everolimus e Sirolimus.....	80
Tabella 14: Riassunto delle cause di uscita del paziente dallo studio, (A) gruppo di studio, (B) gruppo di controllo.....	97
Tabella 15: Confronto dei valori alla baseline per i pazienti delle due braccia dello studio....	98
Tabella 16: Eventi avversi entro 3 mesi, confronto gruppo di studio vs. controllo.....	105

## ***Tabella delle abbreviazioni e dei simboli***

<b>Abbreviazioni</b>		
ABO		Gruppo sanguigno ABO
ALT		Alanina Aminotransferasi
ASA		Acido Acetilsalicilico
AST		Aspartato Transaminasi
BPAR	Biopsy-Proven Acute Rejection	Rigetto Confermato da Biopsia
CMV		Citomegalovirus
CNI	Calcineurin Inhibitors	Inibitori della Calcineurina
CNT		Centro Nazionale Trapianti
CTP	Child-Turcotte-Pugh score	Punteggio Child-Turcotte-Pugh
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Acido Deossiribonucleico
DS		Deviazione Standard
EDC	Electronic Data Capture	Sistema Elettronico per la Cattura dei Dati
ELTR	European Liver Transplant Registry	Registro Europeo del Trapianto di Fegato
EVL		Everolimus
FHF	Fulminant Hepatic Failure	Epatite Fulminante
FKBP12	FK Binding Protein -12	
FSH	Follicle-Stimulating Hormone	Ormone Follicolostimolante
GFR	Glomerular Filtration Rate	Velocità di Filtrazione Glomerulare
HBV	Hepatitis B Virus	Virus dell'Epatite B
HCC	Hepatocellular Carcinoma	Carcinoma Epatocellulare
hCG	Human Chorionic Gonadotropin	Gonadotropina Corionica Umana
HCV	Hepatitis C Virus	Virus dell'Epatite C
IDR	Interdecile Range	Intervallo interdecile
ILR2	Interleukin 1 Receptor Type II	Recettore dell'interleuchina di Tipo II
IMA		Infarto Miocardico Acuto
LDLT	Living Donor Liver Transplant	Trapianto di Fegato da Donatore Vivente
MDRD	Modification of Diet In Renal Disease	Indicatore di clearance della creatinina
MELD	Model for End-Stage Liver Disease	Punteggio di valutazione delle epatopatie croniche
MPA	Mycophenolic Acid	Acido Micofenolico
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin,	Bersaglio della Rapamicina nei Mammiferi
OLT	Orthotopic Liver Transplantation	Trapianto Ortotopico di Fegato
PBC	Primary Sclerosing Cholangitis	Cirrosi Biliare Primitiva
PNF	Primary Non Function	
POD	Post Operation Day	Giorno post-operatorio
PSC	Primary Biliary Cirrhosis	Cirrosi Sclerosante Primitiva
TGF	Transforming Growth Factor	Fattore di Crescita Trasformante
TIT		Tempo di Ischemia Totale
VEFG	Vascular Endothelial Growth Factor	Fattore di Crescita dell'Endotelio Vascolare
γGT		Gamma Glutamyl Transferasi



## ***Ringraziamenti***

Ringrazio il Prof. Umberto Cillo per l'opportunità e il supporto forniti per lo sviluppo di questa ricerca.

Ringrazio tutto il personale dell'Unità Operativa di Chirurgia Epatobiliare e Trapianto Epatico, membri passati e presenti, per il sostegno e il lavoro svolto nel condurre le attività di sperimentazione. Ringrazio in modo particolare la Dr.ssa Patrizia Boccagni, il Dr. Alessandro Vitale, la Dr.ssa Alessandra Bertacco per il loro indispensabile aiuto.

Ringrazio inoltre il Prof. Angeli e la SSD Emergenze Mediche del Trapianto di Fegato e la Dr.ssa P. Burra e la S.S.D. Trapianto Multiviscerale.

Per loro natura, questi studi hanno richiesto l'intervento di un gran numero di attori che sarebbe troppo lungo elencare individualmente e molto facile tralasciare ingiustamente qualcuno. Ringrazio quindi tutti coloro che hanno portato il loro contributo nell'arco di questi ultimi anni.

Un grosso ringraziamento a tutti i Centri Trapianto italiani che hanno portato il loro importantissimo ed indispensabile contributo nel portare questo lavoro a buon porto:

Policlinico Gemelli Roma, Ospedale S. Maria della Misericordia Udine, Ospedale Molinette Torino, Ospedali Riuniti Bergamo, Ospedale Maggiore Policlinico Milano, Ospedale Niguarda Milano, Policlinico Umberto I Roma, Istituto Tumori Milano, Policlinico Tor Vergata Roma, Ospedale S. Martino Genova, Ospedale Cardarelli Napoli.



## **Preambolo**

La scienza medica illustra come il progresso della conoscenza si trova nell'incontro di molte discipline e molte culture. La medicina moderna ha le sue fondamenta nella sperimentazione empirica e la ricerca di nuovi metodi e concetti.

Sono molte le aree della medicina dove viene illustrato questo processo in atto, e il trapianto di fegato non fa eccezione.

Fin dalla sua concezione, il trapianto di fegato è stato progettato e studiato tanto al bancone, come nelle corsie. Dalla chirurgia sperimentale alla ricerca fondamentale sui meccanismi della risposta immunitaria, il trapianto di fegato ha tratto da ogni possibile area della ricerca medica, biologica e farmacologica per raggiungere i suoi obiettivi.

Col passare del tempo cresce anche la nostra comprensione, vengono sciolti molti dei nodi del passato. Ma con l'aumento del nostro bagaglio tecnico-scientifico, aumenta anche la sua complessità. I progressi delle scienze richiedono nuovi strumenti per carpire e sfruttare pienamente le potenzialità di questo serbatoio.

Per affrontare problemi di crescente complessità che ci si presentano, diventa sempre più ovvia la necessità di fondare il nostro processo decisionale su chiare e solide evidenze.

Radicare sistematicamente la pratica medica su livelli di evidenza robusti e sulla ricerca medica di alta qualità è lo standard che oggi conosciamo come medicina basata sulle prove di efficacia (più noto per il suo nome inglese, *Evidence-based medicine*.) Questo approccio recente alla pratica clinica sfrutta elementi chiave del metodo scientifico.

Esso richiede non solo dati verificabili, ma sperimentalmente riproducibili e con i più alti livelli di evidenza disponibili.

Il nuovo approccio razionale alla cura dei pazienti è simile alla fase rivoluzionaria presa dai medici islamici all'inizio del IX secolo e.v. Allora l'approccio innovatore consisteva nella registrazione, interpretazione e classificazione delle osservazioni cliniche e sperimentali. Questo approccio originale stabiliva la metodologia della medicina clinica e della diagnosi differenziale, una pietra miliare nella storia della medicina.

La medicina basata sulle prove di efficacia porta il processo di accertamento scientifico ad un livello superiore, consentendo ad un robusto sistema di auto-correzione, ed a meccanismi trasparenti per servire come una pietra angolare ad una scienza medica complessa in un mondo saturo d'informazioni.

Tuttavia, per consentire a questo nuovo paradigma di svilupparsi, la ricerca di alta qualità deve diventare diffusa quanto l'Anamnesi, la Semiotica e la diagnostica differenziale che sono diventate una seconda natura per la medicina moderna.

Finora, una limitazione importante per la diffusione della medicina basata sull'evidenza sono i costi importanti legati alla produzione di prove mediche di alta qualità.

Ad esempio, gli studi controllati e randomizzati—uno dei metodi con cui ottenere dei risultati di altissimo livello—erano l'appannaggio di pochissime istituzioni o di industrie ben finanziate. Questa soglia di accessibilità è oggetto di critiche poiché introduce un potenziale bias nel tipo di ricerca in grado di raggiungere questo standard.

Con l'abbassamento della barriera tecnologica potremmo assistere nei prossimi anni ad una maggiore diffusione degli strumenti necessari per raggiungere questi standard di ricerca ad un maggior numero di attori. Il facile accesso a piattaforme informatiche ed a risorse di rete precedentemente riservato a istituzioni molto ben finanziate sono ora più facilmente disponibili.

La semplicità delle nuove tecnologie permette di mettere in rete risorse tecniche e umane, abbassando gli oneri ed costi che non sarebbe stato possibile affrontare come singoli.

Gli studi qui presentati sono esempi di una ricerca futuribile: studi multicentrici più diffusi, sfruttando una risorsa onnipresente ed essenziale quale internet, per facilitare l'acquisizione dei dati, lo scambio di informazioni e pooling delle risorse materiali e umane.

Le istituzioni di ricerca biomedica sono parti interessate nel processo, traendo beneficio dalla produzione di ricerca di massima qualità su cui basare le decisioni cliniche. Su quest'ottica, le motivazioni dietro la realizzazione di uno studio controllato e randomizzato sulla prossima generazione di immunosoppressori, o di uno studio multicentrico retrospettivo per capire meglio la popolazione dei trapiantati di fegato, per un centro come il nostro, sembrano ovvie.



## **Riassunto**

*Introduzione.* Nonostante sia un'applicazione clinica da quasi trent'anni, i dati relativi allo stato di salute a lungo termine dei pazienti trapiantati di fegato sono scarsi. Il numero dei pazienti che raggiungono la soglia di sopravvivenza a 10 anni è in aumento, esponendo questa popolazione ai rischi associati all'uso cronico degli immunosoppressori.

*Metodi.* Il Centro Trapianti di Fegato di Padova ha coordinato due studi multicentrici spontanei: uno studio retrospettivo, osservazionale, longitudinale, multicentrico (12 Centri Trapianto di Fegato italiani) che valuta la sopravvivenza a lungo termine e le principali caratteristiche della popolazione ricevente; e EPOCAL uno studio spontaneo di Fase II, interventistico, multicentrico (7 Centri Trapianto di Fegato italiani), in aperto, randomizzato, controllato che valuta il rigetto e la perdita del graft a 3 mesi dal trapianto, la funzione renale e l'incidenza degli eventi avversi.

*Risultati.* I dati su 3008 trapianti di fegato effettuati in Italia dal 1993 al 1999 sono stati registrati in un eCRF. I dati di 2846 pazienti con un sufficiente follow-up sono stati usati per le analisi successive. La sopravvivenza a 20 anni dal trapianto è stata stimata al 51%.

Un totale di 139 pazienti è stato arruolato nello studio EPOCAL, 92 nel gruppo di studio e 47 nel gruppo di controllo. Non abbiamo trovato differenze significative tra i due gruppi prima all'arruolamento. L'end-point primario dello studio è stato raggiunto: i rigetti acuti confermati da biopsia erano meno del 25 % (sotto 14 %) ( $p < 0,05$ ). La funzione renale a tre mesi era significativamente migliore nel gruppo di studio ( $p < 0,05$ ).

*Conclusioni.* Questi studi presentano un profilo di sopravvivenza eccellente della coorte di pazienti italiani trapiantati di fegato da lungo tempo. Mostriamo sicurezza ed efficacia di un protocollo immunosoppressivo con minimizzazione degli inibitori della calcineurina (tacrolimus), e l'introduzione precoce di everolimus. L'insieme dei risultati mostra una strada verso la sopravvivenza a lungo termine dei pazienti con protocolli immunosoppressivi sostenibili.

## **Abstract**

*Introduction.* Despite being recognized a clinical application for almost thirty years, data are very scarce regarding liver transplant patients' long term health issues. Patient survival surpasses the 10 year threshold in increasing numbers, exposing this population to risks from chronic use of immunosuppressive drugs.

*Methods.* The Liver Transplantation Centre of Padua coordinated two spontaneous multicentric studies: a longitudinal observational retrospective multicentre (12 Italian Liver Transplant Centres,) assessing long term survival and main characteristics of the recipient population; and EPOCAL, a spontaneous Phase II Interventional Multicentric (7 Italian Liver Transplantation Centres) Open-label Randomized Control Trial, assessing acute rejection and graft loss within 3 months of liver transplantation, renal function, incidence of adverse events.

*Results.* Data on 3008 liver transplantations performed in Italy between 1983–1999 were documented by an eCRF. Data of 2846 patients with sufficient follow-up were used for further analysis. 20 years patient survival was estimated at 51 %.

A total of 139 patients were enrolled in the EPOCAL study, 92 in the study group and 47 in control group. We did not find any significant difference between the two groups prior intervention. The primary end-point in the study group was achieved: biopsy-proven acute rejection was under 25 % (under 14 %) ( $p < 0.05$ ). Renal function was significantly better in the study group at 3 months ( $p < 0.05$ ).

*Conclusion.* These studies show an Italian long term liver transplantation cohort with excellent survival profiles. We show efficacy and safety of an immunosuppressive protocol with minimization of calcineurin inhibitor (tacrolimus) and early introduction of everolimus. Together, we have a path towards long term survival of patients with sustainable immunosuppressive protocols.



## **Introduzione Generale**

Il trapianto di organi è uno dei più notevoli esempi di successo della ricerca medica della fine del secolo scorso. Una storia di sforzo e sacrificio, pazienza e impazienza, passione e ragione che lottano tra di loro, mentre coloro che sono in prima linea percorrono sentieri inesplorati irti di ostacoli e battute di arresto.

Il trapianto di fegato è vittima del suo proprio successo. Alcuni degli aspetti contraddittori del trapianto di fegato vengono dal fatto che da un lato i pazienti recuperano quasi completamente, dopo la procedura, una vita normale. I riceventi dei trapianti di fegato spesso vivono dieci anni dopo l'intervento, ma per mantenere un organo estraneo nel corpo, i pazienti devono mantenere un regime continuo di immunosoppressori. Dall'altro lato purtroppo, l'uso cronico di questi farmaci ha conseguenze pesanti sulla salute generale e sulla qualità della vita dei riceventi di organi.

Tuttavia ci sono pochi studi che riguardano specificamente la questione della sopravvivenza a lungo termine dei pazienti sottoposti al trapianto.

Questa mancanza di informazioni ha indotto il nostro centro ad affrontare questo gap nella nostra conoscenza. Abbiamo quindi coordinato uno studio multicentrico osservazionale retrospettivo sulla sopravvivenza a lungo termine dei pazienti di trapianto di fegato in Italia. Lo studio affronta una lacuna nei registri, che iniziarono ad operare a livello nazionale in Italia nel 2000. Lo studio è stato seguito da uno studio approfondito dei riceventi di trapianto più longevi nel nostro centro.

L'obiettivo principale dello studio descritto nella prima parte è di determinare la sopravvivenza dei pazienti dopo trapianto di fegato, e determinare le cause della morte e del tempo dal trapianto di fegato. Altrettanto importante, è importante determinare il ripetersi di disturbi pre-OLT, o l'insorgenza di nuovi problemi di salute più comuni.

Tuttavia, elencare i problemi di salute dei riceventi di trapianto di fegato non è sufficiente, poiché la conoscenza deve tradursi in un miglioramento del processo sanitario. La ricerca deve passare dal laboratorio al letto del paziente, *from bench to bedside*.

In previsione dell'invecchiamento della popolazione dei trapiantati, bisogna anticipare alcune delle problematiche già note sulla gestione dei pazienti trapiantati nel lungo termine.

È noto fin dalla loro introduzione nella pratica clinica che gli inibitori della calcineurina hanno vari effetti collaterali degni di nota. È un dato di fatto che, anche quando si cerca di minimizzare il danno, l'esposizione a lungo termine a questi farmaci è nefrotossica.

In una popolazione di riceventi con trapianti più longevi, gli effetti cronici sono una delle principali preoccupazioni.

Condurre studi per ridurre i rischi di esposizione cronica a gli immunosoppressori nei trapiantati di fegato è una necessità. È particolarmente importante in questo momento storico, dato il numero crescente di trapiantati che superano la soglia dei 10 anni dall'intervento.

In questo contesto, il Centro Trapianti di fegato di Padova ha coordinato uno studio spontaneo multicentrico di fase II randomizzato e controllato, al fine di vagliare l'efficacia e la

sicurezza dell'introduzione precoce di un PSI (everolimus) con concomitante riduzione o svezzamento dei pazienti dall'uso di inibitori della calcineurina (tacrolimus).

L'obiettivo della seconda parte di questo lavoro è trovare una alternativa all'uso di inibitori della calcineurina sino dai primi giorni per arginare eventuali effetti negativi derivanti dall'uso cronico di questi farmaci. L'obiettivo principale di questo lavoro è di costruire una modalità di gestione dei pazienti trapiantati di fegato nel lungo termine basata sulle migliori prove di efficacia a disposizione.



# Parte I. Sopravvivenza a lungo termine dopo il trapianto di fegato

## **Riassunto**

Ci sono scarsi dati sul *follow-up* a lungo termine dei pazienti che hanno subito un trapianto di fegato. Abbiamo condotto una ricerca su questo argomento mediante uno studio osservazionale retrospettivo multicentrico nazionale in collaborazione con 12 Centri Trapianto di Fegato in Italia.

*Metodi.* Una Case Report Form elettronica (eCRF OpenClinica) è stata creata per registrare i dati clinici dei pazienti che hanno subito un trapianto di fegato in Italia prima del 1 gennaio 2000. La eCRF include le seguenti sezioni; baseline (principali caratteristiche dei riceventi e donatori al momento del trapianto), perdita del paziente/graft (data e causa), dettagli sulla sopravvivenza a lungo termine (dati su malattie ricorrenti o *de novo*). La raccolta dei dati è iniziata nel luglio 2010.

*Risultati.* Dati su 3008 trapianti di fegato eseguiti in Italia nel periodo 1983–1999 sono stati raccolti in eCRF. Dati di 2846 pazienti con informazioni sufficienti per calcolare la sopravvivenza del paziente a lungo termine sono stati l'oggetto di un'analisi preliminare. C'erano 869 femmine (31 %), l'età mediana del ricevente era di 55 anni (IDR 24,4–59,0). 38 % dei pazienti ha avuto l'epatite C. Il 19 % hanno avuto carcinoma epatocellulare, l'età mediana del donatore era di 28 anni (IDR 15,0–54,0). Il *follow-up* è stato di 141,6 mesi (IDR 0,7–211,6). La sopravvivenza dei pazienti ad uno, 10 e 20 anni è rispettivamente del 76 %, 61 % e il 51 %. È stata effettuata un'analisi preliminare di sopravvivenza univariata: l'epatite C cirrosi, classe Child C, e il trapianto di fegato prima 1990 erano tutti predittori significativi di sopravvivenza. L'età del ricevente non ha effetti percepibili sulla sopravvivenza a lungo termine. In particolare, 194 pazienti (7%) di età superiore ai 60 anni avevano profili di sopravvivenza a 10 e 20 anni: 63% e 52%, rispettivamente.

*Conclusione.* La coorte italiana di trapiantati di fegato studiata presenta eccellenti profili di sopravvivenza anche nella prospettiva del lungo termine.

## **Abstract**

There is scarce data on the long term follow-up of patients having undergone liver transplantation (LT). We have investigated this issue through a nationwide retrospective observational study conducted with 12 Liver Transplantation Centers.

*Methods.* A specific electronic Case Report Form (eCRF OpenClinica) was created to capture clinical data of patients having undergone LT in Italy before January 1<sup>st</sup>, 2000. The eCRF included the following main sections; baseline (main recipient and donor characteristics at the moment of LT), patient/graft failure (date and cause), long term survivor details (data on *de novo* and recurrent diseases). Data harvest began on July 2010.

*Results.* Data on 3008 liver transplantations performed in Italy covering the period 1983–1999, registered in a eCRF, were subject to preliminary analysis. We considered 2846 patients with sufficient follow-up data to calculate long-term patient survival. There were 869 females (31 %), median recipient age was 55 years (IDR 24.4–59.0). 38% of patients had hepatitis C. 19% had hepatocellular carcinoma, median donor age was 28 years (IDR 15.0–54.0). Median follow-up was 141.6 months (IDR 0.7–211.6). One, 10 and 20 years patient survival was 76 %, 61 % and 51 % respectively. A preliminary univariate survival analysis was performed, Hepatitis C cirrhosis, Child C class, and liver transplantation before 1990 were all significant predictors of survival. Interestingly, recipient age had no effect on long term survival. In particular, 194 patients (7 %) older than 60 years had 10 and 20 year survival profiles of 63% and 52% respectively.

*Conclusion.* The Italian Liver transplant recipient cohort studied shows excellent survival profiles also in the long term.

## Sommario del Capitolo

Parte I. Sopravvivenza a lungo termine dopo il trapianto di fegato.....	17
Introduzione.....	21
A. Metodi.....	27
1. Studio policentrico nazionale.....	27
2. Studio monocentrico approfondito.....	28
a) Pazienti.....	28
b) Analisi statistica.....	28
B. Risultati.....	29
1. Studio osservazionale retrospettivo multicentrico nazionale.....	29
a) Copertura dell'indagine.....	29
b) Caratteristiche dei riceventi e donatori.....	29
c) Indicazioni al trapianto.....	30
d) Analisi di sopravvivenza.....	31
2. Studio monocentrico approfondito.....	35
a) Descrizione della popolazione.....	35
Parametri di laboratorio.....	35
Baseline.....	35
b) Sopravvivenza del paziente e del graft.....	39
Genere.....	39
Età.....	40
Confronto di speranza di vita/sopravvivenza con la popolazione generale....	40
Ritrapianto.....	42
Funzionalità renale ed epatica.....	43
Parametri di laboratorio a un anno: incidenza sulla sopravvivenza.....	43
Eziologia.....	45
Comorbilità.....	46
Cirrosi e complicanze.....	46
Donatore.....	47
Cause di morte.....	48
c) Profilo clinico.....	52
Recidiva di epatopatia.....	52
Patologie associate.....	52
Neoplasie de novo.....	54
Rigetto acuto e cronico.....	55
Epatite aspecifica.....	55
C. Discussione.....	56
D. Conclusioni.....	66
E. Bibliografia.....	67

## Indice delle Figure (Capitolo)

Figura 1: Evoluzione del numero dei trapianti in Europa 1968–2008.....	24
Figura 2: Causa del decesso.....	31
Figura 3: Sopravvivenza a 20 anni, effetto del HCV.....	32
Figura 4: Sopravvivenza a 20 anni dei pazienti trapiantati di fegato.....	33
Figura 5: Sopravvivenza dei pazienti adulti (in rosso) e pediatrici (in verde ) a 10 anni dal trapianto di fegato.....	34
Figura 6: Perdita di anni vita pazienti trapiantati vs. popolazione italiana di riferimento.....	34
Figura 7: Sopravvivenza globale dei riceventi.....	39
Figura 8: Confronto sopravvivenza/speranza di vita paziente/popolazione < 30 anni.....	41
Figura 9: Confronto sopravvivenza/speranza di vita paziente/popolazione 30–50 anni.....	42
Figura 10: Confronto sopravvivenza/speranza di vita paziente/popolazione > 50 anni.....	42
Figura 11: Sopravvivenza nel ritrapianto.....	43
Figura 12: Sopravvivenza e bilirubina ad 1 anno.....	44
Figura 13: Sopravvivenza e creatinina ad 1 anno.....	44
Figura 14: Effetto dell'età del donatore sulla sopravvivenza.....	48
Figura 15: Causa dei decessi nel post-trapianto, confronto entro e dopo 6 mesi.....	49

## Indice delle Tabelle (Capitolo)

Tabella 1: Proporzione dei pazienti HCC al trapianto.....	30
Tabella 2: Confronto dell'indicazione al trapianto per periodo storico.....	30
Tabella 3: Caratteristiche dei pazienti HCC al trapianto.....	31
Tabella 4: Parametri di laboratorio pre-trapianto (baseline).....	36
Tabella 5: Caratteristiche ricevente e donatore pre-trapianto (baseline).....	38
Tabella 6: Confronto con la sopravvivenza della popolazione generale per fasce d'età.....	41
Tabella 7: Sopravvivenza per eziologia di epatopatia.....	45
Tabella 8: Sopravvivenza in rapporto alle complicanze della cirrosi.....	47
Tabella 9: Causa della morte dei pazienti dopo il trapianto di fegato entro e dopo 6 mesi...49	
Tabella 10: Analisi univariata della sopravvivenza del paziente, escludendo mortalità entro 6 mesi.....	51
Tabella 11: Frequenza pre- e post-trapianto di comorbidità.....	54
Tabella 12: Insorgenza di neoplasie de novo.....	54



## **Introduzione**

Il perfezionamento dei criteri di selezione dei candidati, la progressione delle conoscenze dei meccanismi che regolano la risposta immune, l'affinamento delle tecniche chirurgiche, l'ottimizzazione del supporto anestesilogico e rianimatorio, le nuove acquisizioni in materia d'immunosoppressione, unitamente alla qualità di assistenza nel *follow-up*, hanno portato ad un notevole allungamento della sopravvivenza del paziente trapiantato di fegato.

Il *follow-up* post-trapianto permette di valutare il profilo clinico dei pazienti, di analizzare l'epidemiologia delle patologie che seguono il trapianto e di avanzare considerazioni sui fattori che influenzano la mortalità, la morbilità e la sopravvivenza a breve, medio e lungo termine.

Dai dati del Registro Europeo del Trapianto di Fegato (*European Liver Transplant Registry* ELTR) riguardanti il periodo compreso tra il 1968 e il 2009, si evidenziano tassi di sopravvivenza di circa 82 % a 1 anno, 71 % a 5 anni, 61 % a 10 anni, il 51 % a 15 anni e il 43 % a 20 anni. Il periodo critico per l'esito post-trapianto è rappresentato dai i primi 6 mesi in cui si sono verificati il 46 % dei decessi e il 65 % delle perdite di *graft* (Adam et al., 2012).

Se consideriamo solo i pazienti che sopravvivono oltre i 6 mesi, i tassi di sopravvivenza sono più alti (ca. 96 % a 1 anno,

83 % a 5 anni, 71 % a 10 anni, 61 % a 15 anni e il 52 % a 20 anni). Dopo un miglioramento tra il 1988 e il 2000, la sopravvivenza dei pazienti trapiantati di fegato è relativamente stabile dal 2000. Con il passare degli anni, partendo da un tasso del 33 % a 1 anno prima del 1985, si arriva a 76 % nel periodo tra il 1990 e il 1994 fino a raggiungere il 85 % ad 1 dopo il 2004. Il miglioramento riguarda i pazienti trapiantati per qualsiasi indicazione, ma soprattutto per neoplasia. Rimane invariato il periodo critico dei primi sei mesi ad un anno che predispone l'andamento generale futuro dei pazienti trapiantati. Oltre la metà dei decessi, e tre quarti dei ritrapianti si sono verificati entro il primo anno dopo il primo intervento. Passata questa finestra temporale, le prospettive di sopravvivenza migliorano notevolmente, con una speranza di vita spesso pluridecennale (Adam et al., 2012).

La principale indicazione al trapianto di fegato è la malattia epatica cronica progressiva. L'epatopatia terminale è lo scenario clinico nel quale uno o più processi determinano un danno epatico tale da esitare nell'insufficienza epatica funzionale senza che ad essa si possa porre rimedio. La gravità del danno epatico varia da una cirrosi pauci-sintomatica sino a uno scompenso funzionale con compromissione cerebrale e franco coinvolgimento renale.

In considerazione dei differenti quadri clinici che i pazienti presentano, della gravità della malattia di base, delle comorbilità e quindi dei differenti risultati che la soluzione trapiantologica prospetta, risulta evidente la cruciale importanza della selezione dei candidati e delle tempistiche d'intervento.

In Italia sono stati eseguiti 17308 trapianti di fegato dal 1983 a settembre 2013 di cui 3843 sono stati eseguiti fino al 1999 e i restanti 13465 a partire dal 2000 (Centro Nazionale Trapianti).

Nonostante l'era dei trapianti di fegato abbia già da tempo compiuto i suoi vent'anni, la letteratura è ancora molto povera di lavori che prendano in considerazione pazienti sopravvissuti a due decenni dal trapianto. Gli studi attualmente disponibili in letteratura riportano percentuali di sopravvivenza da circa 36 % al 52 % a 20 anni (Jain et al., 2011; Schoening et al., 2013; Duffy et al., 2010).

Il trapianto di fegato è diventato una applicazione clinica nel 1984 (National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: liver transplantation--June 20-23, 1983, 1984), dopo due decenni di difficoltà tecniche e teoriche. Con lo sviluppo di una terapia immunosoppressiva convenzionale, e con l'introduzione degli inibitori della calcineurina (i.e. ciclosporina, tacrolimus,) il panorama del trapianto di fegato si è trasformato radicalmente. I pazienti

trapiantati hanno cominciato a vivere molto più a lungo, superando frequentemente la soglia dei 10 anni.

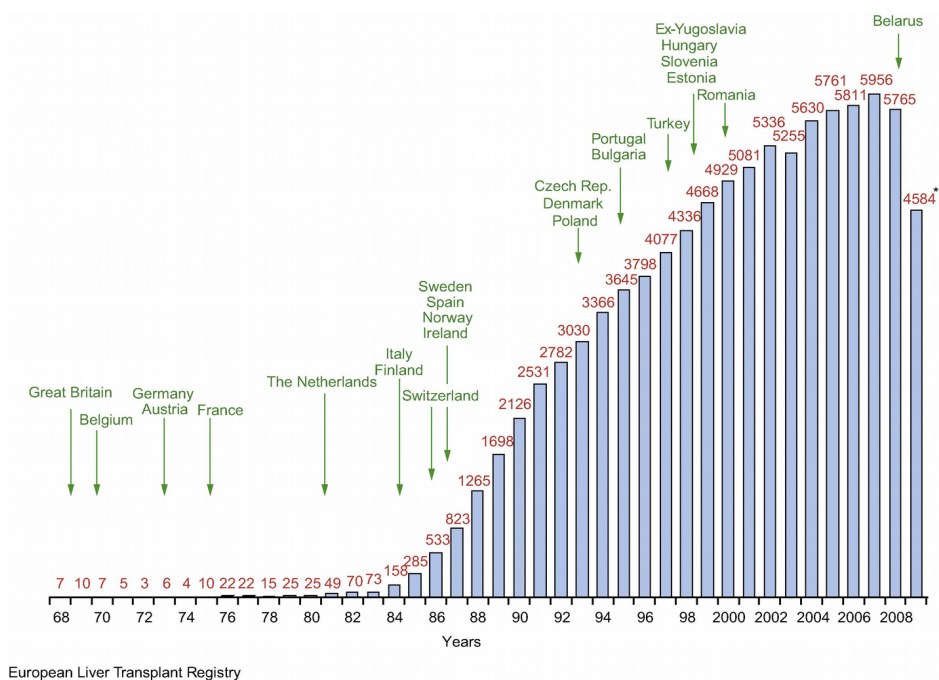


Figura 1: Evoluzione del numero dei trapianti in Europa 1968–2008

Tratto da: Journal of Hepatology Volume 57, Issue 3 2012 675 – 688

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.04.015>; (Adam et al., 2012)

I dati del registro Europeo di trapianti di fegato (ELTR) illustrano questa progressione (vedasi Figura 1, sopra). Nella macro-area europea, il numero dei trapianti di fegato era limitato prima del 1984 e non superava mai un centinaio per anno. Con l'accettazione di questa procedura come applicazione clinica riconosciuta, tale numero supera subito questa soglia. Da allora, il numero di trapianti di fegato è aumentato regolarmente.

In questi ultimi 10 anni, la crescita si è lievemente decelerata, e si piazza nel 2013 intorno ai 6000 trapianti all'anno (Adam et al., 2012). Questa inflessione è legata principalmente alla

difficoltà di reperire un numero sufficiente di organi adeguati da trapiantare. Per sopperire a questa carenza si stanno sviluppando strategie alternative al trapianto di fegato intero da cadavere, quali lo *split liver*, fegato parziale, o il trapianto da donatore vivente.

Si stima a circa 50 mila il numero di persone in Europa che oggi vivono con un fegato trapiantato. Di questi oltre il 40 % hanno ricevuto il trapianto da più di 10 anni e un quarto di questi ultimi—ovvero il 9 % della popolazione totale trapiantata—da più di due decenni. L'attuale momento storico consente di caratterizzare meglio questa popolazione, per cercare di determinare i parametri predittori di una lunga sopravvivenza.

Gli studi sulla sopravvivenza a lungo e lunghissimo termine nel trapianto di fegato sono necessari dal punto di vista clinico per la gestione di una popolazione con esigenze mediche particolari e destinata ad aumentare in modo importante nei prossimi anni.

Tuttavia, ad oggi vi sono scarsi dati su questo emergente argomento. In letteratura sono documentati pochi lavori specificamente mirati allo studio di questa popolazione (Adam et al., 2012; Duffy et al., 2010; Jain et al., 2011; Schoening et al., 2013).

Premessa l'importanza del tema, abbiamo approcciato il suo studio in due fasi successive. La prima fase disegnata come

uno studio osservazionale retrospettivo policentrico nazionale, mira a fare una fotografia dei trapiantati di fegato dopo la soglia dei 10 o 20 anni. Questo lavoro è stato condotto in collaborazione con 12 centri di trapianto di fegato italiani. La seconda fase, un approfondimento sul profilo dei pazienti con trapianti più longevi, appartenenti al solo centro di Padova, con lo specifico scopo di determinare le peculiari caratteristiche di questa popolazione, e di determinare l'esistenza di parametri predittori della lunga sopravvivenza dopo il trapianto di fegato.

## **A. Metodi**

### **1. Studio policentrico nazionale**

Per condurre questo studio osservazionale retrospettivo multicentrico, è stato creato uno specifico Case Report Form elettronico (eCRF, OpenClinica) per registrare i dati clinici dei pazienti che sono stati sottoposti trapianto di fegato in Italia tra 1983 e il 1° gennaio 2000. La eCRF comprende le seguenti sezioni principali:

- baseline: (principali caratteristiche dei donatori e dei riceventi al momento del trapianto di fegato),
- decesso del paziente o perdita dell'organo (data e la causa),
- sopravvivenza a lungo termine (dati su patologie *de novo* e/o malattie ricorrenti).

Il sito per la cattura telematica dei dati (EDC, *electronic data capture*) è stato messo a disposizione dei centri, tramite accesso remoto controllato, per permettere ai partecipanti di immettere direttamente i dati sulla piattaforma. La raccolta dei dati è iniziata nel luglio 2010.

La raccolta e la gestione dei dati di questo studio è stata realizzata con il software open source OpenClinica, versione 3.0. Copyright © OpenClinica LLC e collaboratori, Waltham, MA, USA, [www.openclinica.com](http://www.openclinica.com).

## **2. Studio monocentrico approfondito**

Per caratterizzare meglio questa popolazione di trapiantati, e per determinare i parametri che potrebbero interessare futuri studi sulla sopravvivenza a lungo e lunghissimo termine, lo studio multicentrico si è prolungato in uno studio monocentrico approfondito del Centro Trapianti di Fegato di Padova.

### **a) Pazienti**

Sono stati considerati 89 pazienti trapiantati nell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova dal Dicembre 1990 (primo trapianto di fegato a Padova) al Maggio del 1994, includendo in tal modo i pazienti che abbiano superato la soglia dei 20 anni dal trapianto o che arrivino a tale soglia entro un anno dall'inizio di questo studio.

### **b) Analisi statistica**

I dati sono espressi come mediana e intervallo, o media e deviazione standard.

È stato usato lo stimatore di Kaplan-Maier per calcolare le curve di sopravvivenza. Le differenze tra le curve di sopravvivenza sono state confrontate usando il log-rank. La regressione univariata è stata calcolata con test di Cox.

## **B. Risultati**

### **1. Studio osservazionale retrospettivo multicentrico nazionale**

#### **a) Copertura dell'indagine**

I dati su 3008 trapianti di fegato eseguiti in Italia nel periodo tra il 1983 e il 1999, registrati nel eCRF, sono stati raccolti nella piattaforma OpenClinica per la cattura telematica dei dati. Sono stati registrati 2564 trapianti per il periodo 1992–2000, che corrispondono al 78 % degli interventi censiti dal Centro Nazionale Trapianti per lo stesso lasso di tempo. Considerando che non hanno partecipato tutti i Centri Trapianto di Fegato italiani, questo si può ritenere un ottimo indicatore della completezza dei dati raccolti (Centro Nazionale Trapianti).

Per questo studio abbiamo preso in considerazione 2846 pazienti aventi dati di *follow-up* sufficienti per calcolare la sopravvivenza del paziente a lungo termine.

Il *follow-up* mediano è stato di 141,6 mesi (IDR 0,7–211,6).

#### **b) Caratteristiche dei riceventi e donatori**

Il gruppo era composto da 869 femmine (31 %) e 1977 maschi (69 %), l'età mediana del ricevente era di 48 anni (IDR 24,4–59,0).

L'età mediana del donatore era di 28 anni (IDR 15,0–54,0)

Nel periodo studiato su 2077 trapianti, 60 sono stati realizzati impiegando il fegato parziale (*split liver*), e 6 hanno fatto uso del donatore vivente (LDLT.)

Sono stati segnalati dei fattori prognostici negativi del donatore (i.e. steatosi, instabilità) soltanto in 92 occasioni.

### **c) Indicazioni al trapianto**

Le principali indicazioni al trapianto sono state epatite C per il 38 % dei pazienti e carcinoma epatocellulare il 19 % e in percentuale minore epatite B, cirrosi alcolica, colangite sclerosante primitiva (PSC), cirrosi biliare primitiva (PBC), patologie rare, epatite fulminante, epatite criptogenetica e altre neoplasie diverse dall'epatocarcinoma.

HCC	Numero	Prob
No	2284	0,81397
Si	522	0,18603
Totale	2806	1,00000

*Tabella 1: Proporzione dei pazienti HCC al trapianto*

Nei diversi periodi storici considerati, la proporzione di pazienti trapiantati per cirrosi e per HCC si è mantenuta sostanzialmente invariata (Tabella 2, sotto.)

	Periodo storico			
	< 1990 (n=215)	1990-1993 (n=576)	1994-1996 (n=953)	1997-1999 (n=1102)
Cirrosi	87 %	87 %	85 %	93 %
HCC	15 %	21 %	20 %	20 %

*Tabella 2: Confronto dell'indicazione al trapianto per periodo storico*

Caratteristiche pazienti HCC	Valore	Totale pazienti
Interventi oncologici pregressi	112 (28%)	394
Radiologia	31 (6%)	522
Anatomia pathologica		184
Numero dei noduli	2 (1-12)	
Dimensione del nodulo maggiore (mm)	26 (5-200)	
Stadiazione G3-G4	38 (21%)	
Invasione vascolare	35 (20%)	

Tabella 3: Caratteristiche dei pazienti HCC al trapianto

#### d) **Analisi di sopravvivenza**

La sopravvivenza globale dei pazienti a 1, 3, 5, 10 e 20 anni è stata del 76 %, 70 %, 67 %, 61 % e 51 % rispettivamente. Al momento dell'indagine 112 pazienti erano ancora in vita a 20 anni dal trapianto (vedasi Figura 4, sotto.)

La principale causa di morte è stata la ricorrenza di malattia post-trapianto (HCV, HCC, ecc.) (Figura 2.)

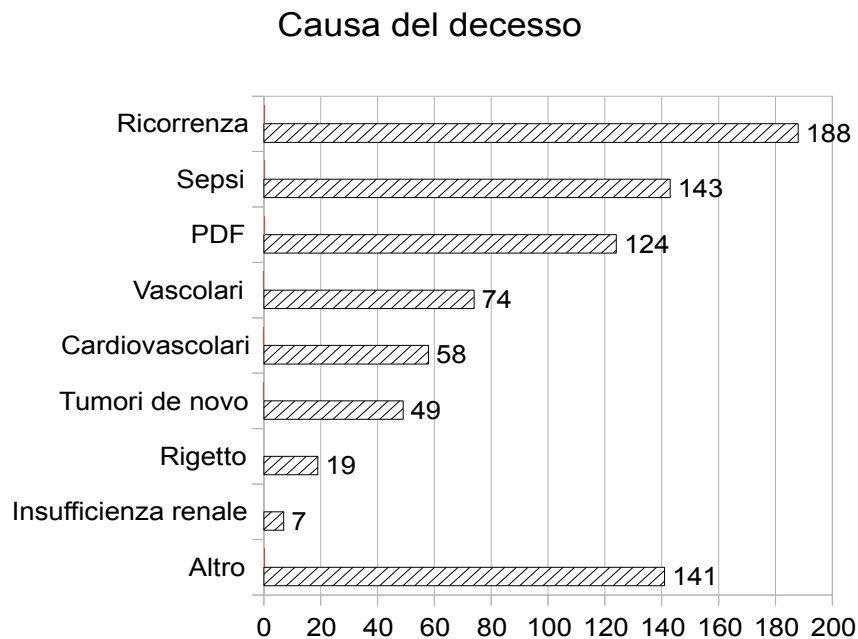


Figura 2: Causa del decesso

È interessante notare che l'età del ricevente non ha avuto impatto sulla sopravvivenza a lungo termine. In particolare, 194 pazienti (7 %) di età superiore ai 60 anni hanno avuto un eccellente profilo di sopravvivenza a lungo termine (sopravvivenza a 10 e 20 anni di 63 % e 52 % rispettivamente) in linea con quanto riportato dai dati del Registro Europeo del Trapianto di Fegato.

È stata effettuata un'analisi univariata preliminare di sopravvivenza da cui è risultato che la cirrosi da Epatite C, la classe C del punteggio Child-Turcotte-Pugh e il trapianto prima del 1990 erano tutti predittori significativi di sopravvivenza (vedasi Figura 3.)

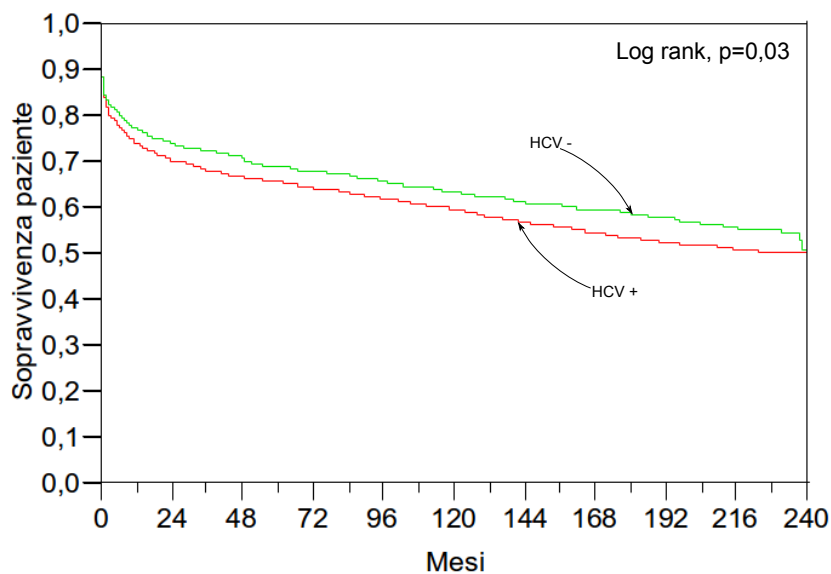
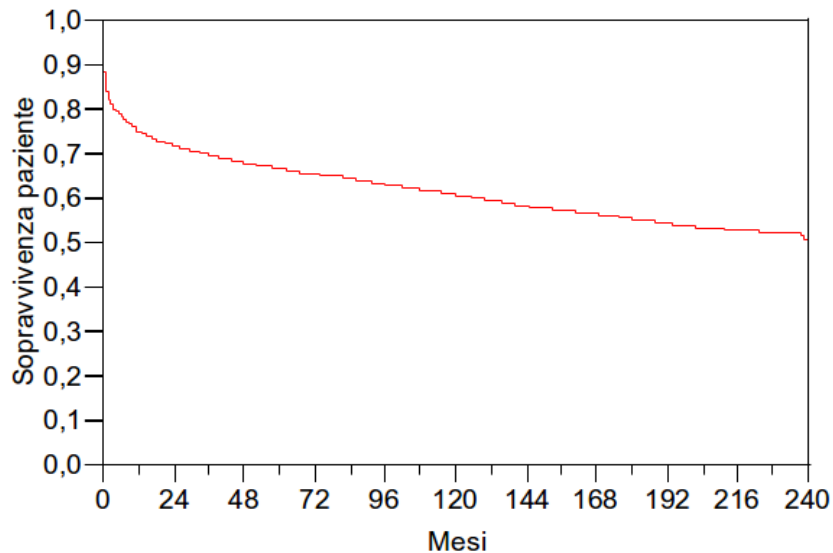


Figura 3: Sopravvivenza a 20 anni, effetto del HCV

La sopravvivenza dei pazienti a 1, 10 e 20 anni è stata rispettivamente del 76 % , 61 % e il 51 % (vedasi Figura 4, sotto.)



*Figura 4: Sopravvivenza a 20 anni dei pazienti trapiantati di fegato*

Nel periodo di studio sono stati effettuati 187 trapianti pediatrici. Non abbiamo osservato differenze significative in termini di sopravvivenza post-trapianto tra pazienti pediatrici ed adulti (vedasi Figura 5, sotto.)

Facendo un confronto tra la speranza di vita della popolazione dei pazienti adulti trapiantati con la popolazione italiana di riferimento analoga per età (ISTAT) si è osservata una diminuzione della speranza di vita di oltre vent'anni nei pazienti più giovani (età compresa tra 18 e 44 anni) mentre si è assistito ad un aumento di 10 anni di vita per riceventi oltre i 60 anni (Figura 6.)

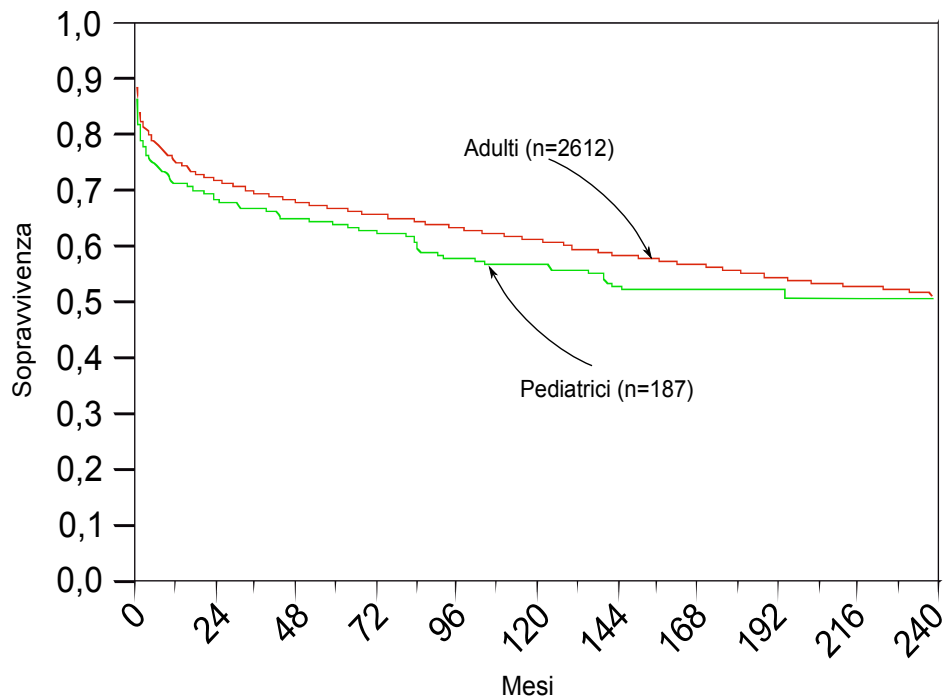


Figura 5: Sopravvivenza dei pazienti adulti (in rosso) e pediatrici (in verde) a 10 anni dal trapianto di fegato

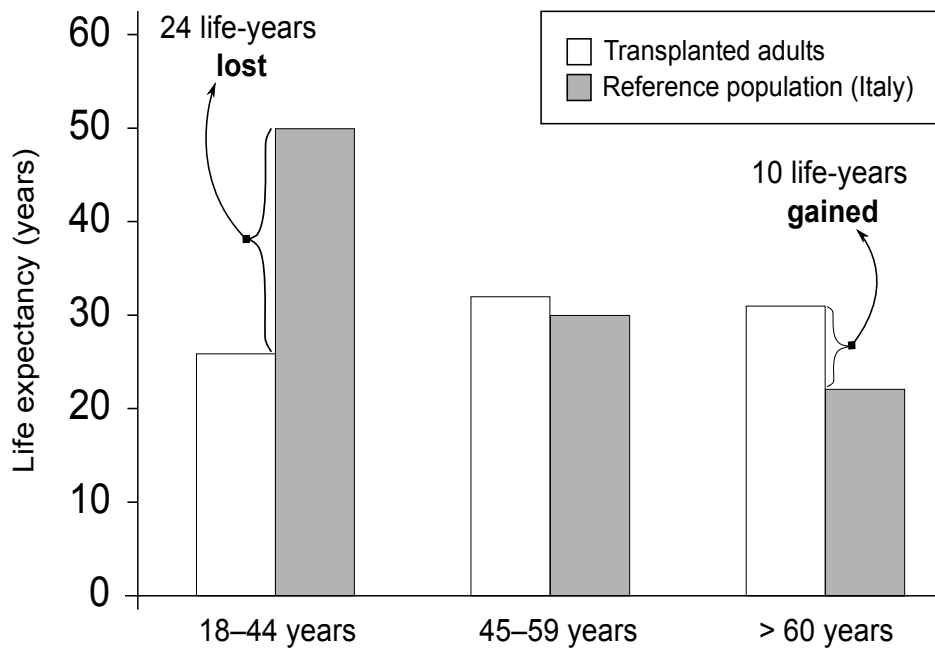


Figura 6: Perdita di anni vita pazienti trapiantati vs. popolazione italiana di riferimento

## **2. Studio monocentrico approfondito**

### **a) Descrizione della popolazione**

Abbiamo quindi focalizzato la nostra attenzione sui primi 89 pazienti sottoposti a trapianto presso il nostro centro. Tale popolazione è stata reclutata con il criterio di avere un *follow-up* sufficiente per una analisi della sopravvivenza a 20 anni.

#### **Parametri di laboratorio**

Le informazioni sullo stato di salute pre-trapianto —quali il tempo di protrombina (PT), l'albuminemia, la bilirubinemia totale e la creatininemia— sono state reperite dai referti di laboratorio registrati nelle schede di iscrizione in lista trapianto del Centro NITp (Nord Italia Transplant program).

I dati di laboratorio riguardanti funzionalità epatica (bilirubina totale, ALT,  $\gamma$ GT), funzione renale (creatinina plasmatica), compenso metabolico (glicemia e colesterolo plasmatico) e immunosoppressione (livelli ematici di immunosoppressore principale) sono stati ricavati, ove riportati, dalle schede ambulatoriali di *follow-up* a 1, 3, 5, 7, 10, 15 e 20 anni.

Si è tenuto conto infine del peso e dell'altezza dei pazienti, correlati nell'Indice di Massa Corporea (BMI).

#### **Baseline**

Le variabili pre-trapianto considerate sono state l'età, il genere e il gruppo sanguigno del paziente ricevente e del

donatore, l'eziologia dell'epatopatia, le comorbilità, la presenza o meno di cirrosi epatica e di complicanze ad essa correlate. In presenza di evidenze neoplastiche si sono stati valutati il numero di noduli, le rispettive dimensioni ed il grado istologico di differenziazione neoplastica.

<b>AB0</b>	A +	19	40,4 %
	AB +	4	8,5 %
	0 -	3	6,3 %
	0 +	14	29,8 %
<b>Peso</b>	Media	64,7	±13,7
	Mediana	64,0	(23-90)
<b>Altezza</b>	Media	167,8	±10,8
	Mediana	170,0	(121-184)
<b>BMI</b>	Media	23,0	±3,6
	Mediana	22,7	(15,7-30,8)
<b>PT%</b>	Media	48,9	±19,8
	Mediana	44,0	(15-100)
<b>Albumina</b>	Media	4,6	±6,0
	Mediana	3,4	(2,2-34)
<b>Bilirubina</b>	Media	5,3	±6,9
	Mediana	2,7	(0,2-37,1)
<b>Creatinina</b>	Media	1,2	±1,2
	Mediana	0,9	(0,5-6,8)
<b>Child-Pugh</b>	Media	9,7	±2,2
	Mediana	10,0	(5-14)

*Tabella 4: Parametri di laboratorio pre-trapianto (baseline)*

Le variabili ritenute interessanti per la valutazione del percorso post-operatorio a lungo termine dei pazienti considerati sono riconducibili ad aspetti clinici quali eventuale recidiva di malattia, epatopatie de novo, patologie extra epatiche di nuova insorgenza quali diabete, ipertensione arteriosa, cardiopatia, nefropatia, patologie respiratorie, osteoporosi, infezioni e interventi chirurgici sovra-mesocolici. Sono state prese in considerazione neoplasie de novo, distinte in ematologiche, dermatologiche e neoplasie di organi solidi.

Sulla base dei referti anatomo-patologici di indagini biotiche di controllo periodico, è stata considerata la presenza di eventuale rigetto acuto e cronico, epatite aspecifica, sepsi o alterazioni conseguenti a vasculopatia.

Per determinare meglio alcune delle osservazioni dello studio multicentrico nazionale, si è proceduto a studiare alcune delle variabili precedenti specificamente per il Centro Trapianto di Fegato di Padova.

Degli 89 pazienti individuati, 71 sono stati sottoposti ad un solo intervento e 18 a ritrapianto. Tra i pazienti ritrapiantati, 15 hanno subito un solo ritrapianto, 2 un doppio ritrapianto ed un paziente è stato sottoposto a 3 ritrapianti per un totale di 4 interventi.

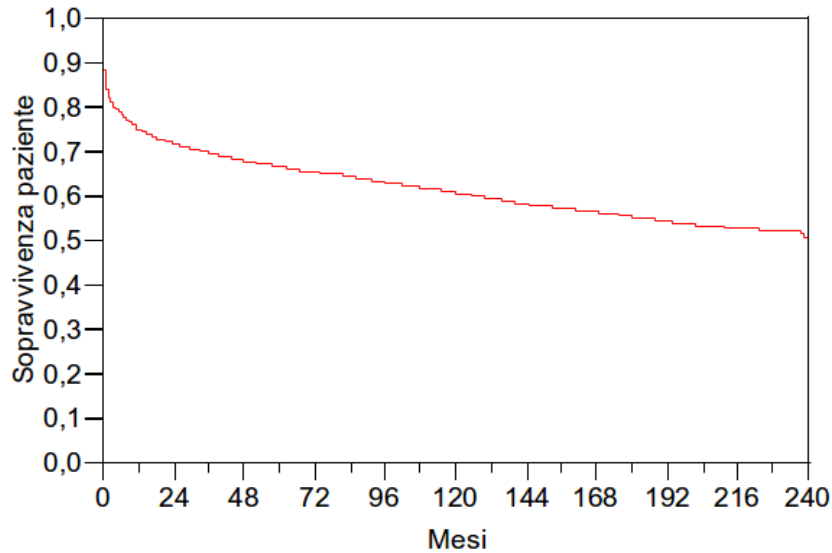
Dopo un *follow-up* mediano di 132 mesi (0–269), 27 pazienti erano vivi e 62 erano morti; di un paziente deceduto non si è saputa la data di decesso e un altro paziente è morto nel corso dello studio.

<b>N. di riceventi</b>		89	(12/'90 – 4/'94)	
<b>N. di trapianti</b>		111		
<b>Età del ricevente</b>	Media	44,3	±10,6	
	Mediana	46,5	(9–62)	
<b>Genere</b>	Femmine	29	33 %	
	Maschi	60	67 %	
<b>Indicazione primaria al trapianto</b>	HCV	16	18,0 %	
	Alcool	12	13,5 %	
	HCV + HBV	10	11,2 %	
	Alcol + virus	8	9,0 %	
	HBV	8	9,0 %	
	HCC	6	6,7 %	
	FHF	5	5,6 %	
	PSC	8	9,0 %	
	PBC	3	3,4 %	
	Autoimmune	1	1,1 %	
	Criptogenetica	4	4,5 %	
	Altre neoplasie	3	3,4 %	
	Budd-Chiari	2	2,2 %	
	Trauma	1	1,1 %	
	Atresia vie biliari	1	1,1 %	
	Alagille	1	1,1 %	
<b>comorbilità pre-trapianto</b>	Diabete	8	9,0 %	
	Ipertensione	3	3,4 %	
	Pneumopatia	10	11,2 %	
	Nefropatia	10	11,2 %	
	Cardiopatìa	1	1,1 %	
	Chirurgia pregressa	16	18,0 %	
	Infezioni	4	4,5 %	
<b>Cirrosi</b>	si	60	67,4 %	
	no	29	32,6 %	
	<i>Ipertensione portale</i>	47	52,8 %	
	<i>Ittero</i>	39	43,8 %	
	<i>Ascite</i>	34	38,2 %	
	<i>Coagulopatia</i>	29	32,6 %	
	<i>Encefalopatia</i>	23	25,8 %	
	<i>Varici esofagee</i>	20	22,4 %	
	<b>Età del donatore</b>	Media	30	±13
		Mediana	26	(8–64)
<b>Genere del donatore</b>	Femmine	35	31,5 %	
	Maschi	76	68,5 %	

Tabella 5: Caratteristiche ricevente e donatore pre-trapianto (baseline)

### **b) Sopravvivenza del paziente e del graft**

La sopravvivenza globale dei pazienti a 1, 10 e 20 anni è stata del 78,4 %, 54,6 % e 31,8 % rispettivamente.



*Figura 7: Sopravvivenza globale dei riceventi*

Considerando solo i pazienti sopravvissuti almeno sei mesi dopo il trapianto (n=68), la sopravvivenza si attesta al 95,8 %, 66,7 %, 38,9 % a 1, 10 e 20 anni rispettivamente, con tempo mediano di 171 mesi (10–269).

La sopravvivenza del organo trapiantato è stata del 63,5 %, 43,7 % e 26,5 % a 1, 10 e 20 anni.

La mediana era di 71 mesi (0–269).

### **Genere**

Le femmine erano il 33 % (n=29) mentre i maschi il 67 % (n=60).

La sopravvivenza per genere si è attestata a 1, 10 e 20 anni rispettivamente a 82,8 %, 48,3 %, 34,5 %, mediana 131 (0–265) per le femmine, e del 76,3 %, 57,6 %, 30,6 %, mediana 135 (0–269), per i maschi.

( $p = 0,75$ ).

### **Età**

L'età media dei pazienti era 44,6 anni  $\pm$  10,8, la mediana era di 47,5 (9–62).

I pazienti sono stati divisi in tre gruppi di età:

- riceventi con età inferiore ai 30 anni (n=11),
- pazienti tra i 30 e il 55 anni (n=63)
- pazienti con più di 55 anni (n=15).

La sopravvivenza della prima fascia d'età è risultata di 70 % a un anno, 50 % a 10 e 40 % a 20 anni. Quella della seconda fascia è di 77,4 %, 51,6 %, 32,3 %, mediana 128,5 (0–269) a 1, 10 e 20 anni rispettivamente. Mentre nel terzo gruppo è risultata di 80 %, 66,7 %, 20 %. ( $p = 0,974$ ) rispettivamente.

### **Confronto di speranza di vita/sopravvivenza con la popolazione generale**

Il tasso di sopravvivenza globale della coorte di controllo (ISTAT) selezionata per età e genere era di 97,4 %, 87,4 %, 66,9 % e 58,5 % a 1, 10, 15 e 20 anni. Considerando i pazienti riceventi con età inferiore a 30 anni comparati con controlli

accoppiati per età e sesso la sopravvivenza sembra peggiore. Lo stesso risulta per pazienti di età compresa tra i 30 e i 55 anni. Più interessanti sono i risultati ottenuti dai pazienti sopra i 55 anni con una curva di sopravvivenza che si avvicina di molto a quella virtuale della popolazione controllo.

		Sopravvivenza %			
		1 anno	10 anni	20 anni	Δ %
< 30 aa	Popolazione	99,8	88,5	74,0	
	Paziente	81,8	45,5	36,4	38
30-55	Popolazione	97,7	77,0	58,2	
	Paziente	75,8	51,6	32,3	26
> 55	Popolazione	95,8	64,7	40,7	
	Paziente	80,0	66,7	20,0	21

Tabella 6: Confronto con la sopravvivenza della popolazione generale per fasce d'età

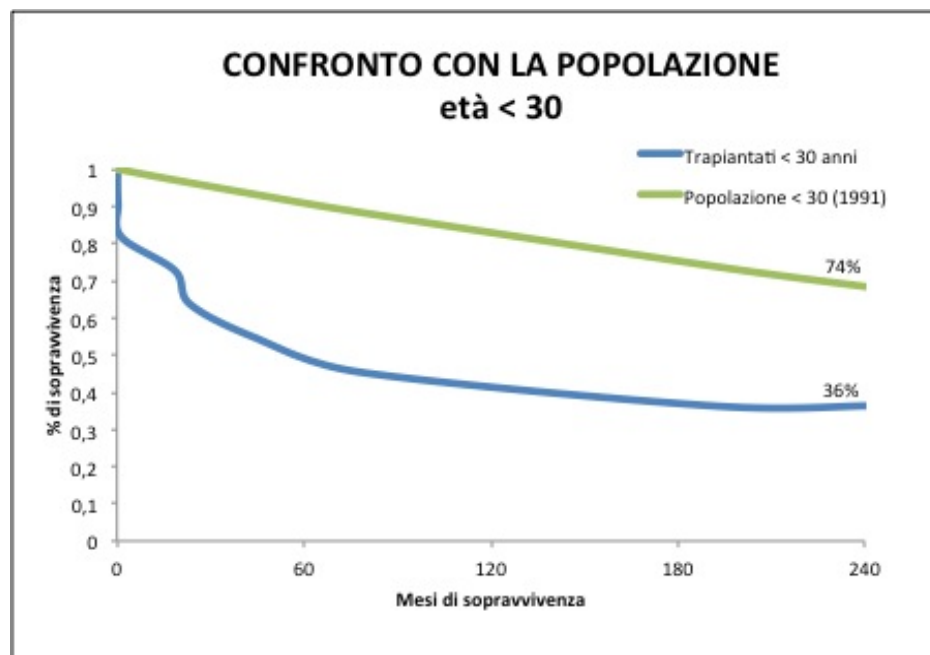


Figura 8: Confronto sopravvivenza/speranza di vita paziente/popolazione < 30 anni

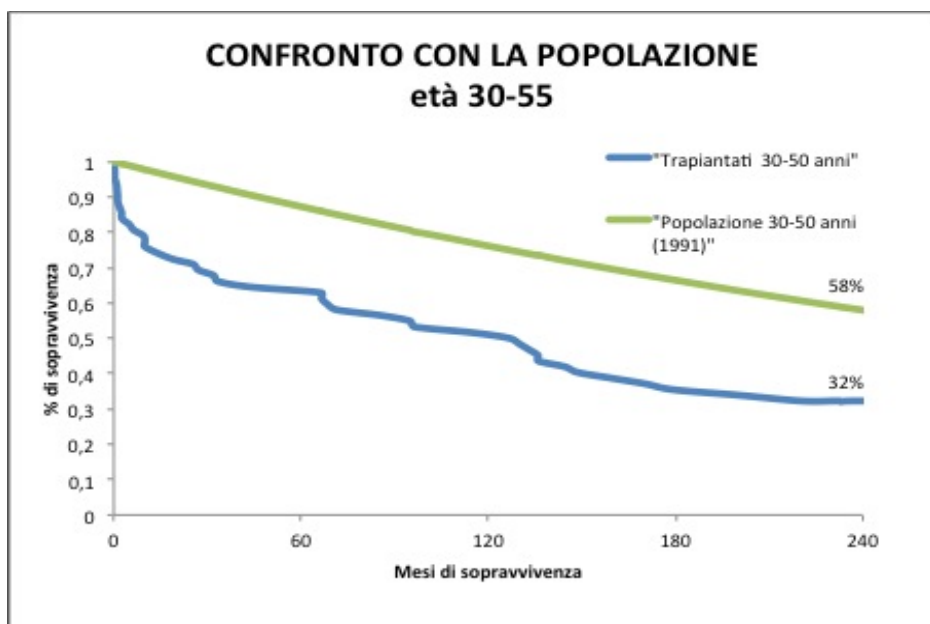


Figura 9: Confronto sopravvivenza/speranza di vita paziente/popolazione 30-50 anni

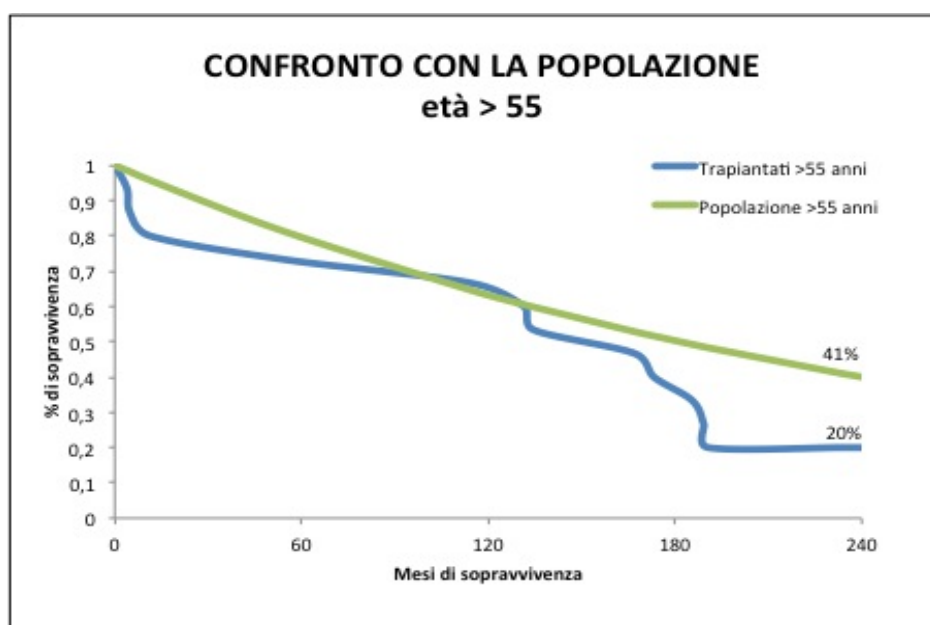


Figura 10: Confronto sopravvivenza/speranza di vita paziente/popolazione > 50 anni

## Ritrapianto

In pazienti che hanno subito almeno un ritrapianto, ovvero il 20,2 % (n=18), la sopravvivenza è stata del 64,7 %, 23,5 % e 17,7 % a 1, 10 e 20 anni. Per il restante 79,8 % (n=71), che ha

eseguito una sola procedura, la sopravvivenza è stata significativamente migliore: del 81,7 %, 62 % e 35,2 % rispettivamente. ( $p < 0,015$ )

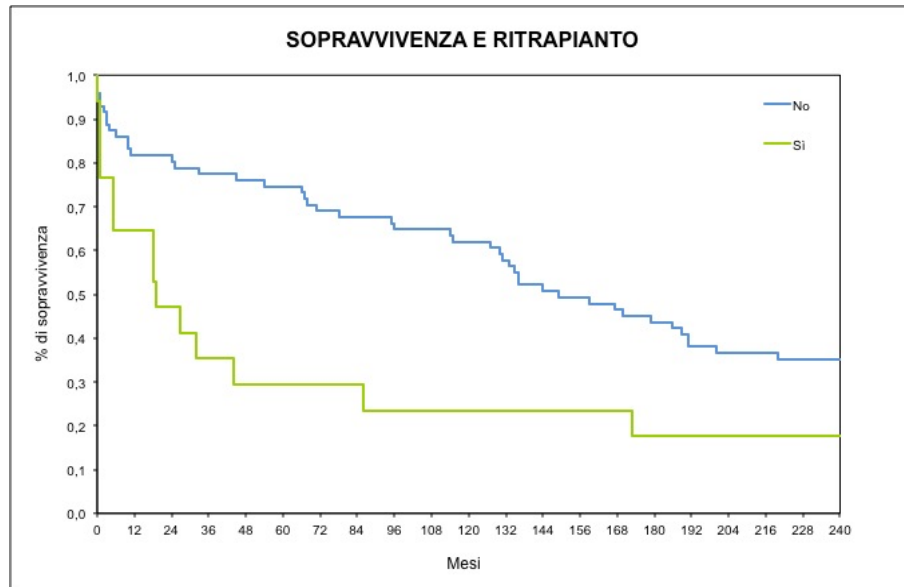


Figura 11: Sopravvivenza nel ritrapianto

### **Funzionalità renale ed epatica**

Dai dati disponibili relativi alla funzionalità renale ed epatica pre-trapianto non hanno inciso in maniera significativa sulla sopravvivenza.

### **Parametri di laboratorio a un anno: incidenza sulla sopravvivenza**

La bilirubina al controllo ad un anno presentava un valore mediano di 1 mg/dl. I pazienti che presentavano una bilirubinemia  $< 1$  mg/dl presentavano una sopravvivenza a 5, 10 e 20 anni del 75 %, 62,5 % e 56,3 %. I pazienti con bilirubina superiore a 1 presentavano sopravvivenza del

71,4 % 64,3 % e 14,3 %, ovvero significativamente inferiore ( $p = 0,067$ ).

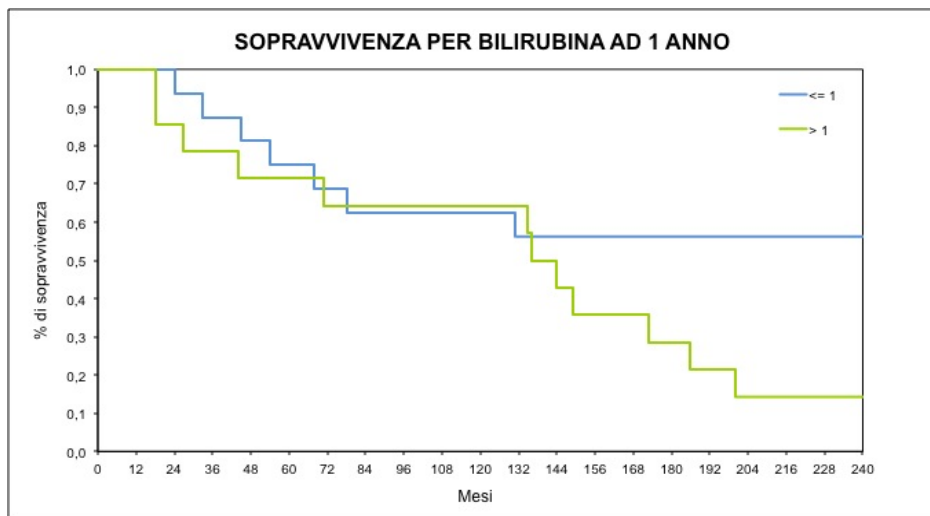


Figura 12: Sopravvivenza e bilirubina ad 1 anno

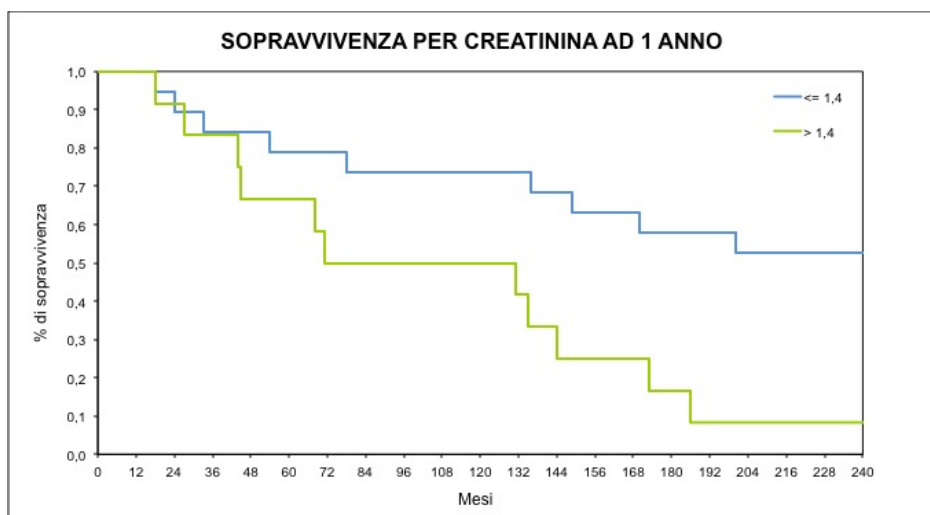


Figura 13: Sopravvivenza e creatinina ad 1 anno

La mediana della creatininemia ad un anno era 1,4 mg/dl. Con creatinina  $< 1,4$  mg/dl la sopravvivenza a 5, 10, 20 anni è stata del 79 %, 73,7 % e 52,6 %. Con creatinina  $> 1,4$  mg/dl del 66,7 %, 50 % e 8,3 %. ( $p=0,0089$ ).

## Eziologia

I pazienti sono stati suddivisi in 9 categorie in base all'eziologia dell'epatopatia. Le percentuali di sopravvivenza di ogni gruppo sono riportate in Tabella 7 (vedasi sotto.)

Indicazione principale	No.	Sopravvivenza %				
		1 anno	5 anni	10 anni	15 anni	20 anni
HCV	16	75,0	75,0	50,0	25,0	18,7
Alcool	12	75,0	66,7	66,7	50,0	41,7
PBC/PSC/Autoimmune	11	90,9	72,7	36,4,3	36,4,2	18,2
HCV+HBV	10	80,0	60,0	50,0	30,0	20,0
Alcool + Virus	8	62,5	62,5	50,0	50,0	25,0
HBV	7	71,4	57,1	57,1	28,6	28,6
HCC	6	83,3	66,7	66,7	66,7	66,7
FHF	5	60,0	40,0	40,0	-	-
Altre*	12	92,3	69,2	69,2	69,2	61,4

Tabella 7: Sopravvivenza per eziologia di epatopatia

\*Comprende: Cirrosi Criptogenica (4 pz), Malattia di Budd-Chiari (2 pz), Atresia delle vie biliari (1 pz), Sindrome di Alagille (1 pz), Colangiocarcinoma (1 pz), Metastasi da Carcinoide (1 pz), Altro tumore (1pz), Trauma (1 pz).

Si può osservare come i pazienti con tasso di sopravvivenza più elevato a vent'anni siano coloro i quali avevano come indicazione al trapianto, il carcinoma epatocellulare con il 66,7 %. Le altre cause di trapianto più rappresentate erano l'epatopatia alcolica (41,7 %) e l'epatite da virus B (28,6 %). Seguono la cirrosi alcolica associata a quella virale (25 %) e le co-infezioni HCV-HBV (20 %). Le malattie colestatiche e autoimmuni si collocano all'ultimo posto come sopravvivenza a lungo termine, presentando il 18,2 % di tasso a vent'anni. Nessuno dei pazienti trapiantati per epatite fulminante (5 pazienti) ha raggiunto i 15 anni di sopravvivenza dopo il trapianto. ( $p = 0,134$ )

In aggiunta, i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi: HCV positivi, ovvero il 38 % del campione (n=34), e non infetti da HCV. I risultati in termini di sopravvivenza sono stati del 74,3 %, 48,6 % e 17,1 % per il primo gruppo, e del 81,1 %, 58,5 % e 41,6 % per il secondo ( $p = 0,028$ ).

### **Comorbilità**

Tra le variabili pre-trapianto sono state considerate alcune malattie associate quali diabete, ipertensione arteriosa, cardiopatia, nefropatia, patologie respiratorie, gastropatia, osteoporosi, infezioni e interventi chirurgici sovra-mesocolici. I pazienti senza comorbilità associate all'epatopatia non hanno presentato differenze significative nella sopravvivenza né a breve né a lungo termine.

### **Cirrosi e complicanze**

Il 70 % dei pazienti (n=63) presentava cirrosi epatica.

Sono state prese in considerazione le più frequenti complicanze della cirrosi epatica, ove presente, valutando l'impatto che ciascuna di esse ha avuto sulla sopravvivenza a 1, 10 e 20 anni. Si è tenuto conto di ipertensione portale, ittero, ascite, coagulopatia, encefalopatia e varici esofagee e non sono state trovate differenze significative in confronto alla popolazione di controllo.

COMPLICANZE		n	SOPRAVVIVENZA %		
			1 anno	10 anni	20 anni
Ipertensione Portale	Si	50	80,0	62,0	40,0
	No	13	69,2	46,2	23,1
Ittero	Si	40	77,5	57,5	35,0
	No	23	78,3	60,9	39,1
Ascite	Si	36	75,0	58,3	30,6
	No	27	81,5	59,3	44,4
Coagulopatia	Si	30	80	63,3	33,3
	No	33	75,8	54,6	39,4
Encefalopatia	Si	25	76,0	60,0	28,0
	No	38	79,0	57,9	42,1
Varici esofagee	Si	22	81,8	59,0	50,0
	No	41	75,6	58,5	29,3

Tabella 8: Sopravvivenza in rapporto alle complicanze della cirrosi

## Donatore

Le caratteristiche del donatore prese in considerazione sono state l'età e il genere, inoltre è stato esaminato il tempo di ischemia a cui è stato sottoposto l'organo.

La sopravvivenza del ricevente trapiantato con organi provenienti da soggetti con età compresa tra 21 e 30 anni erano di 92 %, 68 % e 40 % rispettivamente a 1, 10 e 20 anni. Nella fascia più giovane, con età inferiore a 20 anni, 74 %, 58 % e 39 %. Per età del donatore superiore a 30 anni la sopravvivenza è stata del 73 %, 40 %, 17 %. ( $p = 0,08$ ). Questi dati avvallano, come affermato in letteratura, che i gli organi di donatori con meno di 55 anni hanno un impatto minore sulla sopravvivenza del ricevente (Adam et al., 2003).

Una conferma di quanto già noto (Adam et al., 2003) viene anche dall'osservazione del genere del donatore: la sopravvivenza del ricevente nel caso di donatore femmina è

del 76 %, 48 %, 28 % nel caso maschio del 80 %, 57 %, 33 %. ( $p = 0,47$ ).

Infine si è considerato il tempo di ischemia totale (TIT) subito dal *graft*.

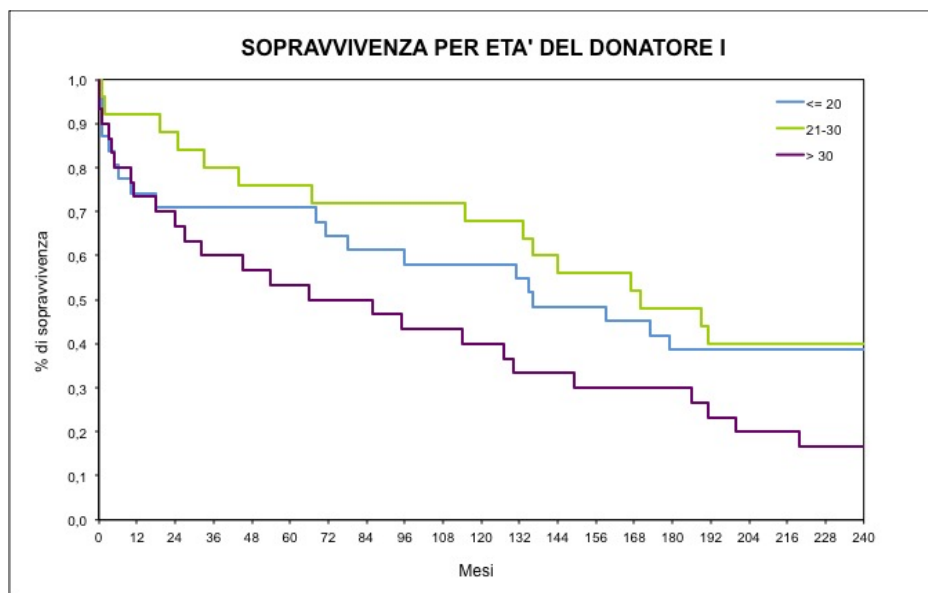


Figura 14: Effetto dell'età del donatore sulla sopravvivenza

Considerando la variabile dicotomica con *cut-off* a 7 ore, i pazienti con TIT inferiore alle 7 ore hanno avuto tasso di sopravvivenza a 1, 10 e 20 anni del 86,7 %, 60 % e 20 % mentre, con TIT superiore, del 88,2 %, 58,9 % e del 35,3 %.

### Cause di morte

Sono state analizzate le cause di morte entro e oltre i sei mesi dal trapianto di fegato.

Le cause di decesso precoce erano imputabili per il 50 % ( $n=7$ ) a PNF o problematiche vascolari e per il 20 % ( $n=3$ ) a episodi infettivi o a sepsi post operatoria. Si è verificato

inoltre un infarto miocardico acuto fatale e un ictus che ha portato alla morte del paziente.

Causa di morte	Globale		Entro 6 mesi			Oltre 6 mesi		
	n	% tot.	n	% tot.	% nel periodo	n	% tot.	% nel periodo
<b>Totale</b>	<b>63</b>	<b>100</b>	<b>16</b>	<b>25</b>	<b>100</b>	<b>47</b>	<b>75</b>	<b>100</b>
PNF o vascolare	10	16	7	11	46,7	3	5	7,9
Neoplasia	10	16	0	0	0	10	16	26,3
Recidiva	11	17	0	0	0	11	17	28,9
Infezione, sepsi o rigetto cronico	10	16	3	5	20	7	11	18,4
Neurologica (Ictus)	2	3	1	2	6,7	1	2	2,6
Infarto miocardico	7	11	1	2	6,7	6	10	15,8
Ignota	16	25	4	6	25	12	19	26

Tabella 9: Causa della morte dei pazienti dopo il trapianto di fegato entro e dopo 6 mesi

La Figura 15 mette a confronto le cause di decesso entro e oltre i sei mesi dal trapianto di fegato.

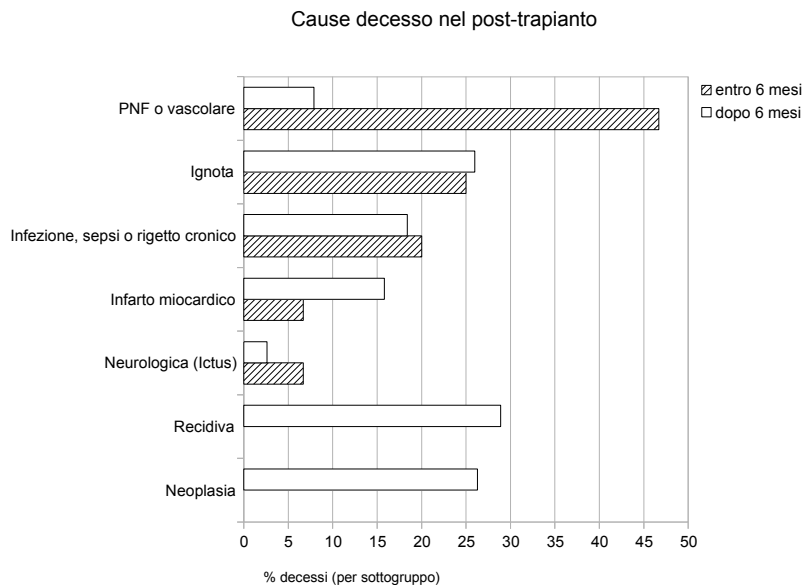


Figura 15: Causa dei decessi nel post-trapianto, confronto entro e dopo 6 mesi

Per quanto riguarda l'analisi delle morti nel *follow-up* successivo ai primi sei mesi, come riassunto in Tabella 9 (vedasi sopra), si nota come la maggior parte dei decessi sia

riconducibile alla recidiva dell'epatopatia di base, responsabile del 31,4 % dei decessi (n=11). In ordine di frequenza segue la mortalità per neoplasie maligne extraepatiche nel 28,9 % (n=10), infezioni nel 20 % dei casi (n=7), 17 % per arresto cardiaco (n=6), tre per complicanze vascolari e un ictus ischemico.

<b>VARIABILI Ricevente</b>	<b>Globale HR (95 % CI), p</b>	<b>Senza i primi 6 mesi HR (95 % CI), p</b>
Età	1,00 (0,98–1,03), 0,7822	1,01 (0,98–1,03), 0,6642
Sesso femminile	0,90 (0,51–1,52), 0,7029	0,96 (0,51–1,74), 0,8970
HBV positivo	0,98 (0,57–1,65), 0,9484	0,79 (0,40–1,45), 0,4540
HCV positivo**	1,69 (1,03–2,81), 0,0399	2,00 (1,62–3,58), 0,0191
Abuso di alcol	0,81 (0,44–1,42), 0,4823	0,74 (0,36–1,40), 0,3616
Epatocarcinoma§	0,37 (0,06–1,18), 0,1021	0,22 (0,01–1,02), 0,0537
Comorbidità	0,90 (0,54–1,48), 0,6720	0,96 (0,54–1,71), 0,8941
Diabete§§	2,07 (0,90–4,15), 0,0826	2,29 (0,86–5,10), 0,0904
Ipertensione	0,77 (0,13–2,46), 0,7029	0,99 (0,16–3,19), 0,9848
Nefropatia	0,96 (0,40–1,97), 0,9193	0,88 (0,30–2,02), 0,7748
Infezioni	1,97 (0,60–4,81), 0,2339	2,15 (0,52–5,92), 0,2491
Progressi interventi	1,00 (0,48–1,88), 0,9944	1,05 (0,46–2,13), 0,8968
Indice di massa corporea	1,03 (0,94–1,13), 0,4948	1,03 (0,93–1,14), 0,5974
Cirrosi	0,72 (0,37–1,56), 0,3742	0,64 (0,31–1,57), 0,3083
PT	0,99 (0,98–1,01), 0,2834	0,99 (0,98–1,01), 0,3004
Bilirubina	1,02 (0,96–1,06), 0,5211	1,01 (0,94–1,06), 0,7546
Creatinina	1,17 (0,84–1,51), 0,3207	0,90 (0,48–1,33), 0,6393
Albumina	1,00 (0,92–1,05), 0,9731	0,96 (0,77–1,04), 0,4319
MELD	1,03 (0,99–1,07), 0,1718	1,01 (0,96–1,06), 0,6916
Punteggio Child	1,02 (0,89–1,17), 0,7906	0,98 (0,84–1,15), 0,8254
<b>DONATORE</b>		
Età del donatore§§	1,02 (0,99–2,04), 0,0901	1,02 (1,00–1,04), 0,0921
Sesso femminile donatore	1,36 (0,74–2,25), 0,3728	1,25 (0,66–2,26), 0,4789
Tempo di ischemia totale§	0,99 (0,99–1,00), 0,1660	1,00 (0,99–1,00), 0,0673
<b>EVENTI POST-TRAPIANTO</b>		
Rigetto acuto	0,97 (0,60–1,63), 0,9803	1,22 (0,68–2,15), 0,5018
Rigetto cronico§	0,60 (0,30–1,08), 0,0928	0,80 (0,40–1,50), 0,5002
Ricorrenza epatopatia	0,90 (0,53–1,49), 0,6789	1,47 (0,83–2,63), 0,1883
Diabete§	0,58 (0,29–1,05), 0,0743	0,77 (0,38–1,44), 0,4274
Ipertensione**	0,34 (0,19–0,60), 0,0001	0,45 (0,24–0,81), 0,0076
Nefropatia*	0,46 (0,23–0,84), 0,0099	0,60 (0,30–1,12), 0,1110
Cardiopatia**	0,32 (0,10–0,79), 0,0099	0,39 (0,12–0,97), 0,0408
Osteoporosi*§	0,38 (0,13–0,87), 0,0187	0,47 (0,16–1,08), 0,0780
Infezioni	0,85 (0,43–1,53), 0,5969	1,04 (0,51–1,98), 0,9001
Neoplasie de novo*	0,52 (0,29–0,88), 0,0139	0,71 (0,39–1,27), 0,2517
Dose CyA 1 anno	1,00 (0,99–1,01), 0,3815	1,00 (0,99–1,01), 0,3815
Dose CyA 3 anni	1,00 (0,99–1,01), 0,6444	1,00 (0,99–1,01), 0,6444
Livelli CyA 1 anno	1,00 (0,99–1,01), 0,1808	1,00 (1,00–1,01), 0,1808
Bilirubina 1 anno**	1,08 (1,02–1,17), 0,0084	1,08 (1,02–1,17), 0,0084
Bilirubina 3 anni	0,62 (0,23–1,32), 0,2335	0,62 (0,23–1,32), 0,2335
ALT 1 anno**	1,01 (1,00–1,01), 0,0275	1,01 (1,00–1,01), 0,0275
ALT 3 anni§§	1,02 (1,00–1,03), 0,0689	1,02 (1,00–1,03), 0,0689
γGT 1 anno**	1,00 (1,00–1,01), 0,0275	1,00 (1,00–1,01), 0,0275
γGT 3 anni§§	1,01 (1,00–1,01), 0,0575	1,01 (1,00–1,01), 0,0575
Creatinina 1 anno	1,67 (0,69–3,80), 0,2500	1,67 (0,69–3,80), 0,2500
Creatinina 3 anni	1,27 (0,78–5,84), 0,1273	1,27 (0,78–5,84), 0,1273
Glicemia 1 anno	1,01 (0,99–1,02), 0,1938	1,01 (0,99–1,02), 0,1938
Glicemia 3 anni	1,01 (0,99–1,02), 0,5071	1,01 (0,99–1,02), 0,5071

Tabella 10: Analisi univariata della sopravvivenza del paziente, escludendo mortalità entro 6 mesi

\* p < 0,05 ; § p < 0,1

### **c) Profilo clinico**

#### **Recidiva di epatopatia**

Il 38,2 % (n=34) dei pazienti ha sviluppato la recidiva dell'epatopatia primaria.

Si tratta di 18 pazienti con recidiva di HCV, ovvero il 51 %, 6 casi di HBV che corrispondono al 20 %, 2 di colangite sclerosante primitiva (PSC), uno di cirrosi biliare primitiva (PBC) e un'epatite autoimmune. È da intendersi che questi risultati sono sottostimati a causa dei decessi peri- e post-operatori. Nel 32 % dei pazienti viventi dopo vent'anni (n=8) si riscontra la recidiva dell'epatopatia primitiva.

#### **Patologie associate**

Alla fine del periodo di osservazione è stato documentato che il 25,8 % dei soggetti (n=23) era affetto da diabete mentre solo il 9 % dei pazienti era diabetico prima del trapianto. Ciò definisce una percentuale di pazienti del 18,5 % tra quelli a rischio, che ha effettivamente sviluppato diabete durante il periodo di *follow-up*. La percentuale di pazienti con diabete, tra i sopravvissuti, è invece del 32 % (n=8).

Per quanto concerne l'ipertensione arteriosa si rileva che solo 3 pazienti ne erano affetti prima del trapianto, mentre 31, corrispondenti a 29 nuovi casi, lo erano alla fine periodo di osservazione, ovvero il 33,7 % dei soggetti a rischio (un paziente precedentemente iperteso è tornato a valori normali

di pressione arteriosa). La percentuale di pazienti ipertesi tra i sopravvissuti è del 64 % (n=16).

I pazienti con nefropatia pre-trapianto erano 10 (11,2 %), alla fine del periodo di osservazione 17 nuovi pazienti, ovvero il 21,5 % dei soggetti a rischio, era nefropatico. La percentuale di pazienti con nefropatia tra i sopravvissuti era del 40 % (n=10).

La prevalenza di malattie dell'apparato cardiovascolare, valutata con diagnosi di infarto miocardico acuto IMA o interventi di rivascolarizzazione miocardica, è stimata di 12,5 % dei soggetti a rischio, ovvero di 11 nuovi casi contro un solo paziente cardiopatico nel pre-trapianto. La percentuale di pazienti con malattie dell'apparato cardiovascolare tra i sopravvissuti è del 32 % (n=8).

Considerando l'osteoporosi, comune effetto collaterale della terapia immunosoppressiva, sono state rilevate percentuali di nuove insorgenze del 12,5 % (n=12) a fronte di un solo malato prima dell'intervento. La percentuale di pazienti con osteoporosi tra i sopravvissuti a 20 anni è del 28 % (n=7).

Infine, infezioni di gravità da moderata a severa hanno interessato 18 pazienti nel post-trapianto corrispondenti al 21,2 % degli esposti.

	Pre trapianto		Nuovi casi Post trapianto		Viventi a 20 anni	
	N°	%	N°	%	N°	%
	Diabete	8	9	15	18,5	8
Ipertensione	3	3,4	29	33,7	16	64
Nefropatia	10	11,2	17	21,5	10	40
Cardiopatìa	1	1,1	11	12,5	8	32
Osteoporosi	1	1,1	12	13,5	7	28
Infezioni	4	4,5	18	21,2		

Tabella 11: Frequenza pre- e post-trapianto di comorbilità

## Neoplasie de novo

		N°	% sul tot pazienti	% sui neoplastici
Tumori de novo	<b>Totali</b>	<b>31</b>	<b>34,8</b>	<b>100</b>
	<i>Dermatologici</i>	11	12,4	35,5
	<i>Ematologici</i>	7	7,8	22,6
	<i>Solidi</i>	13	14,6	41,9
		<b>Mesi</b>		
Insorgenza post OLT	Media	93,6	± 65,9	
	Mediana	84	(1–238)	

Tabella 12: Insorgenza di neoplasie de novo

Quasi il 35 % dei pazienti (n=31) nel corso degli anni dopo il trapianto di fegato ha sviluppato almeno una neoplasia. Nel 35 % di tali pazienti (n=11) si è trattato di neoformazioni maligne della pelle (12 % sul totale dei pazienti), nel 23 % (n=7) di neoplasie ematologiche (8 % sul totale dei pazienti) e nel 42 % dei casi (n=13) di tumori d'organi solidi (15 % sul totale dei pazienti). La mediana dei mesi trascorsi dal trapianto alla diagnosi istologica era di 84 mesi (1–238). Le neoplasie più frequentemente riscontrate erano adenocarcinomi del tratto gastroenterico e malattie linfoproliferative come, ad esempio, il linfoma non Hodgkin.

Tra i pazienti viventi, il 52 % (n=13) ha avuto almeno una neoplasia nel post-trapianto.

### **Rigetto acuto e cronico**

Il 35 % dei 111 organi donati ha indotto rigetto acuto, 39 i pazienti interessati; tra questi, 11 hanno avuto due episodi di rigetto, un paziente ne ha avuti 3 e un paziente ha avuto 4 rigetti acuti.

La mediana del tempo tra il trapianto e la diagnosi istologica di rigetto acuto era di 35 giorni (1–2905).

Il 19 % dei *graft* (n=21) è stato interessato da rigetto cronico. La mediana dei mesi trascorsi tra il trapianto e la diagnosi istologica di rigetto era di 43,5 mesi (2–223).

Tra i sopravvissuti dopo vent'anni, il 36 % (n=9) aveva avuto almeno un episodio di rigetto acuto e il 32 % (n=8) di rigetto cronico.

### **Epatite aspecifica**

Il 31,5 % dei pazienti (n=28) ha sviluppato nel corso del periodo di *follow-up* almeno un'epatite acuta aspecifica documentata istologicamente. La mediana dei mesi dal trapianto antecedenti la diagnosi è stata di 57 mesi (3–180).

Il 56 % (n=14) dei pazienti sopravvissuti a 20 anni avevano avuto una diagnosi istologica di epatite aspecifica.

### **C. Discussione**

Questo lavoro sulla sopravvivenza a lungo e lunghissimo termine si colloca tra i primi nell'analisi dei dati di *follow-up* dopo vent'anni dal trapianto di fegato. I risultati presentati forniscono nuovi elementi, e consolidano alcune osservazioni, sulle caratteristiche di questa particolare popolazione di pazienti.

Lo studio multicentrico è tuttora in corso per cui i dati sono incompleti. Non è possibile quindi una adeguata analisi sui fattori in grado di influenzare la sopravvivenza a lungo termine del trapianto di fegato. Possiamo tuttavia ottenere alcune interessanti informazioni preliminari.

- Il trapianto pediatrico notoriamente ha una sopravvivenza maggiore di quello adulto (Acuña et al., 2013; Ng et al., 2012). Nel nostro studio multicentrico invece osserviamo un *trend* verso una sopravvivenza peggiore. Questo risultato risente certamente della curva di apprendimento nel trapianto pediatrico in Italia.
- L'età del ricevente non ha dimostrato un impatto significativo sulla sopravvivenza a lungo termine. Come vedremo meglio nello studio monocentrico questo dato è sicuramente effetto della superselezione dei riceventi “anziani” studiati in modo approfondito per escludere patologie extra-epatiche rilevanti. Si tratta quindi di pazienti che, fatta eccezione per l'epatopatia, sono privi

di comorbilità rilevanti e quindi con caratteristiche sovrapponibili a quelle dei riceventi più giovani.

- La ricorrenza di malattia, e l'HCV in particolare, rappresenta un fattore prognostico negativo certo anche a lungo termine.

Sulla scorta di questi risultati preliminari abbiamo voluto approfondire nel nostro centro l'analisi del sottogruppo di pazienti con un *follow-up* potenziale di 20 anni (trapiantati tra il 1991 ed il 1994).

Abbiamo concentrato l'attenzione sui primi 89 pazienti trapiantati presso il nostro centro.

A vent'anni, la sopravvivenza globale dei riceventi e dell'organo trapiantato nel nostro centro si attesta al 32 % e 27 % rispettivamente, in una coorte di pazienti con età media di 44,6 anni  $\pm$  10,8. I risultati osservati sono pienamente in linea con la media europea e, tenendo conto che il nostro lavoro considera gli interventi dal 1991, primo anno dell'attività trapiantologica del Centro di Padova, ci aspettiamo di riscontrare, in serie successive di pazienti, risultati migliori.

Altri studi riportano sopravvivenze che vanno dal 48% al 56%. In particolare, Duffy e collaboratori di Los Angeles (UCLA) (Duffy et al., 2010), hanno determinato al 56 % la sopravvivenza a 20 anni della loro coorte di studio. Tuttavia,

lo studio si riferisce ad una popolazione diversa di quella del nostro centro, con una età media di  $28 \pm 21$  anni.

Un altro studio riporta al 48 % la sopravvivenza a vent'anni in un gruppo di pazienti con un'età media di  $42 \pm 20$  anni, paragonabile a quella del nostro campione di pazienti (Jain et al., 2000).

In Germania, il gruppo di Neuhaus dell'Ospedale Charité Campus Virchow-Klinikum di Berlino riferisce sopravvivenze a vent'anni del 52 % (Schoening et al., 2013), pur senza significative differenza del campione rispetto alla nostra analisi. Si deve sottolineare che i risultati di questo centro sono eccellenti, anche nel breve e medio termine, e decisamente superiori alla media europea.

L'impatto dell'età del ricevente è stato rilevante soprattutto nel confronto con la speranza di vita della popolazione generale visualizzabile in una curva costruita virtualmente. Si può notare come la curva di sopravvivenza dei pazienti divisi per anzianità sia tanto più vicina alla normale quanto più sia elevata la fascia d'età. I pazienti con età superiore ai 55 anni hanno un'aspettativa di vita quasi sovrapponibile a quella della popolazione generale, randomizzata per età e per anno, con un "*Loss in life expectancy*" del 20 % (Figura 10, pagina 42.)

In questi ultimi vent'anni sono stati conseguiti notevoli progressi in materia di riduzione della mortalità

perioperatoria, di gestione del trattamento immunosoppressivo, con l'introduzione di nuovi farmaci quali, ad esempio, gli inibitori di mTOR o ancora la possibilità di prevenire o curare le comorbilità o le recidive di malattia con chemioterapici di nuova generazione. Tutto ciò rende verosimile che, nei pazienti trapianti al giorno d'oggi, l'aspettativa di vita a lungo termine possa essere migliore di quella dei trapiantati degli anni '90, con una differenza di diminuzione della speranza di vita probabilmente molto ridotta, come dimostrano i dati del Registro Europeo del Trapianto di Fegato (Adam et al., 2012). Le variabili pre-trapianto che impattano negativamente in modo significativo sulla sopravvivenza a 20 anni sono in linea con quanto riportato dall'analisi dei dati del *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* (NIDDK) sul trapianto di fegato (Watt et al., 2010). Queste sono relativamente poche: l'infezione HCV ( $p < 0,05$ ), il ritrapianto ( $p < 0,05$ ) e, marginalmente, il diabete mellito pregresso ( $p < 0,1$ ). Risulta protettiva l'indicazione per Epatocarcinoma solo se considerati i viventi dopo 6 mesi.

Tra le caratteristiche del donatore emergono marginalmente significative l'età del donatore e il tempo di Ischemia totale ( $p < 0,1$ ).

Più interessanti i risultati dell'analisi delle caratteristiche post trapianto. Tra i parametri di laboratorio rilevati a un anno, sono significativamente correlati alla sopravvivenza valori

maggiori di bilirubina ( $p < 0,05$ ), di ALT ( $p < 0,05$ ) e di  $\gamma$ GT ( $p < 0,05$ ) mentre creatinina, glicemia e colesterolo non sembrano essere determinanti presi come variabili continue. Anche alle indagini laboratoristiche a tre anni rimangono significative ALT e  $\gamma$ GT, seppur marginalmente ( $p < 0,1$ ). La creatininemia a un anno con *cut-off* di 1,4 mg/dl solleva un certo interesse, con sopravvivenza dei pazienti con valori  $> 1,4$  mg/dl di solo l'8,3 % a vent'anni ( $p < 0,05$ ).

Paradossalmente risultano fattori protettivi il rigetto cronico e comorbilità croniche quali diabete, nefropatia, ipertensione, cardiopatia e osteoporosi. La spiegazione di ciò può essere proprio la tempo-dipendenza di tali patologie, riscontrabili effettivamente solo sui sopravvissuti; non è escluso comunque un bias dovuto alla scarsa numerosità campionaria.

Da quanto detto emerge con chiarezza che le condizioni cliniche pre-trapianto non sono, in linea di massima, fattori che incidono significativamente sulla sopravvivenza a lungo termine dei pazienti, o meglio, lo sono solo alcuni e solo in parte. Questo è valido in una coorte di pazienti come la nostra; all'epoca dei primi trapianti, infatti, i criteri di selezione erano molto restrittivi sia per il ricevente sia per il donatore e non vi erano generalmente casi di estrema severità come quelli che, con gli attuali criteri, soprattutto se allargati, sono attualmente considerati trapiantabili.

Passando in rassegna i risultati, significativi e non, ci vorremmo soffermare per prima cosa sull'età del ricevente. La sopravvivenza a 20 anni dei pazienti con età inferiore a 30 anni è stata del 40 % mentre quella nei pazienti con più di 55 anni è stata del 20 %. Ciò è in linea con le conoscenze consolidate in letteratura e, recentemente, riproposte dagli studi di *follow-up* a vent'anni già citati.

Il ritrapianto, avvenuto nel 20 % dei pazienti e, nella maggior parte dei casi, precoce, è risultato un fattore impattante sulla sopravvivenza ( $p=0,015$ ). Questa percentuale è lievemente maggiore rispetto a altre coorti, ad esempio Schoening et al. riportano il 17 % (Schoening et al., 2013) mentre Jain et al. il 13,5 % (Jain et al., 2000). È noto che la risposta al reintervento è peggiore nei pazienti che presentano molte spesso condizioni cliniche severe e margini di libertà tecnica più restrittivi.

L'analisi della sopravvivenza, in relazione alla funzionalità renale, ha preso in considerazione solo la creatininemia e non ha portato a significatività statistica nonostante la tendenza fosse chiaramente a favore di una correlazione, come d'altra parte dimostrato dallo studio del gruppo di Berlino che ha scelto però di monitorare la velocità di filtrazione glomerulare (GFR) (Schoening et al., 2013).

Lo stesso è valido per la funzionalità epatica pre-trapianto (valutata con bilirubinemia e albumina) che, probabilmente

perché alterata dalla malattia avanzata, ha verosimilmente distorto i risultati. A controprova di ciò vi sono le evidenze statistiche di correlazione tra la sopravvivenza e i dati laboratoristici post-trapianto a uno e tre anni (bilirubina, ALT,  $\gamma$ GT).

Nella nostra coorte il 7 % dei pazienti è stato trapiantato per epatocarcinoma. L'introduzione del MELD come indicatore di priorità al trapianto, permettendo l'attribuzione di punteggi di priorità ai pazienti con HCC in stadio limitato, ha determinato un aumento di sei volte della percentuale dei riceventi affetti da questa patologia.

L'eziologia che presenta i risultati migliori in ambito di sopravvivenza è, paradossalmente, proprio l'epatocarcinoma (66 % a 20 anni). Ciò è contrario ai dati riportati in letteratura che, anche in analisi di *follow-up* più brevi, segnalano lo segnalano come una delle indicazioni con sopravvivenza a lungo termine più bassa. È noto altresì che i trapianti per carcinoma epatocellulare, all'epoca di riferimento, erano al di fuori dei "Criteri di Milano" e che il nostro studio includeva solo sei pazienti, peraltro giovani, alcuni con malattia in stadio precoce.

È opportuno ricordare che l'eziologia virus relata è tra le indicazioni a più bassa sopravvivenza a vent'anni nel nostro studio (HCV 18 %, HBV 28 %, HCV+HBV 20 %) come

d'altronde lo è in letteratura (Berenguer, 2005; Schoening et al., 2013).

Tra i dati sul donatore, emerge la giovane età media che, come detto, è fattore protettivo in questo e in altri studi, e il tempo d'ischemia totale, raramente correlato in altre serie di pazienti.

La prima causa di morte nel post-operatorio è tipicamente la mancata ripresa funzionale dell'organo. Ciò è evidente in letteratura con percentuali attualmente fino al 10 %, e nel nostro lavoro, basato su dati di circa il 50 % dei decessi nei primi sei mesi e del 16 % del totale. È doveroso sottolineare che si stima attualmente la mortalità perioperatoria tra il 5 e il 10 %, ed è indubbio che tale miglioramento sia frutto della raggiunta maturità nella gestione chirurgica e anestesologica.

Dai sei mesi post-trapianto in poi cambiano completamente le distribuzioni delle cause di decesso. Al primo posto si colloca la recidiva di malattia, poi i tumori, le infezioni e solo al quarto posto le malattie cardiovascolari. Ciò è in perfetta sintonia con quanto riportato nella recente letteratura citata (Schoening et al., 2013). La mortalità cardiovascolare rimane tra le ultime, in controtendenza rispetto a quanto accade alla popolazione generale dove rappresenta la principale causa di morte.

Dai risultati emerge che circa il 38 % di trapiantati HCV positivi ha sviluppato la recidiva di malattia istologicamente

documentata come cirrosi HCV relata. La percentuale di reinfezione con progressione in cirrosi epatica non può essere stimata con sicurezza per difficoltà a reperire la documentazione ma è certamente maggiore al 50 %. I dati noti in letteratura si attestano tra il 70 % e il 90 % con tassi fino al 95 % a 5 anni (Gane, 2008).

Interessanti sono anche le considerazioni in materia di patologie di nuova insorgenza. Per alcune è costante il rapporto di casualità con il trattamento immunosoppressivo che nel nostro campione è stato in larga parte basato sui farmaci inibitori della calcineurina e steroidi nel breve periodo.

Il diabete è insorto nel 18,5 % dei pazienti a rischio contro una percentuale stimata del 25,8% per la popolazione generale. È un dato assimilabile ad numerosi altri in letteratura. I viventi diabetici sono il 32 %. I dati ISTAT indicano che la prevalenza del diabete in Italia nella fascia di età 60–64 anni, ovvero quella che corrisponde all'età media dei pazienti sopravvissuti ( $61,2 \pm 17$  anni) è del 11,3 % (ISTAT, 2011). Ciò indica che nei sopravvissuti dopo 20 anni dal trapianto di fegato la prevalenza del diabete è di quasi 3 volte maggiore rispetto alla popolazione standardizzata per età.

L'ipertensione è insorta nel 34 % dei soggetti a rischio, ma addirittura il 64 % dei sopravvissuti a 20 anni è iperteso. Nella popolazione di pari età questo dato scende al 34 %.

Il 12,5 % dei trapiantati ha sviluppato in corso del *follow-up* una cardiopatia.

Le cardiopatie riguardano attualmente il 5–6 % della popolazione tra i 60 e 64 anni. I sopravvissuti a 20 anni hanno una cardiopatia nel 32 % dei casi.

L'osteoporosi infine è insorta nel 12,5 % dei pazienti a rischio. Il 28 % dei sopravvissuti a vent'anni ne è affetto contro il 12,3 % della popolazione generale standardizzata per età.

#### ***D. Conclusioni***

Il trapianto di fegato offre eccellenti profili di sopravvivenza anche nella prospettiva del lungo periodo. L'efficace selezione pre-trapianto ha il potenziale per minimizzare l'impatto prognostico intrinseco dell'età del ricevente.

Il trapianto di fegato è una terapia convalidata e collaudata nel trattamento della malattia epatica allo stadio terminale, dell'insufficienza epatica acuta e del HCC. I livelli di sicurezza ed affidabilità raggiunti sono in netto progresso rispetto ai primi anni, portando ad un miglioramento significativo della sopravvivenza del paziente trapiantato. La perdita del trapianto da rigetto acuto o cronico risulta ormai un evento assai raro.

Il limitato numero di organi a disposizione richiede che le indicazioni al trapianto vengano costantemente riviste ed ottimizzate. L'aumento graduale della sopravvivenza è legato in parte ad una maggiore esperienza nella procedura chirurgica e ad una maggiore padronanza della terapia immunosoppressiva. Le malattie dovute all'invecchiamento o all'uso cronico dei farmaci immunosoppressori rappresentano la più grande minaccia alla sopravvivenza a lungo termine dei pazienti trapiantati.

## E. Bibliografia

Acuña, C., Zuleta, R., Dalmazzo, R., Valverde, C., Uribe, M., Alba, A., Buckel, E., Hunter, B., González, G., Godoy, J., et al. (2013). Pediatric Liver Transplantation Experience and Outcome in Chile. *Transplant. Proc.* 45, 3724–3725. doi:10.1016/j.transproceed.2013.08.090.

Adam, R., Karam, V., Delvart, V., O'Grady, J., Mirza, D., Klempnauer, J., Castaing, D., Neuhaus, P., Jamieson, N., Salizzoni, M., et al. (2012). Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J. Hepatol.* 57, 675–688. doi:10.1016/j.jhep.2012.04.015.

Adam, R., McMaster, P., O'Grady, J. G., Castaing, D., Klempnauer, J. L., Jamieson, N., Neuhaus, P., Lerut, J., Salizzoni, M., Pollard, S., et al. (2003). Evolution of liver transplantation in Europe: Report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl.* 9, 1231–1243. doi:10.1016/j.lts.2003.09.018.

Berenguer, M. (2005). What determines the natural history of recurrent hepatitis C after liver transplantation? *J. Hepatol.* 42, 448–456. doi:10.1016/j.jhep.2005.01.011.

Centro Nazionale Trapianti Sistema Informativo Trapianti. *SIT*. Available at: <https://trapianti.sanita.it/statistiche/home.asp> [Accessed January 18, 2014].

Duffy, J. P., Kao, K., Ko, C. Y., Farmer, D. G., McDiarmid, S. V., Hong, J. C., Venick, R. S., Feist, S. R., Goldstein, L., Saab, S., et al. (2010). Long-Term Patient Outcome and Quality of Life After Liver Transplantation: Analysis of 20-Year Survivors. *Ann. Surg. Oct. 2010* 252, 652–661. doi:10.1097/SLA.0b013e3181f5f23a.

Gane, E. J. (2008). The natural history of recurrent hepatitis C and what influences this. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* 14 Suppl 2, S36–44. doi:10.1002/lt.21646.

ISTAT (2011). Il diabete in Italia. Available at: <http://www.istat.it/it/archivio/71090> [Accessed January 26, 2014].

ISTAT Tavole di mortalità - Serie storica per ripartizione/regione/provincia. *Tavole Mortalità*. Available at: <http://demo.istat.it/unitav2012/index.html?lingua=ita> [Accessed January 20, 2014].

Jain, A., Reyes, J., Kashyap, R., Dodson, S. F., Demetris, A. J., Ruppert, K., Abu-Elmagd, K., Marsh, W., Madariaga, J., Mazariegos, G., et al. (2000). Long-Term Survival After Liver Transplantation in 4,000 Consecutive Patients at a Single Center. *Ann. Surg.* 232, 490–500.

Jain, A., Singhal, A., Fontes, P., Mazariegos, G., deVera, M. E., Cacciarelli, T., Lopez, R. C., Sindhi, R., Humar, A., and Marsh, J. W. (2011). One Thousand Consecutive Primary Liver Transplants Under Tacrolimus Immunosuppression: A 17- to 20-Year Longitudinal Follow-Up. [Miscellaneous Article]. *Transplant. May 15 2011* 91, 1025–1030. doi:10.1097/TP.0b013e3182129215.

National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: liver transplantation--June 20-23, 1983 (1984). *Hepatol. Baltim. Md* 4, 107S–110S.

Ng, V. L., Alonso, E. M., Bucuvalas, J. C., Cohen, G., Limbers, C. A., Varni, J. W., Mazariegos, G., Magee, J., McDiarmid, S. V., and Anand, R. (2012). Health Status of Children Alive 10 Years after Pediatric Liver Transplantation Performed in the US and Canada: Report of the Studies of Pediatric Liver Transplantation Experience. *J. Pediatr.* 160, 820–826.e3. doi:10.1016/j.jpeds.2011.10.038.

Schoening, W. N., Buescher, N., Rademacher, S., Andreou, A., Kuehn, S., Neuhaus, R., Guckelberger, O., Puhl, G., Seehofer, D., and Neuhaus, P. (2013). Twenty-Year Longitudinal Follow-Up After Orthotopic Liver Transplantation: A Single-Center Experience of 313 Consecutive Cases. *Am. J. Transplant.* 13, 2384–2394. doi:10.1111/ajt.12384.

Watt, K. D. S., Pedersen, R. A., Kremers, W. K., Heimbach, J. K., and Charlton, M. R. (2010). Evolution of Causes and Risk Factors for Mortality Post-Liver Transplant: Results of the NIDDK Long-Term Follow-Up Study. *Am. J. Transplant.* 10, 1420–1427. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03126.x.

## Parte II. Introduzione precoce degli inibitori del mTOR e riduzione degli inibitori della calcineurina nel trapianto di fegato de novo

### **Riassunto**

*Introduzione:* Non ci sono studi prospettici randomizzati che analizzano la sicurezza e l'efficacia dell'introduzione precoce di Everolimus nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato.

*Metodi:* Abbiamo coordinato uno studio clinico spontaneo, di fase 2, multicentrico (7 centri), randomizzato, in aperto (EPOCAL). *Criteri di inclusione:* trapianto *de novo* di fegato, funzione del trapianto accettabile in giornata post-operatoria (POD) 7, tempo di ischemia fredda < 12 ore. I pazienti sono stati randomizzati in POD 7 in due bracci con un rapporto di 2:1, il gruppo di studio (con introduzione di Everolimus in POD 8 e riduzione / svezzamento di Tacrolimus), e un gruppo di controllo (immunosoppressione convenzionale). *End-point primario:* Incidenza di rigetto acuto confermato da biopsia, morte e perdita del trapianto nei primi 3 mesi dopo il trapianto. *End-point secondari:* funzione renale, sospensione di Tacrolimus, incidenza di eventi avversi. Dimensione del campione calcolato: 117 pazienti valutabili all'*end-point* primario.

*Risultati:* 139 pazienti sono stati arruolati nello studio, 92 nel gruppo di studio e 47 nel gruppo di controllo. Non abbiamo trovato alcuna differenza significativa tra i due gruppi all'arruolamento. L'*end-point* primario nel gruppo di studio è stato raggiunto: rigetto acuto confermato da biopsia inferiore a 25 % (meno del 14 % nel gruppo di studio) ( $p < 0,05$ ). Lo svezzamento di tacrolimus entro 1 mese è stato raggiunto nel 14 % dei casi. La funzione renale a 3 mesi era significativamente migliore nel gruppo di studio ( $p < 0,05$ ).

*Conclusioni:* Si dimostra la sicurezza e l'efficacia di un protocollo immunosoppressivo con minimizzazione degli inibitori della calcineurina (tacrolimus), e l'introduzione precoce di everolimus dopo il trapianto di fegato.

### **Abstract**

*Introduction:* There are no prospective randomized trials analysing safety and efficacy of early introduction of Everolimus in patients undergoing liver transplantation (LT).

*Methods:* We coordinated a spontaneous, phase 2, multicenter (7 centers), randomized, open label, clinical trial (EPOCAL). *Inclusion criteria:* first liver transplantation, acceptable graft function in postoperative day (POD) 7, cold ischemia time < 12 hours. Patients were randomized in POD 7 in two possible arms using a 2:1 ratio, the study group (with Everolimus introduction in POD 8 and Tacrolimus reduction/weaning), and a control group (conventional immunosuppression). *Primary endpoint:* incidence of biopsy-proven acute rejection and graft loss in the first 3 months after LT. *Secondary end-points:* renal function, suspension of Tacrolimus, incidence of adverse events. *Calculated sample size:* 117 patients evaluable for the primary endpoint.

*Results:* 139 patients were enrolled, 94 in the study group and 47 in control group. We did not find any significant difference between the two groups at enrollment. The primary endpoint in the study group has been attained: biopsy-proven acute rejection under 25 % (under 14 % in study group) ( $p < 0.05$ ). The number of adverse events was also comparable between the two groups. The weaning of tacrolimus within 1 month was successful in 43 % of cases. Renal function at 3 months was significantly better in the study group ( $p < 0,05$ ).

*Conclusions:* We show efficacy and safety of an immunosuppressive protocol with minimization of calcineurin inhibitor (tacrolimus) and early introduction of everolimus after liver transplantation.

## Sommario del Capitolo

Parte II. Introduzione precoce degli inibitori del mTOR e riduzione degli inibitori della calcineurina nel trapianto di fegato de novo.....	69
Introduzione.....	73
1. Inibitori della calcineurina.....	74
2. Gli inibitori del mTOR.....	76
3. Rapalogs.....	78
B. Metodi.....	83
1. Obiettivi e disegno dello studio.....	83
2. End-point.....	84
3. Criteri di inclusione ed esclusione.....	85
4. Terapia immunosoppressiva.....	89
a) Primi sette giorni dopo il trapianto:.....	89
b) Dopo la randomizzazione:.....	90
Gruppo di studio (braccio A).....	90
Gruppo di controllo (braccio B).....	92
c) Profilassi anti-cytomegalovirus (CMV).....	92
d) Altre terapie concomitanti.....	92
5. Farmaci proibiti.....	93
6. Analisi Statistica.....	93
a) Dimensione del gruppo di studio.....	93
b) Dimensione del gruppo di controllo.....	94
c) Piano di analisi dei dati.....	95
C. Risultati.....	97
1. Baseline.....	97
2. End-point primario.....	99
3. Immunosoppressione.....	99
4. Comorbilità.....	102
D. Discussione.....	107
E. Conclusioni.....	117
F. Bibliografia.....	118

## Indice delle Figure (Capitolo)

Figura 16: Struttura chimica di (A) Everolimus, (B) Sirolimus.....	79
Figura 17: Livelli plasmatici degli immunosoppressori (A) Everolimus e (B) Tacrolimus.....	100
Figura 18: Rigetti confermati da biopsia (BPAR) entro 3 mesi, confronto gruppo di studio vs. controllo.....	101
Figura 19: Rigetti nel gruppo di studio, confronto normo- vs. pauci-immunosoppresso.....	102
Figura 20: Rigetti entro 3 mesi, confronto gruppo di studio normo-immunosoppresso vs. controllo.....	102
Figura 21: Clearance della creatinina, confronto gruppo di studio vs. controllo.....	103
Figura 22: Clearance a 3 mesi, confronto tra normo- e pauci-immunosoppressi.....	104
Figura 23: Livelli plasmatici di colesterolo, confronto gruppo di studio vs. controllo.....	106

## Indice delle Tabelle (Capitolo)

Tabella 13: Riepilogo delle differenze farmacocinetiche tra Everolimus e Sirolimus.....	80
Tabella 14: Riassunto delle cause di uscita del paziente dallo studio, (A) gruppo di studio, (B) gruppo di controllo.....	97
Tabella 15: Confronto dei valori alla baseline per i pazienti delle due bracci dello studio....	98
Tabella 16: Eventi avversi entro 3 mesi, confronto gruppo di studio vs. controllo.....	105



## **Introduzione**

Il trapianto di organo solido è oggi una procedura ampiamente applicata e rappresenta l'opzione terapeutica di prima scelta per molti malati. L'idea di poter sostituire organi non più funzionanti affascina l'uomo da molto tempo. Tuttavia solo nel corso del XX secolo si comprende che i limiti del successo del trapianto non sono tanto quelli tecnici legati alla chirurgia. I primi tentativi di trapianti tra individui diversi, detti allogeni, riescono dal punto di vista chirurgico, ma falliscono dopo poco tempo a causa di meccanismi ancora ignoti all'epoca. Questi insuccessi sono all'origine di nuove ricerche fondamentali nelle scienze immunologiche.

Il trapianto di fegato illustra perfettamente questa progressione tecnico-scientifica: il primo trapianto epatico nell'uomo venne eseguito da Thomas Starzl a Denver, negli Stati Uniti nel 1963. Tuttavia i riceventi sopravvivono pochi giorni al trapianto.

La svolta accade qualche anno dopo, sempre nel gruppo di Thomas Starzl con l'introduzione nel post-operatorio di una terapia immunosoppressiva combinata, con l'uso di azatioprina, prednisone e globulina antilinfocitaria eterologa (ALG) (Starzl et al., 1968), ispirata dai lavori di Roy Calne e Joseph Murray sulla 6-mercaptopurina, ed un suo derivato: l'azatioprina.

Nel 1967 riescono ad opera di T. Starzl i primi trapianti di fegato umano con sopravvivenza prolungata, successi ottenuti con il notevole contributo di Carl Groth, chirurgo responsabile della gestione del regime post-trapianto. Segue nel 1968 il primo trapianto epatico umano a lunga sopravvivenza in Europa ad opera di Sir Roy Calne (Calne et al., 1968).

Nonostante i grandi progressi dal punto di vista sia chirurgico che farmacologico, il rigetto continua ad essere il più grande ostacolo da sormontare. Il miglioramento degli aspetti tecnici dell'atto operatorio, della comprensione del sistema immunitario e degli eventi che costituiscono il rigetto davano soltanto un beneficio marginale alla sopravvivenza dei trapiantati.

Alla fine degli anni '70, con l'introduzione della Ciclosporina e poi del Tacrolimus, i trapianti d'organo passano da terapia sperimentale a applicazione clinica riconosciuta (National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: liver transplantation--June 20-23, 1983, 1984).

### **1. Inibitori della calcineurina**

Con l'accrescimento delle conoscenze dei meccanismi fisiologici e cellulari del rigetto sono aumentati gli strumenti clinici a disposizione, partendo dall'irradiazione completa del primo trapianto renale si è passati agli steroidi ed agli inibitori della calcineurina (CNI), Ciclosporina prima e successivamente il Tacrolimus.

Queste sostanze bloccano la trascrizione dei geni delle citochine nei linfociti T, previa interazione con una proteina citoplasmatica nota come ciclofilina A con la formazione di un complesso che inibisce la calcineurina.

La Ciclosporina e Tacrolimus rappresentano ancora i principali agenti terapeutici impiegati per bloccare il rigetto di trapianto allogenico, tanto da essere considerati lo standard nella terapia immunosoppressiva trapiantologica. Purtroppo il loro uso protratto è associato ad una significativa frequenza di effetti collaterali quali neurotossicità (Bechstein, 2000), aumentato rischio cardiovascolare, sviluppo di diabete mellito post-trapianto (Marchetti, 2005) e in particolare nefrotossicità sia per la ciclosporina (Farnsworth et al., 1984; Klintmalm et al., 1984; Palestine et al., 1986), che per il Tacrolimus (Randhawa et al., 1993; Starzl et al., 1990).

Al delicato equilibrio della terapia immunosoppressiva, che cerca di bilanciare il beneficio di un nuovo organo trapiantato funzionante con la necessità di controllare il rigetto del medesimo, si devono inoltre considerare gli effetti collaterali derivati dall'uso cronico di queste terapie.

Per affrontare queste difficoltà nate dal grande successo del trapianto, la ricerca si focalizza su nuovi schemi immunosoppressivi che permettano di ridurre o addirittura sospendere completamente il ricorso ai CNI per salvaguardare la funzione renale. Gli ultimi vent'anni hanno visto

l'introduzione di nuove molecole, tra cui la Rapamicina e l'Acido Micofenolico, in grado di modulare la risposta immunitaria con meccanismi d'azione diversi.

## **2. Gli inibitori del mTOR**

Una delle importanti scoperte in campo immunologico, è la classe degli inibitori del mTOR, anche noti come inibitori di segnale di proliferazione (PSI).

Il principale esponente di questo gruppo è la Rapamicina, sostanza che da il nome a questa classe di farmaci. La Rapamicina (nota anche come Sirolimus), è un macrolide di origine naturale presente nel fungo *Streptomyces hygroscopicus* che si associa a una proteina di un complesso di trasduzione di segnali implicati in particolare nella regolazione del ciclo cellulare. Il bersaglio di questa molecola viene chiamato mTOR da mammalian Target of Rapamycin (i.e. bersaglio della rapamicina nei mammiferi) o FK binding protein-12 (FKBP12) una proteina associata al pathway della rapamicina (Brown et al., 1994).

La grande proteina chinasi intracellulare mTOR è parte integrante di una via regolatrice prioritaria per vari processi biologici che sono essenziali per la proliferazione cellulare, l'angiogenesi e il metabolismo cellulare (Sarbasov et al., 2005). La via del mTOR è un punto di convergenza intracellulare di numerose vie di segnalazione cellulare. mTOR svolge la sua funzione di regolazione in risposta a

segnali di attivazione o inibizione trasmessi attraverso queste vie. Poiché la via del mTOR integra numerosi segnali originati da vari meccanismi di regolazione, gli interventi su questa specifica via possono modificare gli effetti a valle di sistemi molto diversi.

La rapamicina, originariamente nota per le sue proprietà antimicotiche (Sehgal et al., 1975), è stata rapidamente riconosciuta per le sue caratteristiche come immunosoppressore (Martel et al., 1977) e per le sue proprietà antiproliferative (Sehgal, 1998).

Fu noto sin dall'inizio che i meccanismi d'azione degli inibitori del mTOR differivano dai già noti CNI. L'interesse per questi farmaci nel contesto dei trapianti di organo risulta da studi sugli animali che dimostrano una nefrotossicità molto bassa o assente sia nel ratto (DiJoseph et al., 1992, 1994; Whiting et al., 1991), sia nei topi (Di Joseph and Sehgal, 1993), nei conigli (Fryer et al., 1993), nei maiali (Almond et al., 1993; Granger et al., 1995), nei cani (Calne et al., 1989), che nei primati non-umani (Collier et al., 1991; Ikonen et al., 2000; Montgomery et al., 2002; Morris, 1992).

La maggior parte degli studi sulla Rapamicina e sugli altri inibitori del mTOR sono basati su trapianti allogenici di rene, che presentano alcune importanti differenze, rispetto al trapianto epatico, da sottolineare. Innanzitutto, i trapiantati di fegato richiedono una minore immunosoppressione. Questo

ha delle conseguenze dirette sugli effetti a lungo termine delle terapie, poiché i livelli sistemici dei farmaci sono meno elevati nei trapiantati di fegato.

Inoltre, a differenza di quanto avviene nei trapianti di reni (Hariharan et al., 2000), il rigetto cellulare nel trapianto di fegato sembra non avere un impatto negativo sulla funzionalità epatica, né sulla sopravvivenza del organo, né su quella del paziente nel lungo termine (Wiesner et al., 1998). Pertanto, il rigetto può non essere il metro migliore per la valutazione clinica dell'efficacia dell'immunosoppressione nel trapianto di fegato. Ovvero, il trapianto epatico ha un certo margine di tolleranza per quanto riguarda il rigetto cellulare.

La gestione di un regime immunosoppressivo che cerchi di minimizzare gli effetti secondari di questa terapia cronica è di particolare rilievo nei trapianti di fegato, dove circa il 60 % dei trapiantati sopravvive oltre 10 anni dopo il trapianto (Adam et al., 2012). Paradossalmente, con il miglioramento delle prospettive di sopravvivenza si ha un aumento proporzionale dei rischi di sviluppare complicazioni mediche croniche provocate dall'esposizione continua e prolungata alle terapie che consentono questo miglioramento.

### **3. Rapalogs**

La rapamicina è un prodotto naturale complesso con proprietà biologiche di grande interesse clinico, ma che presenta delle proprietà fisico-chimiche che rendono più complicata la

formulazione galenica per la somministrazione orale. Di fatto, nella maggior parte dei lavori inizialmente pubblicati per dimostrare l'effetto immunosoppressivo in vivo della Rapamicina, il farmaco è stato somministrato per via parenterale (Granger et al., 1995).

Per ovviare a queste limitazioni sono state sviluppate delle molecole derivate, dette Rapalog (i.e. *rapamicine analogues*, analoghi della Rapamicina,) che hanno come caratteristica di avere lo stesso meccanismo d'azione, ma con variazioni nelle proprietà fisicochimiche o farmacocinetiche.

Uno di questi rapalog è la SDZ-RAD, noto comunemente come Everolimus. Si tratta di un derivato che è stato sviluppato nel tentativo di avere una migliore biodisponibilità orale rispetto alla molecola originale.

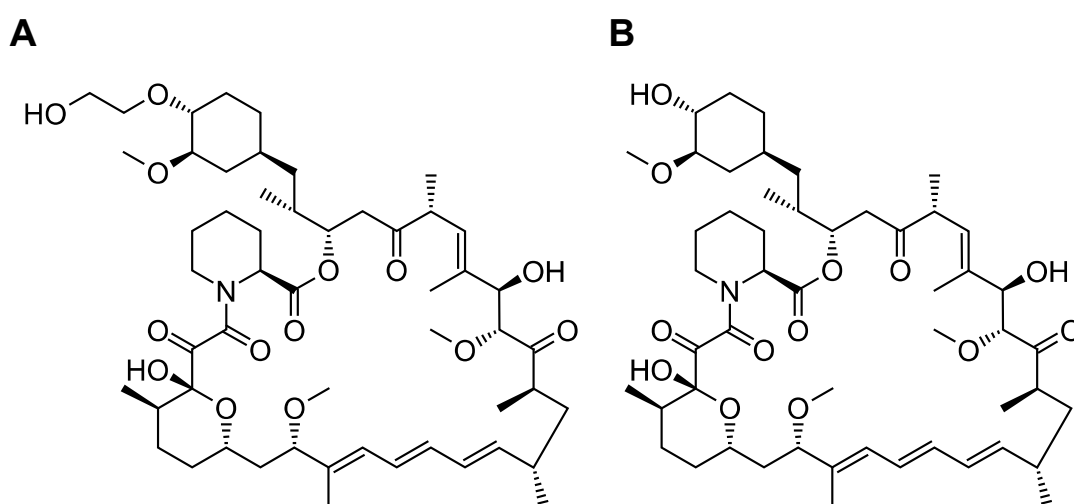


Figura 16: Struttura chimica di (A) Everolimus, (B) Sirolimus

Fonte dell'immagine <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Everolimus.svg> &

<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Sirolimus.svg>

CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)

Parametri farmacocinetici	Everolimus	Rapamicina
Emivita di eliminazione (ore)	28	62
Biodisponibilità relativa (%)	20	14
Tempo per concentrazione massima (ore)	1-2	1-2
Tempo di raggiungimento dello stato di stabilità	4	5-7
Frequenza di somministrazione	2 volte/die	1 volta/die

Tabella 13: Riepilogo delle differenze farmacocinetiche tra Everolimus e Sirolimus

(Kirchner et al., 2004; Mahalati and Kahan, 2001)

Questo derivato della rapamicina, in cui è stato introdotto un gruppo 2-idrossietile in posizione 40 (40-O-(idrossietil)-rapamicina), ha un potente effetto antiproliferativo e immunosoppressivo (Sedrani et al., 1998), raggiunge una concentrazione massima entro due ore dall'assunzione ma ha un'emivita di  $28 \pm 7$  ore (Neumayer et al., 1999) ha quindi una più rapida *clearance* e necessita pertanto di una somministrazione bi-giornaliera. ha quindi una più rapida *clearance* e necessita pertanto di una somministrazione bi-giornaliera. La concentrazione ottimale è raggiunta in 4 giorni (Kahan et al., 1999) rispetto ai 7 giorni della rapamicina.

Everolimus, come Sirolimus, si lega in modo reversibile alla proteina citoplasmatica mTOR per generare un complesso clinicamente attivo che inibisce un enzima chiave nella sintesi proteica arrestando il ciclo cellulare nella fase G1 tardiva (Sarbasov et al., 2005). È stato dimostrato in vitro che l'affinità di legame di everolimus al mTOR è circa 3 volte più debole di quella di sirolimus. Questa perdita di affinità è attribuita alla O-alchilazione della molecola di sirolimus nel

C40. In vivo, tuttavia, everolimus ha dimostrato di avere la stessa attività biologica di sirolimus (Schuler et al., 1997).

Everolimus ha dimostrato la capacità di ridurre la frequenza della nefropatia cronica del trapianto, che può portare a grandi benefici a lungo termine in pazienti sottoposti a trapianto cardiaco e renale. Inoltre è stato impiegato in protocolli di minimizzazione ed eliminazione dell'uso degli inibitori della calcineurina, dimostrandosi una sicura ed efficace alternativa a questi farmaci, con un conseguente miglioramento della funzione renale nel tempo. Sembra emergere che l'uso di everolimus associato alla minimizzazione degli inibitori della calcineurina può consentire a lungo termine una migliore sopravvivenza del trapianto renale e limitare la tossicità renale osservata nella popolazione con trapianto non renale (Gabardi and Baroletti, 2010).

La capacità d'inibire la crescita e la proliferazione cellulare ha suggerito l'uso di questo farmaco nel trattamento e la prevenzione delle neoplasie post-trapianto (Gomez-Camarero et al., 2007), diventate un problema rilevante dopo il trapianto di organo, poiché correlate principalmente ad un aumento della sopravvivenza dei pazienti immunodepressi (Dantal and Soulillou, 2005; Hojo et al., 1999; Maluccio et al., 2003).

Il profilo farmacologico e lo specifico meccanismo d'azione di everolimus che lo differenzia sia dai CNI (tacrolimus, ciclosporina) sia dagli inibitori della sintesi del DNA (acido

micofenolico e azatioprina) risultano, essere particolarmente interessanti nel trapianto di fegato. In particolare, le proprietà antiproliferative di everolimus e la possibilità di ridurre drasticamente la dose di CNI o addirittura di eliminarli, potrebbero consentire anche di allargare gli obiettivi terapeutici per gestire altre problematiche, oltre la prevenzione del rigetto acuto, quali: la recidiva di epatocarcinoma, le neoplasie, soprattutto cutanee, la tossicità da CNI. Everolimus consentirebbe perciò al clinico di ampliare la possibilità di personalizzare le terapie immunosoppressive, in considerazione degli obiettivi terapeutici sopraindicati.

## **B. Metodi**

### **1. Obiettivi e disegno dello studio**

È stata valutata la fattibilità e l'efficacia dell'uso di Everolimus introdotto precocemente nella minimizzazione ed eventuale sospensione di CNi tramite uno studio prospettico, multicentrico, controllato, randomizzato (gruppo di studio *vs.* gruppo di controllo), spontaneo, di Fase II su pazienti adulti sottoposti a trapianto *de novo* di fegato.

Hanno partecipato allo studio 7 centri italiani di trapianto di fegato coordinati dal Centro Trapianti di Fegato di Padova, che opera presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova.

Lo studio è cominciato a marzo 2010 e si è concluso ad agosto 2012 con l'arruolamento di 139 pazienti randomizzati nella settima giornata post-trapianto in due gruppi: gruppo di studio (A) e gruppo di controllo (B) con un rapporto rispettivamente di 2:1.

Per garantire l'uniformità nella distribuzione nei due gruppi si era proceduto a una randomizzazione a blocchi. Per limitare il rischio di distorsione nel tempo i pazienti sono stati attribuiti ai loro gruppi per lotti di 30. All'interno di ciascun lotto sono stati randomizzati i pazienti sia al braccio di studio o a quello di controllo, mantenendo la proporzione 2:1.

Il numero dei pazienti randomizzati è andato oltre i 117 necessari per l'analisi statistica. Questa estensione dell'arruolamento, prevista dal protocollo, è servita a garantire la numerosità di pazienti a tre mesi stabilita da protocollo. L'estensione è servita a compensare il previsto abbandono dello studio da parte dei pazienti per decisione volontaria del soggetto, per violazione al protocollo o per decisione dello sperimentatore sulla base delle condizioni cliniche.

Lo studio è attualmente in corso e terminerà ad agosto 2014 con la conclusione del periodo di *follow-up* dei pazienti della durata di 24 mesi.

## **2. End-point**

L'*end-point* primario è il tasso di fallimento di efficacia composto dalla proporzione di pazienti con episodi di rigetto confermato da biopsia (dall'inglese *biopsy-proven acute rejection* BPAR) con necessità di terapia corticosteroidea fino al terzo mese dal trapianto, a cui si aggiungono l'incidenza di perdita dell'organo trapiantato o morte del paziente nei primi 3 mesi dal trapianto e l'incidenza dei pazienti in monoterapia con everolimus a 30 giorni dal trapianto.

Gli endpoint secondari sono:

- la valutazione della funzionalità renale a 1, 3, 6, 12, e 24 mesi attraverso lo studio della clearance della creatinina in accordo al *Modification of Diet in Renal*

*Disease (MDRD) Study equation (80–20 ml/min)*  
(Levey et al., 1999);

- la necessità di trattamenti di dialisi;
- gli eventi avversi: guarigione delle ferite, depressione midollare, iperlipidemia, proteinuria, diabete mellito, diagnosi di ipertensione, infezioni, livelli del virus HCV.

### **3. Criteri di inclusione ed esclusione**

I principali criteri di inclusione sono:

- Pazienti che siano stati sottoposti al momento del trapianto e fino al momento dell'arruolamento (7° giorno post operatorio) al seguente schema immunosoppressivo:
  - Somministrazione di steroidi: 500 mg ev. (i.o. alla riperfusione) seguiti da 20 mg/die dal primo giorno post operatorio .
  - Somministrazione di anticorpi monoclonali anti-IL2R (prima dose al giorno 0, seconda dose al 4° giorno post-operatorio; Basiliximab 20 mg)
  - Somministrazione di Tacrolimus a partire tra le 48 e le 72 ore dalla riperfusione dell'organo con livelli target tra 8 e 12 ng/ml
- Pazienti di sesso maschile o femminile, di ogni razza, con età uguale o compresa tra 18 e 70 anni

- Pazienti sottoposti a trapianto di fegato de novo da donatore cadavere con fegato intero o emifegato (*split liver*) e con trapianto vitale al momento della randomizzazione
- Pazienti in grado di comunicare adeguatamente con i responsabili dello studio, di capire e di rispondere alle esigenze del protocollo; consenso scritto
- Tempo di ischemia fredda minore di 12 ore

I criteri di esclusione sono:

- Alterazioni fisiche o di laboratorio o disturbi psichici entro 2 settimane prima della randomizzazione tali che, nell'opinione dello sperimentatore, possano interferire con la partecipazione allo studio
- Donne in gravidanza (test positivo all'hCG con valori > 5 mIU/ml) o in allattamento
- Donne potenzialmente fertili, con le seguenti eccezioni:
  - donne in stato menopausale (amenorrea spontanea da almeno 12 mesi, amenorrea spontanea da almeno 6 mesi con livelli FSH > 40 mIU/ml, ooforectomia bilaterale chirurgica da almeno 6 settimane con o senza isterectomia)
  - donne che fanno uso di uno o più metodi contraccettivi affidabili ed approvati per tutta la

durata dello studio e per i tre mesi successivi all'interruzione del trattamento in studio.

- Pazienti che siano sottoposti a trapianto multiviscerale o trapianto di insule pancreatiche, o che siano stati precedentemente sottoposti a trapianto d'organo o di tessuto.
- Pazienti che vengano sottoposti a trapianto combinato fegato-rene
- Pazienti che vengano sottoposti a trapianto di fegato da donatore vivente
- Pazienti che vengano sottoposti a trapianto di fegato ABO-incompatibile.
- Pazienti che vengano sottoposti a trapianto da donatori positivi per gli antigeni di superficie HBV
- Storia di patologia neoplastica in qualsiasi sede nei 3 anni precedenti all'arruolamento, indipendentemente che vi sia evidenza o meno di recidiva o metastasi. (ad eccezione di neoplasie cutanee non metastatiche, come basalioma o carcinoma squamoso della cute, o epatocarcinoma- HCC).
- Pazienti che ricevano altri farmaci sperimentali entro 4 settimane prima del tempo basale o che siano attualmente arruolati in altri studi clinici

- Pazienti con dimostrata ipersensibilità al farmaco (o a farmaci simili ad EVL, v.g. macrolidi) o alla classe farmaceutica o ad eccipienti. Inoltre quando vi siano franche controindicazioni alla assunzione dello stesso
- Storia di patologia neoplastica in qualsiasi sede nei 3 anni precedenti all'arruolamento, indipendentemente che vi sia evidenza o meno di recidiva o metastasi (ad eccezione di neoplasie cutanee non metastatiche, come basalioma o carcinoma squamoso della cute, o epatocarcinoma- HCC).
- Anamnesi di coagulopatia o presenza di qualsiasi condizione medica che richieda una terapia anticoagulante a lungo termine dopo trapianto (è ammesso il trattamento con ASA a basso dosaggio)
- Conta piastrinica  $\leq 40.000/\text{mm}^3$  o conta dei globuli bianchi  $\leq 2000/\text{mm}^3$  emoglobina  $\leq 7 \text{ g/dl}$  al momento della randomizzazione
- Severe infezioni sistemiche
- Ipercolesterolemia  $> 350 \text{ mg/dl}$  o ipertrigliceridemia grave  $> 500 \text{ mg/dl}$  al momento della randomizzazione. Possono essere inclusi anche pazienti con iperlipemia compensata.
- Epatite Fulminante

#### **4. Terapia immunosoppressiva**

##### **a) *Primi sette giorni dopo il trapianto:***

La terapia immunosoppressiva pre-randomizzazione era la stessa per entrambi i gruppi e prevedeva l'assunzione di tacrolimus al dosaggio iniziale di 0.03 mg/kg/die a partire da 48–72 ore dopo la riperfusione con livelli bersaglio di 6–12 ng/ml nella prima settimana postoperatoria.

Inoltre è stata somministrata una terapia induttiva con anticorpi monoclonali anti-IL2R (prima dose di Basiliximab 20 mg al giorno del trapianto al termine dell'intervento e la seconda dose al quarto giorno post-operatorio).

Per protocollo, ai pazienti di entrambi i gruppi, è stata somministrata una prima dose intraoperatoria di steroidi di 500 mg per via endovenosa, seguita da una dose giornaliera di 20 mg, endovenosa o orale, a partire dalla prima giornata post operatoria. Era previsto lo svezzamento entro i tre mesi dal trapianto.

Il rigetto acuto è stato trattato con boli steroidei di 1 g al giorno per tre giorni. Nei casi di rigetto steroideo-resistente i pazienti sono usciti dallo studio ed sono stato trattato secondo i protocolli del Centro d'appartenenza.

**b) Dopo la randomizzazione:**

**Gruppo di studio (braccio A).**

La somministrazione di everolimus è stata iniziata entro le 24 ore dal momento della randomizzazione alla dose iniziale di 3 mg/die, suddivisa in due assunzioni giornaliere (1,5+1,5 mg) in associazione alla somministrazione di Tacrolimus e steroidi. Il trattamento immunosoppressivo sperimentale con everolimus è stato fornito sotto forma di compresse per somministrazione orale (o attraverso sondino naso-gastrico) da 0.25, 0.5 e 0.75 mg o sospensione orale. Il primo dosaggio del *trough level* è stato eseguito al 7° giorno dall'inizio della terapia.

Sono stati eseguiti aggiustamenti della dose a intervalli variabili in relazione ai livelli ematici, alla tollerabilità, alla risposta individuale, al cambiamento dei farmaci somministrati in associazione e al quadro clinico, al fine di ottenere un adeguato *trough level* compreso tra 6 e 12 ng/ml nei pazienti che raggiungeranno la monoterapia.

Dopo il raggiungimento del *trough level* di everolimus superiore a 5 ng/ml (target definitivo 6–12 ng/ml), il protocollo prevedeva il progressivo svezzamento da Tacrolimus (portandone i livelli ematici < 5 ng/ml) con definitiva sospensione di TAC entro 30 giorni dal trapianto quando possibile.

Nel caso in cui si fosse presentata la necessità (adeguamento del *trough level*, tossicità midollare, insufficiente copertura immunosoppressiva, rigetto acuto (BPAR) resistente a terapia steroidea,) per protocollo venivano accettate due deviazioni.

1. È stata prevista la possibilità di sospendere la somministrazione di Everolimus, fino ad un massimo di 7 giorni consecutivi, in presenza di significativi eventi avversi attribuiti a Everolimus (es. trombocitopenia, bassi livelli di emoglobina o leucociti, ipercolesterolemia o ipertrigliceridemia.). Nel caso di sospensione definitiva o di un periodo superiore a 7 giorni il paziente usciva dallo studio e veniva considerato come drop-out.
2. Inoltre era possibile modulare la somministrazione di Everolimus mantenendo Tacrolimus in associazione a basso dosaggio (*trough level* < 5 ng/ml), in caso di evidente insufficiente copertura immunosoppressiva (rigetto acuto confermato da biopsia resistente alla terapia steroidea o quando non si fosse raggiunto il *trough level* di 8 ng/dl entro 20 giorni dal trapianto) o, ancora, in caso di eventi avversi che suggerissero la necessità di mantenere bassi livelli di Everolimus.

I pazienti in terapia con Everolimus e Tacrolimus a basso livello a 30 giorni dal trapianto sono stati mantenuti nello

studio e sono stati considerati in un sottogruppo di analisi stratificata.

### **Gruppo di controllo (braccio B)**

I pazienti randomizzati nel gruppo B hanno ricevuto Tacrolimus in associazione alla terapia steroidea. Il dosaggio di questo farmaco, suddiviso in due dosi al dì, è stato aggiustato cercando di ottenere un *trough level* compreso tra 6–12 ng/ml nel primo mese post trapianto e di 4–8 ng/ml successivamente.

#### **c) Profilassi anti-cytomegalovirus (CMV)**

La profilassi del CMV era obbligatoria in tutti i casi in cui il donatore era positivo per il CMV e il ricevente negativo. Era ammesso il trattamento con ganciclovir, globulina iperimmune o valganciclovir, secondo la prassi del centro trapianti. Era accettata anche una profilassi in base al protocollo terapeutico previsto dal centro trapianti per tutti gli altri casi.

#### **d) Altre terapie concomitanti**

Per protocollo non dovevano essere somministrati altri farmaci oltre a quelli previsti dal protocollo e la terapia normalmente assunta dal paziente, fatta eccezione il trattamento di infezioni, episodi di rigetto, iperlipemia o altri eventi avversi.

Non era permessa la somministrazione di altri immunosoppressori oltre a quelli specificati dal protocollo. Il loro utilizzo, considerato deviazione al protocollo, ha determinato l'uscita del paziente dallo studio.

I pazienti HBV-positivi arruolati (anticorpo-antiCore) hanno ricevuto la profilassi passiva con immunoglobuline specifiche anti-HBV secondo politica di Centro.

## **5. Farmaci proibiti**

Farmaci come ketoconazolo, itraconazolo, fluconazolo, terfenadina, astemizolo e cisapride erano proibiti per i pazienti del gruppo di studio.

## **6. Analisi Statistica**

### **a) Dimensione del gruppo di studio**

Lo studio è stato disegnato come un classico studio di fase II con le seguenti assunzioni:

- Il *cut-off* di non efficacia del trattamento è stato stabilito essere  $\leq$  al 60 %,
- il *cut-off* di efficacia è invece stato stabilito ad una risposta  $\geq$  75 %.

Quindi le ipotesi di interesse sono  $H_0: r \leq 60\%$  versus  $H_A: r \geq 75\%$ , dove  $r$  è la proporzione di pazienti che sono liberi da episodi di rigetto acuto confermato da biopsia con

necessità di terapia corticosteroidea fino al terzo mese dal trapianto.

L'errore di I tipo ( $\alpha$ , probabilità di accettare un trattamento non efficace: falso positivo) è fissato al 5 %.

L'errore di II tipo ( $\beta$ , probabilità di escludere un trattamento efficace: falso negativo) è fissato al 20 %.

In base a queste assunzioni, sono necessari 78 pazienti per il gruppo di studio (A). La valutazione dell'efficacia del trattamento è basata sul numero di pazienti liberi da rigetto acuto confermato da biopsia con necessità di terapia corticosteroidea a 3 mesi dall'inizio dello studio: se questo numero risulta

- minore di 62, dimostra che il trattamento non è efficace;
- maggiore o uguale a 62, dimostra che il trattamento è sufficientemente efficace.

I pazienti persi al *follow-up* entro i primi 3 mesi dall'inizio dello studio sono stati sostituiti in modo da raggiungere un numero minimo di 78 pazienti valutabili a 3 mesi per il braccio di studio.

#### **b) Dimensione del gruppo di controllo**

La dimensione del gruppo di controllo (B) era equivalente alla metà del gruppo di studio e quindi composto da 39 pazienti. Con tale numerosità si riesce a stimare un *cut-off* di efficacia stabilito ad una risposta  $\geq 75$  % con una precisione di  $\pm 14$  %.

Il gruppo di controllo non riveste alcun ruolo nella determinazione dell'efficacia del trattamento nel gruppo di studio. Esso serve esclusivamente come gruppo di riferimento.

**c) Piano di analisi dei dati**

Le caratteristiche basali dei pazienti (gruppo A e B) sono espresse mediante media  $\pm$  deviazione standard (DS) o mediana (range) a seconda delle esigenze descrittive per le variabili continue, e come frequenze (%) per le variabili categoriche-nominali. Il test del chi-quadrato ( $\chi^2$ ), il test esatto di Fisher (ove richiesto dalla scarsa numerosità) e la regressione logistica sono stati utilizzati dove appropriato per i confronti tra gruppi.

I risultati ottenuti dal confronto tra i due gruppi (A vs. B) non possono in ogni caso essere considerati conclusivi (visto che la numerosità campionaria è stata calcolata come per uno studio non randomizzato) ma suggestivi unicamente per il disegno di un eventuale studio di fase 3.

La lunghezza del *follow-up* e la sopravvivenza sono espressi come mediana (range). Le curve di sopravvivenza del paziente e dell'organo trapiantato sono state costruite con il metodo di Kaplan-Meier e confrontate con il test Log rank. L'analisi univariata è stata realizzata utilizzando il modello dei rischi proporzionali di Cox. Le variabili che sono risultate significative all'analisi univariata ( $p < 0,1$ ), sono state inserite

in un modello multivariato di Cox. La significatività statistica è posta con  $P < 0,05$ .

### C. Risultati

In questa analisi ad interim, effettuata sui dati estratti a gennaio 2014, prendiamo in considerazione i dati fino alla visita a 3 mesi, per andare valutare l'*end-point* primario.

Per questo studio sono stati arruolati 139 pazienti, 92 nel braccio di studio di studio (A) e 47 in quello di controllo (B) .

I pazienti usciti dallo studio prima di raggiungere i 3 mesi dal trapianto sono 20, 16 del gruppo di studio e 4 in quello di controllo. La maggior parte dei soggetti hanno terminato prematuramente lo studio per eventi avversi o violazione al protocollo, come sintetizzato in Tabella 14 (vedasi sotto). Vi è stato un solo decesso e 2 perdite dell'organo donato, una per ciascun braccio.

Braccio	A	B	totale
<b>Totale usciti a 3 mesi</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>20</b>
Evento Avverso	7	2	9
Decesso	1	0	1
Perdita del graft	1	1	2
Param. di laboratorio anormali	2	0	2
Violazione di protocollo	4	1	5
Persi al follow-up	1	0	1

Tabella 14: Riassunto delle cause di uscita del paziente dallo studio, (A) gruppo di studio, (B) gruppo di controllo

#### 1. Baseline

Dall'analisi dei dati è risultato che le caratteristiche dei pazienti al trapianto, non presentavano differenze significative, come riportato in Tabella 15 (vedasi sotto.)

VARIABLES	Study group (N=92)	Control group (N=47)	P value
Age (years)	56 (49–62)	58 (51–63)	0.2113
Sex (female)	17 (18 %)	7 (15 %)	0.6444
Body Mass Index	26 (24–29)	25 (23/28)	0.5116
Main indication to LT			
<i>Viral</i>	18(20 %)	10 (21 %)	
<i>Alcohol</i>	15 (16 %)	10 (21 %)	0.7471
<i>HCC</i>	44 (48 %)	23 (49 %)	
<i>Altro</i>	15 (16 %)	4 (9 %)	
HCV positive	36 (41 %)/4 NA	11 (28 %)/7 NA	0.1693
HBV positive	16 (18 %)/5 NA	10 (24 %)/ 5NA	0.4130
Biochemistry			
<i>Hb</i>	107 (91–123)	116 (97–130)	0.1659
<i>Plt</i>	74 (53–104)	72 (46–95)	0.2022
<i>glucose</i>	104 (88–128)	103 (88–120)	0.7975
<i>creatinine</i>	0.90 (0.75–1.14)	0.90 (0.77–1.19)	0.2503
<i>albumine</i>	33 (29–38)	35 (32–39)	0.1242
<i>total bilirubin</i>	2.10 (1.19–5.38)	2.29 (1.12–4.30)	0.6472
<i>INR</i>	1.37(1.21–1.56)	1.38 (1.22–1.67)	0.1437
MDRD	84.31 (65.92–104.41)	73.92 (61.08–101.86)	0.2565
CPT score	8 (6–10)	8 (6–10)	0.2590
MELD score	15 (10–20)	18 (11–22)	0.4942
Donor Age (years)	56 (49–63)	58 (51–63)	0.2113
Donor Sex (female)	40 (43 %)	15 (32 %)	0.2024
Donor Traumatic cause of death	27 (29 %)	8 (17 %)	0.4024
Donor Anti HBc positive	15 (16 %)	4 (9 %)	0.2974
Cold ischemia time (minutes)	479 (421–535)	472 (437–520)	0.3592

*Tabella 15: Confronto dei valori alla baseline per i pazienti delle due bracci dello studio*

I due gruppi erano omogenei sia per l'indicazione all'intervento sia per età, sesso e per principali parametri di laboratorio, rispecchiando le caratteristiche generali della popolazione trapiantata italiana. Non presentavano considerabili differenze neanche la funzione epatica e quella renale. Da notare che la funzione renale dei pazienti al trapianto era generalmente buona (circa 80 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) in entrambi i gruppi.

Non c'erano differenze significative tra i due gruppi neanche per quanto riguarda le caratteristiche del donatore, il quale aveva una media di circa 56 anni per entrambi i gruppi. Non

sono state rilevate diversità neanche per il tempo di ischemia fredda a cui è stato sottoposto l'organo donato.

## **2. *End-point* primario**

Sono stati contati 14 rigetti acuti confermati da biopsia con necessità di terapia corticosteroidea BPAR Entro i 3 mesi dal trapianto nel gruppo di studio e 2 nel gruppo di controllo, con una percentuale di 14 % e 2 % rispettivamente. Questi valori indicano che la proporzione di pazienti del gruppo di studio che erano liberi da episodi di rigetto fino al terzo mese dal trapianto era di 86 %.

Emerge da questi risultati che l'*end-point* primario, definito come l'incidenza di rigetti acuti confermati da biopsia e trattati con steroidi inferiore al 25 % a 3 mesi dal trapianto nel braccio di studio, è stato raggiunto.

L'incidenza di pazienti in monoterapia con everolimus a 30 giorni dal trapianto era di 4 % (11/80 pazienti). Tale incidenza sale notevolmente alla visita a 3 mesi dal trapianto con 44 % (35/80) di pazienti svezzati da Tacrolimus.

A 3 mesi erano 4 i rigetti nei pazienti in monoterapia (11 %) e 7 nel gruppo in duplice terapia (16 %).

## **3. Immunosoppressione**

L'adozione di una monoterapia entro 3 mesi non rappresentava tuttavia un fattore di rischio poiché i rigetti nei

pazienti in monoterapia erano solo 4 (11 %) mentre erano 7 nel gruppo in duplice terapia (17 %)  $p=0.42$  (Figura 20).

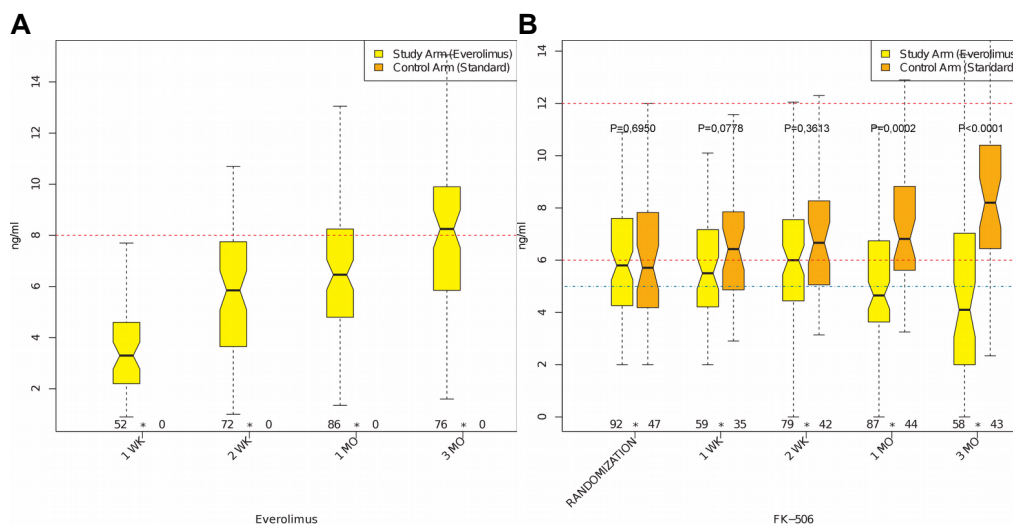


Figura 17: Livelli plasmatici degli immunosoppressori (A) Everolimus e (B) Tacrolimus

Venti pazienti del gruppo di studio (25%) hanno minimizzato il Tacrolimus prima di raggiungere i livelli target di Everolimus e hanno avuto di conseguenza un'insufficiente immunosoppressione. Possiamo quindi suddividere la popolazione del gruppo di studio in 2 gruppi: 60 pazienti normo-immunosoppressi (75 %), 20 pazienti pauci-immunosoppressi (pazienti con insufficiente immunosoppressione) (25 %).

Se analizziamo la distribuzione dei rigetti in questi sottogruppi notiamo che solo 5 rigetti (8 %) sono avvenuti nel primo gruppo mentre 6 (30 %) sono avvenuti nel secondo ( $p=0,024$ ).

È importante indicare che l'incidenza di rigetti nel gruppo normo-immunosoppresso non era significativamente

maggiore a quella del gruppo di controllo (vedasi Figura 20). Questi risultati sembrano suggerire che Everolimus in monoterapia, anche ad un mese dal trapianto, se mantenuto a livelli plasmatici tra 6 e 12 ng/ml, ha efficacia e sicurezza comparabili alla monoterapia con Tacrolimus mantenuto a livelli plasmatici compresi tra 6 e 12 ng/ml.

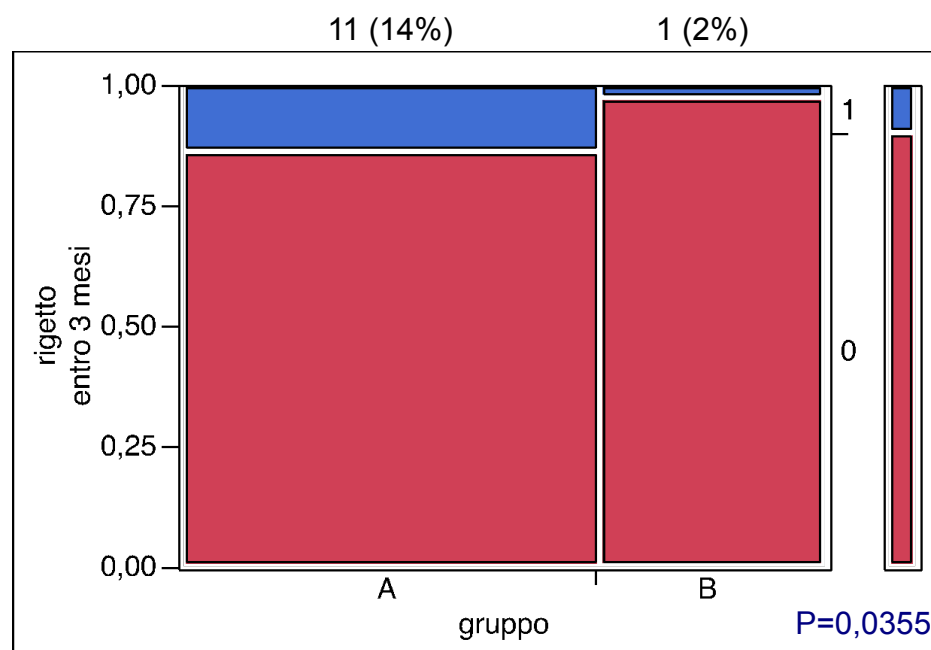


Figura 18: Rigetti confermati da biopsia (BPAR) entro 3 mesi, confronto gruppo di studio vs. controllo

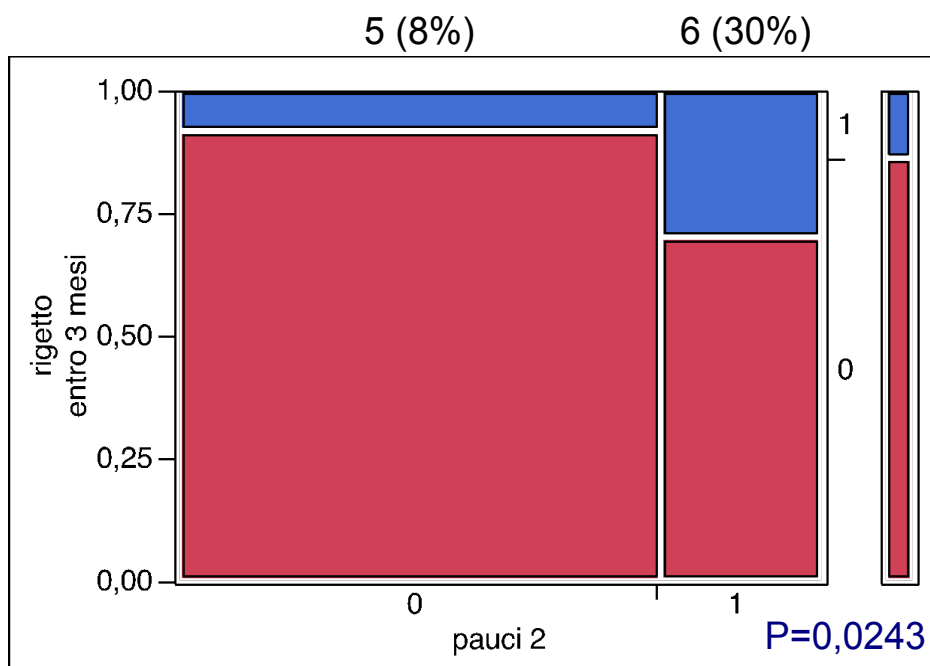


Figura 19: Rigetti nel gruppo di studio, confronto normo- vs. pauci-immunosoppresso

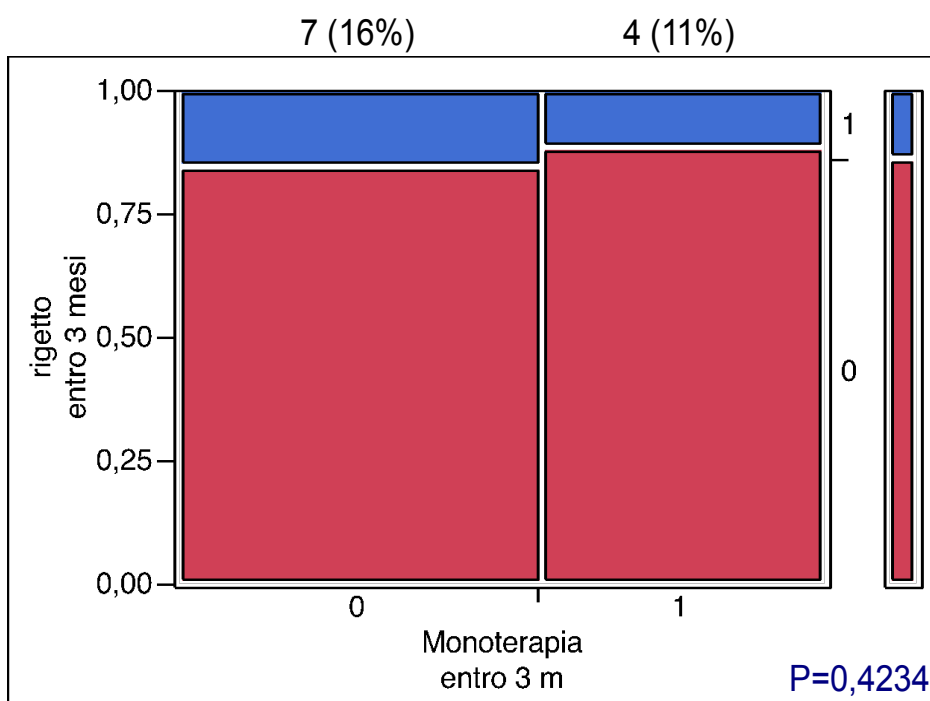


Figura 20: Rigetti entro 3 mesi, confronto gruppo di studio normo-immunosoppresso vs. controllo

#### 4. Comorbilità

Per valutare la funzione renale, è stata calcolata la clearance della creatinina mediante la formula MDRD *Modification of*

*Diet In Renal Disease* (Levey et al., 1999). Da notare che il tasso di filtrazione glomerulare, già generalmente buono prima del trapianto si mantiene tale per entrambi i gruppi, anche se si nota una lieve tendenza al peggioramento a 3 mesi nel braccio di controllo che merita di essere osservata nel tempo e porta a supporre un effetto protettivo sulla renale del regime immunosoppressivo del gruppo di studio, in linea con quanto già riportato in letteratura (Figura 21.)

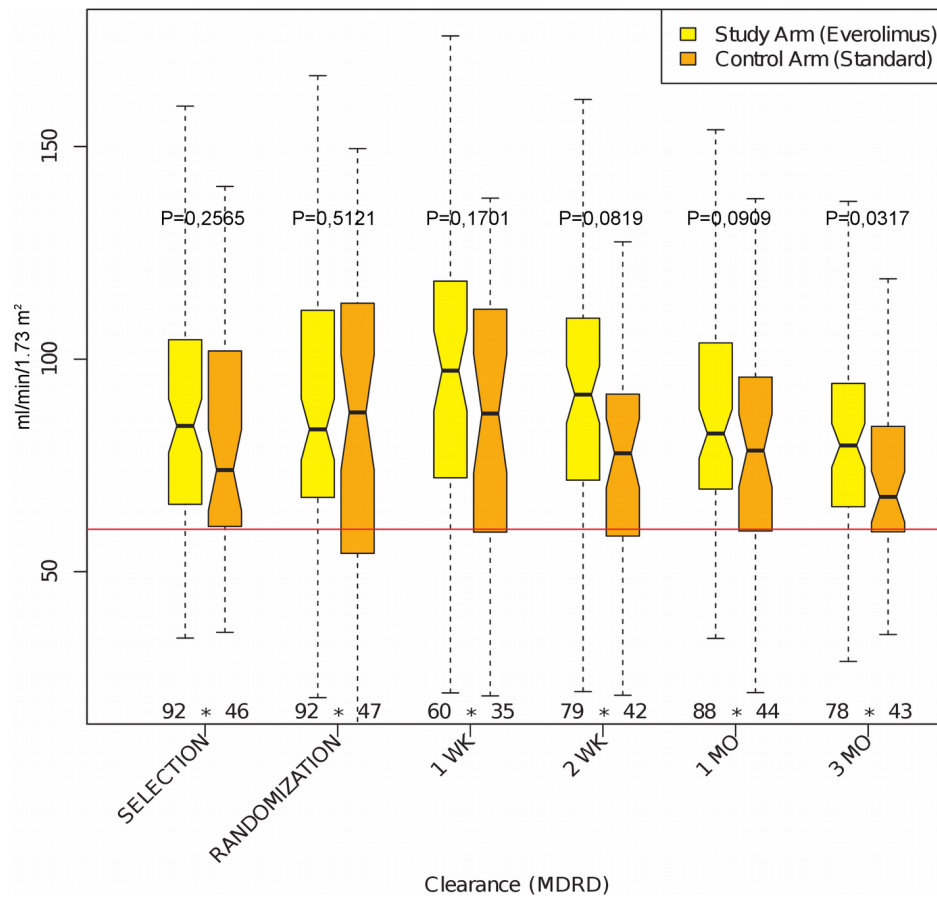


Figura 21: Clearance della creatinina, confronto gruppo di studio vs. controllo

Inoltre, abbiamo valutato la funzione renale nei due sottogruppi del braccio di studio e non è stata notata alcuna

differenza tra i normo-immunosoppressi rispetto ai pauci-immunosoppressi (vedasi Figura 21, sopra.)

Dai dati relativi agli eventi avversi, descritti in Tabella 16 (vedasi sotto,) si è osservata già a tre mesi dal trapianto una differenza significativa tra i due gruppi nella cicatrizzazione della ferita con 16% di casi nel braccio di studio a fronte di 5 % nel controllo ( $p < 0,1$ ). Si sono anche verificati due casi di formazione di laparocele nel gruppo di studio, ma la valutazione di questa complicanza, generalmente di comparsa più tardiva, potrà essere analizzata solo alla luce dei dati futuri.

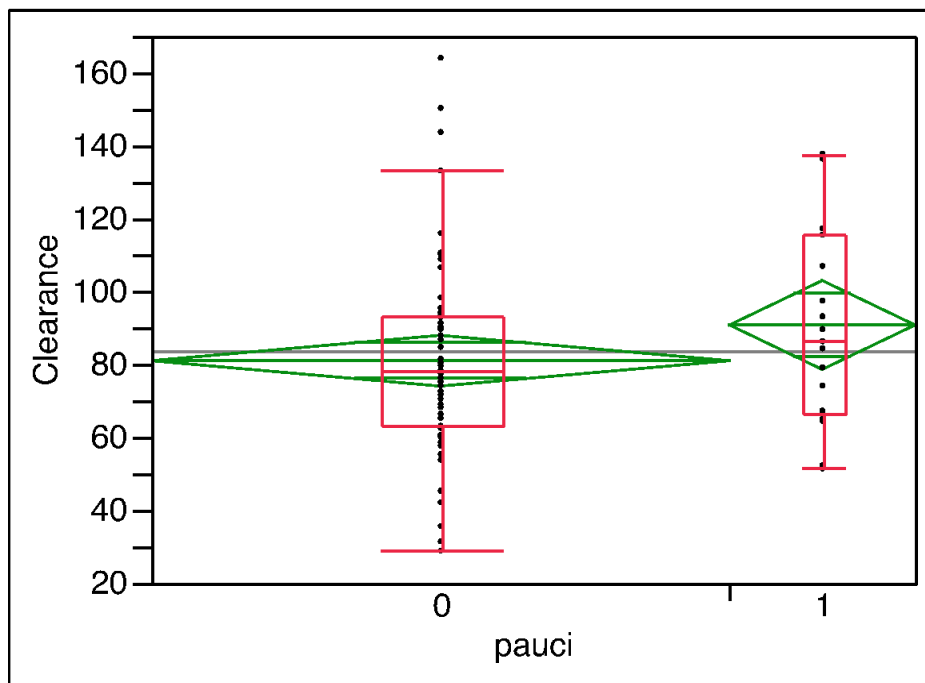


Figura 22: Clearance a 3 mesi, confronto tra normo- e pauci-immunosoppressi

Eventi Avversi	Gruppo di Studio	Gruppo di controllo
	(n=80)	(n=43)
Deiscenza ferita§	13 (16 %)	2 (5 %)
Laparocele	2(3 %)	0
Infezioni	22 (28 %)	16 (37 %)
Complicanze vascolari	3(4 %)	3 (4 %)
Complicanze biliari	10 (13 %)	5(12 %)
Recidiva HCC	0	1 (2 %)
Recidiva HCV	6 (8 %)	3 (7 %)
IRA	7 (9 %)	5(12 %)
Proteinuria	7 (9 %)	1 (2 %)
Piastrinopenia	7 (9 %)	4 (9 %)
Chirurgia	0	2 (5 %)
Cardiologiche	14 (18 %)	7 (16 %)
Ipertensione	14 (18 %)	7 (16 %)
Neurologiche§	13 (16 %)	13 (30 %)
Edemi arti inferiori	4 (5 %)	2 (5 %)
Diabete	11(14 %)	5(12 %)
Dislipidemia*	17(21 %)	3 (7 %)
Rigetto acuto (biopsia)*	14 (18 %)	2 (5 %)
Altro	26(33 %)	13 (30 %)

*Tabella 16: Eventi avversi entro 3 mesi, confronto gruppo di studio vs. controllo*

§ P<0,1 ; \* P<0,05

Sono emerse differenze anche nel tasso di dislipidemia con un aumento dei casi nel gruppo di studio rispetto a quello di controllo con 21 % contro 7 % rispettivamente ( $p < 0,05$ ). In particolare nella Figura 23 (vedasi sotto) viene illustrato come i livelli plasmatici del colesterolo siano significativamente maggiori nel gruppo di studio rispetto al braccio di controllo, e la differenza si accentui con il passare del tempo ( $p < 0,0001$  a 3 mesi).

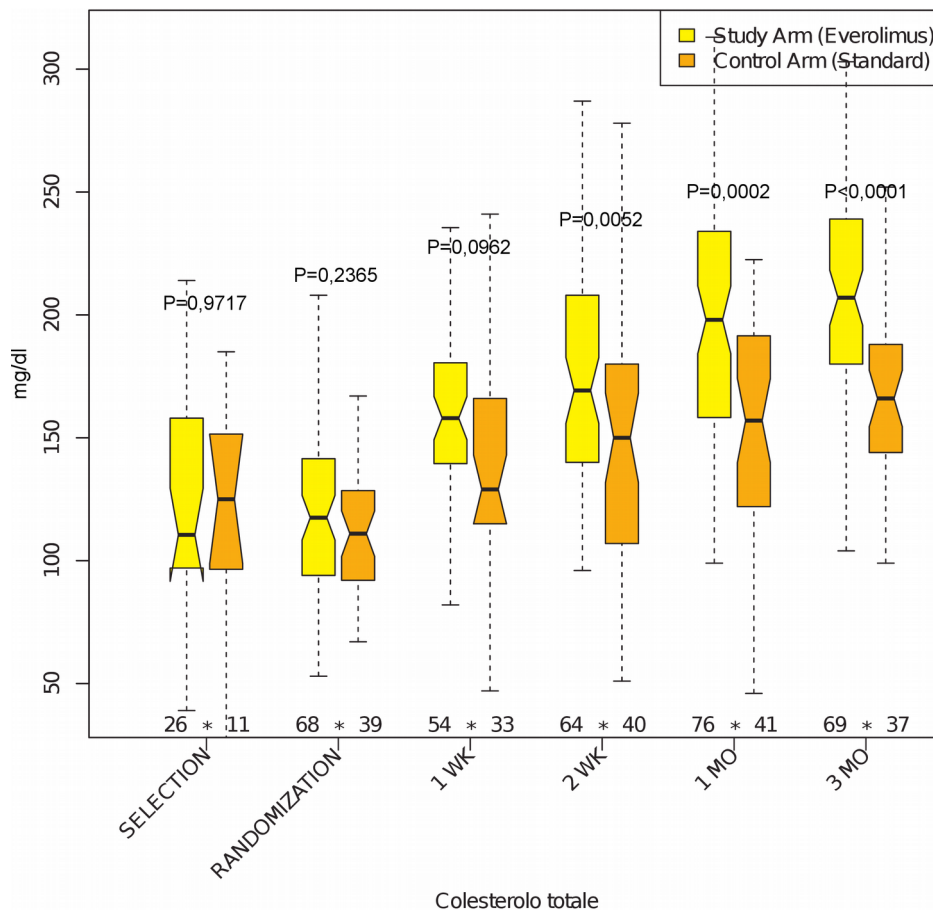


Figura 23: Livelli plasmatici di colesterolo, confronto gruppo di studio vs. controllo

Si è notata anche una diminuzione significativa dei problemi di ordine neurologico nel braccio di studio rispetto al controllo con un tasso di 16 % contro 30 % ( $p < 0,1$ ). Non sono state rilevate esserci altre differenze significative tra i due gruppi a tre mesi dal tapping in quanto a insorgenza di diabete, ipertensione, infezioni, recidiva virale o di epatocarcinoma, proteinuria, piastrinopenia, edemi agli arti inferiori, problemi cardiologici e complicanze vascolari, biliari o chirurgiche.

#### **D. *Discussione***

Dal primo trapianto di fegato ad oggi il progressivo perfezionamento delle tecniche chirurgiche, della preservazione degli organi, della gestione delle complicanze e i miglioramenti nella gestione della terapia immunosoppressiva hanno aumentato notevolmente la sopravvivenza del paziente e dell'organo trapiantato, tanto da spostare la criticità di questo trattamento dal rigetto acuto alle patologie derivate dall'uso cronico degli immunosoppressori.

Infatti nonostante gli ottimi risultati conseguiti, gli inibitori della calcineurina principalmente impiegati per l'immunosoppressione causano l'insorgenza di complicanze a breve e lungo termine quali diabete, dislipidemia, ipertensione arteriosa, osteoporosi e soprattutto una elevata incidenza di nefrotossicità che possono compromettere la qualità e la sopravvivenza dei pazienti sottoposti a trapianto di fegato (Moreno and Berenguer, 2006).

La disfunzione renale post trapianto spesso è legata all'uso degli inibitori della calcineurina (Gonwa et al., 2001; Morard et al., 2006), e la sua insorgenza già evidente entro i 6 mesi dopo il trapianto epatico (Kim et al., 2006) dimostra chiaramente l'importanza di un intervento precoce e proattivo per migliorare o addirittura prevenire l'insorgere della malattia renale cronica (Masetti et al., 2010).

La possibilità di utilizzare un regime immunosoppressivo a dosi ridotte di ciclosporina associata ad everolimus, con efficacia nella prevenzione del rigetto acuto e miglioramento della funzionalità renale, era già stata esplorata in alcuni studi in pazienti sottoposti a trapianto renale o epatico. Questi studi hanno dimostrato che l'uso di everolimus associato a dosi ridotte di ciclosporina consente la conservazione della funzione renale senza perdita di efficacia rispetto ad un regime a dose piena di ciclosporina (Levy et al., 2006; Nashan et al., 2004).

Quasi tutti i dati clinici disponibili in letteratura sull'utilizzo di Everolimus nella terapia immunosoppressiva sono relativi al trapianto di rene, in ragione del fatto che l'indicazione iniziale era limitata trapianto di reni e solo successivamente è stata estesa anche al trapianto di cuore e poi al fegato, sia per le caratteristiche intrinseche di quest'ultimo.

Vi sono importanti differenze tra i trapianti di rene e fegato da tenere in considerazione nell'analizzare l'outcome del trapianto epatico. Le peculiari interazioni immunologiche del fegato dovute alla sua anatomia gli conferiscono una maggiore tolleranza e accettazione degli allotrapianti rispetto al rene e ne consegue la necessità di minore immunosoppressione. Questo si può tradurre nella possibilità di insorgenza di minori effetti collaterali in confronto ai trapianti renali (Calne et al., 1969; Kern et al., 2010; Sanchez

et al., 2005). Inoltre diversamente da quanto accade nei trapianti renali, il rigetto cellulare acuto non ha un impatto a lungo termine sulla funzione epatica, né sulla sopravvivenza dell'organo o del paziente (Wiesner et al., 1998).

A partire dalle evidenze relative al sirolimus e alla sua similarità con everolimus, è stato ipotizzato il suo impiego come terapia immunosoppressiva di prima scelta da intraprendere nella fase precoce dopo trapianto di fegato (0–3 mesi) per la prevenzione delle complicanze a lungo termine (disfunzione renale cronica, neoplasie, recidiva di HCC).

L'efficacia e la sicurezza della conversione della terapia basata su inibitori della calcineurina a everolimus in monoterapia o associato alla minimizzazione del tacrolimus sono state confermate da alcuni studi (Saliba et al., 2011; De Simone et al., 2009a) Negli stessi studi vi sono evidenze del miglioramento della funzione renale con il passaggio alla monoterapia senza inibitori della calcineurina. Tuttavia, questa differenza sembra non essere significativa nel caso in cui la conversione sia avvenuta tardivamente quando ormai si era già instaurata la disfunzione renale (De Simone et al., 2009b).

Per questa ragione ha visto la luce il primo studio sull'introduzione precoce—al 10° giorno post trapianto—di everolimus nel trapianto epatico (Masetti et al., 2010). Questo

studio ha evidenziato che l'interruzione precoce degli inibitori della calcineurina consente un netto miglioramento della funzionalità renale e una riduzione del rischio di sviluppare un'insufficienza renale cronica. Inoltre ha provato che everolimus in monoterapia a partire dal 30° giorno post-trapianto epatico garantisce una immunosoppressione adeguata e non inferiore a quella ottenibile con Ciclosporina.

Un altro studio, servito per la registrazione dell'indicazione di everolimus nel trapianto di fegato, ha evidenziato che il trattamento con everolimus in combinazione con tacrolimus a bassa esposizione è efficace e ben tollerato e ha portato un miglioramento della funzionalità renale (De Simone et al., 2013). I risultati del nostro studio relativi alla sicurezza dell'introduzione precoce di everolimus a 7 giorni dal trapianto, sono consistenti con quanto riportato in letteratura. In particolare, l'*end-point* primario, definito come l'incidenza di rigetti acuti inferiore al 25 % a 3 mesi dal trapianto nel braccio di studio, è stato raggiunto.

Da questo studio si evince una maggiore incidenza di rigetti nel gruppo di studio rispetto al gruppo di controllo, risultato già osservato nello studio di De Simone (De Simone et al., 2012). Tuttavia l'adozione di una monoterapia entro 3 mesi non rappresenta tuttavia un fattore di rischio poiché i rigetti nei pazienti in monoterapia hanno un'incidenza del tutto paragonabile a quella dei pazienti duplice terapia.

Questi risultati sembrano confermare che Everolimus in monoterapia, anche ad un mese dal trapianto, se mantenuto a livelli plasmatici tra 6 e 12 ng/ml ha efficacia e sicurezza comparabili alla monoterapia con CNI, mantenuto a livelli plasmatici compresi tra 6 e 12 ng/ml (Masetti et al., 2010).

Per quanto riguarda la funzione renale, anche se a tre mesi dal trapianto non si possono ancora fare valutazioni sugli effetti a lungo termine sulla funzionalità renale, analizzando i dati ottenuti dal calcolo della *clearance* della creatinina si può notare già a tre mesi una differenza significativa tra il gruppo in terapia con everolimus rispetto al gruppo di controllo ( $p < 0,03$  a 3 mesi). Si nota un leggero ma significativo degrado a 3 mesi nel braccio di controllo che merita di essere seguito nel tempo, e porta a supporre un effetto protettivo sulla renale del regime immunosoppressivo del gruppo di studio, in linea con quanto già riportato in letteratura (Masetti et al., 2010; Saliba et al., 2013).

Uno degli aspetti critici nell'introduzione precoce di everolimus nel post trapianto riguarda il rischio di complicanze della ferita chirurgica che sono state descritte con l'uso di sirolimus, in particolare la non corretta cicatrizzazione (Dean et al., 2004; Pascual et al., 2010). Dalle osservazioni riportate in letteratura su questo argomento, è ancora poco chiaro se questa categoria di farmaci sia all'origine di problemi di guarigione della ferita chirurgica,

dal momento che sono presenti dati contrastanti, che riportano come non significativa l'incidenza di questo tipo di complicanze (Fischer et al., 2012; De Simone et al., 2012).

Nel nostro studio abbiamo documentato un'incidenza marginalmente maggiore ( $p < 0,1$ ) di problemi di cicatrizzazione, che hanno comportato principalmente un aumento dei casi di deiscenza di ferita nel braccio di studio.

Anche l'aumento dei livelli plasmatici di trigliceridi e colesterolo associati alla terapia con everolimus, riportato in letteratura (Casanovas et al., 2011; Saliba et al., 2011) è stato confermato dalla nostra esperienza almeno nei primi 3 mesi di studio.

L'everolimus potrebbe inoltre essere impiegato specificamente per gestire situazioni problematiche che insorgono durante la fase di mantenimento e presenti in una elevata proporzione di pazienti quali: le recidive di HCC, le neoplasie post-trapianto, l'insufficienza renale. L'inibizione dell'mTOR è cruciale, infatti, per contrastare queste complicanze, soprattutto quelle causate da un uso prolungato di CNI come tossicità renale, neoplasie, disfunzioni metaboliche e neurotossicità.

I risultati ottenuti dal nostro studio a questo riguardo sembrano andare in questa direzione. Una conferma è la diminuzione dell'insorgenza di problemi neurologici nei pazienti del gruppo di studio rispetto nel braccio di controllo,

evidente già nel primo periodo post trapianto momento critico per questo tipo di complicazioni. Per valutare l'effetto sulle altre problematiche si dovranno attendere i dati alla fine dello studio.

L'azione potenzialmente antineoplastica del recettore per la rapamicina (mTOR) si basa principalmente sul fatto che mTOR è coinvolto nel meccanismo di controllo del ciclo cellulare. Quando attivato, esso promuove la progressione del ciclo cellulare, l'attivazione e la proliferazione dei linfociti T e B, la formazione di anticorpi, la produzione e la proliferazione di cellule non immunitarie (Luan et al., 2003).

L'effetto di everolimus non si limita alle cellule T. Esso inibisce, in generale, la proliferazione, stimolata dai fattori di crescita, delle cellule ematopoietiche e non-ematopoietiche, quali le cellule muscolari lisce vascolari. La proliferazione delle cellule muscolari lisce dei vasi, indotta da danno endoteliale, riveste un ruolo chiave nella patogenesi del rigetto cronico (Schuler et al., 1997).

Attraverso l'inibizione di mTOR, vengono bloccati importanti meccanismi che partecipano alla formazione di fattori di crescita che mediano anche la proliferazione tumorale (Yuan et al., 2009). Inoltre gli inibitori della rapamicina provvedono a ridurre la espressione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (in inglese *vascular endothelial growth factor* VEGF) e del fattore di crescita trasformante (dall'inglese

*transforming growth factor* TGF), normalmente riconosciuti come agenti che favoriscono la neoangiogenesi tumorale (Guba et al., 2002).

Queste caratteristiche di everolimus vengono utilizzate nella terapia oncologica di vari tipi di cancro (Lebwohl et al., 2013) e nel trattamento e per la prevenzione nei pazienti trapiantati (Gomez-Camarero et al., 2007) della ricorrenza di epatocarcinoma o altre neoplasie, che sono diventate un importante causa di morte nel trapianto di fegato (Dantal and Soulillou, 2005; Hojo et al., 1999; Maluccio et al., 2003). Il miglioramento nella gestione globale dei pazienti sottoposti a trapianto di fegato e una maggiore sopravvivenza a lungo termine hanno sottolineato l'importanza delle comorbilità durante il *follow-up*, alcune delle quali strettamente legate alla terapia immunosoppressiva, in particolare proprio la ricorrenza o la comparsa *de novo* di HCC o di altre neoplasie.

Sebbene sia generalmente assunto che il rigetto dell'allotrapianto, indistintamente dalla sua gravità, debba essere prevenuto con l'uso di immunosoppressori, ci sono dati che mostrano che la sopravvivenza dell'organo o del paziente non è diversa tra i pazienti che hanno sperimentato rigetto acuto precoce, indipendentemente dalla sua severità, e quelli che non l'hanno avuto (Neuberger and Adams, 1998; Wiesner et al., 1998). Alcuni studi sulla sospensione dell'immunosoppressione hanno suggerito che circa il 20 %

di pazienti selezionati può sospendere tutti i farmaci immunosoppressivi.

Non si è ancora capito meccanismo di tolleranza, sebbene siano stati proposti alcuni modelli (Lerut and Sanchez-Fueyo, 2006). Altri risultati indicano che la percentuale di adulti trapiantati di fegato che possa interrompere farmaci immunosoppressori è superiore a quanto precedentemente stimato, particolarmente nei pazienti selezionati non-HCV e non-autoimmuni in cui la sospensione del farmaco viene eseguito dopo un lungo periodo di tempo dopo il trapianto (circa 10 anni). In questo gruppo di riceventi lo svezzamento dai farmaci immunosoppressori è una procedura sicura se eseguita sotto stretto controllo medico e, almeno durante i primi 3 anni dopo la sospensione del farmaco, non è associata clinicamente a significative alterazioni istologiche dannose. Ulteriori studi prospettici sono ora necessari per confermare se questo approccio sia generalizzabile, per determinare la sua sicurezza ed efficacia rispetto alla manutenzione immunosoppressione, e per affinare e validare biomarcatori precisi di tolleranza (Benítez et al., 2013).

La bassa frequenza della persistenza delle cellule del donatore nella circolazione e nei tessuti dell'ospite (i.e. microchimerismo) è stato proposto come uno dei possibili meccanismi per lo sviluppo della tolleranza, anche se non è sufficiente di per sé a spiegare il fenomeno. Tutte le prove

sperimentali suggeriscono che la tolleranza in cellule T mature sia un processo attivo, che richiede che il sistema immunitario riconosca e risponda agli antigeni (Elwood et al., 1997; Neuberger and Adams, 1998; Starzl et al., 1993).

L'induzione della tolleranza al trapianto donatore-specifica, potrebbe essere la meta futura almeno per una parte della popolazione trapiantata (Claas, 2003; Starzl et al., 2003).

### ***E. Conclusioni***

Dai risultati preliminari del nostro studio e dalle evidenze presentate in letteratura, everolimus sembra essere una valida opzione terapeutica in alternativa o in associazione agli inibitori della calcineurina nella prevenzione del rigetto acuto nei pazienti trapiantati di fegato.

Il trapianto ha raggiunto eccellenti risultati a breve termine, con livelli di sopravvivenza oltre 80 % a 5 anni e la riduzione dell'incidenza di rigetto acuto. Rimane ancora da risolvere il problema del rigetto cronico e della terapia immunosoppressiva a lungo termine associata a severi effetti collaterali come infezioni opportunistiche e aumento dell'incidenza di neoplasie.

Questi problemi sembrano poter essere gestiti almeno in parte con l'utilizzo di everolimus che grazie alle sue caratteristiche antiproliferative e antineoplastiche e ai meno critici effetti collaterali, potrebbe risultare più vantaggioso della attuale terapia standard basata sugli inibitori della calcineurina.

## **F. Bibliografía**

- Adam, R., Karam, V., Delvart, V., O'Grady, J., Mirza, D., Klempnauer, J., Castaing, D., Neuhaus, P., Jamieson, N., Salizzoni, M., et al. (2012). Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J. Hepatol.* 57, 675–688. doi:10.1016/j.jhep.2012.04.015.
- Almond, P. S., Moss, A., Nakhleh, R. E., Melin, M., Chen, S., Salazar, A., Shirabe, K., and Matas, A. J. (1993). Rapamycin: immunosuppression, hyporesponsiveness, and side effects in a porcine renal allograft model. *Transplantation* 56, 275–281.
- Bechstein, W. O. (2000). Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 13, 313–326.
- Benítez, C., Londoño, M.-C., Miquel, R., Manzia, T.-M., Abrales, J. G., Lozano, J.-J., Martínez-Llordella, M., López, M., Angelico, R., Bohne, F., et al. (2013). Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology* 58, 1824–1835. doi:10.1002/hep.26426.
- Brown, E. J., Albers, M. W., Bum Shin, T., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., and Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex. *Nature* 369, 756–758. doi:10.1038/369756a0.
- Calne, R. Y., Collier, D. S., Lim, S., Pollard, S. G., Samaan, A., White, D. J., and Thiru, S. (1989). Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet* 2, 227.
- Calne, R. Y., White, H. J., Binns, R. M., Herbertson, B. M., Millard, P. R., Pena, J., Salaman, J. R., Samuel, J. R., and Davis, D. R. (1969). Immunosuppressive effects of the orthotopically transplanted porcine liver. *Transplant. Proc.* 1, 321–324.
- Calne, R. Y., Williams, R., Dawson, J. L., Ansell, I. D., Evans, D. B., Flute, P. T., Herbertson, P. M., Joysey, V., Keates, G. H. W., Knill-Jones, R. P., et al. (1968). Liver Transplantation in Man—II, a Report of two Orthotopic Liver Transplants in Adult Recipients. *Br. Med. J.* 4, 540.1–546.
- Casanovas, T., Argudo, A., and Peña-Cala, M. C. (2011). Everolimus in Clinical Practice in Long-Term Liver Transplantation: An Observational Study. *Transplant. Proc.* 43, 2216–2219. doi:10.1016/j.transproceed.2011.06.015.
- Claas, F. H. (2003). Towards clinical transplantation tolerance. *The Lancet* 361, 1489–1490. doi:10.1016/S0140-6736(03)13220-5.
- Collier, D. S., Calne, R. Y., Pollard, S. G., Friend, P. J., and Thiru, S. (1991). Rapamycin in experimental renal allografts in primates. *Transplant. Proc.* 23, 2246–2247.
- Dantal, J., and Souillou, J.-P. (2005). Immunosuppressive Drugs and the Risk of Cancer after Organ Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 352, 1371–1373. doi:10.1056/NEJMe058018.
- Dean, P. G., Lund, W. J., Larson, T. S., Prieto, M., Nyberg, S. L., Ishitani, M. B., Kremers, W. K., and Stegall, M. D. (2004). WOUND-HEALING COMPLICATIONS AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION: A PROSPECTIVE, RANDOMIZED COMPARISON OF SIROLIMUS

AND TACROLIMUS1: *Transplantation* 77, 1555–1561.  
doi:10.1097/01.TP.0000123082.31092.53.

DiJoseph, J. F., Mihatsch, M. J., and Sehgal, S. N. (1994). Renal effects of rapamycin in the spontaneously hypertensive rat. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 7, 83–88.

DiJoseph, J. F., Sharma, R. N., and Chang, J. Y. (1992). The effect of rapamycin on kidney function in the Sprague-Dawley rat. *Transplantation* 53, 507–513.

Elwood, E. T., Larsen, C. P., Maurer, D. H., Routenberg, K. L., Neylan, J. F., Whelchel, J. D., O'Brien, D. P., and Pearson, T. C. (1997). Microchimerism and rejection in clinical transplantation. *Lancet* 349, 1358–1360.

Farnsworth, A., Hall, B. M., Duggin, G. G., Horvath, J. S., and Tiller, D. J. (1984). Interstitial fibrosis in renal allografts in patients treated with cyclosporin. *Lancet* 2, 1470–1471.

Fischer, L., Klempnauer, J., Beckebaum, S., Metselaar, H. J., Neuhaus, P., Schemmer, P., Settmacher, U., Heyne, N., Clavien, P.-A., Muehlbacher, F., et al. (2012). A Randomized, Controlled Study to Assess the Conversion From Calcineurin-Inhibitors to Everolimus After Liver Transplantation—PROTECT. *Am. J. Transplant.* 12, 1855–1865.  
doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04049.x.

Fryer, J., Yatscoff, R. W., Pascoe, E. A., and Thliveris, J. (1993). The relationship of blood concentrations of rapamycin and cyclosporine to suppression of allograft rejection in a rabbit heterotopic heart transplant model. *Transplantation* 55, 340–345.

Gabardi, S., and Baroletti, S. A. (2010). Everolimus: A Proliferation Signal Inhibitor with Clinical Applications in Organ Transplantation, Oncology, and Cardiology. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* 30, 1044–1056. doi:10.1592/phco.30.10.1044.

Gomez-Camarero, J., Salcedo, M., Rincon, D., Iacono, O. L., Ripoll, C., Hernando, A., Sanz, C., Clemente, G., and Bañares, R. (2007). Use of Everolimus as a Rescue Immunosuppressive Therapy in Liver Transplant Patients With Neoplasms: *Transplantation* 84, 786–791. doi:10.1097/01.tp.0000280549.93403.dd.

Gonwa, T. A., Mai, M. L., Melton, L. B., Hays, S. R., Goldstein, R. M., Levy, M. F., and Klintmalm, G. B. (2001). End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment. *Transplantation* 72, 1934–1939.

Granger, D. K., Cromwell, J. W., Chen, S. C., Goswitz, J. J., Morrow, D. T., Beierle, F. A., Sehgal, S. N., Canafax, D. M., and Matas, A. J. (1995). Prolongation of renal allograft survival in a large animal model by oral rapamycin monotherapy. *Transplantation* 59, 183–186.

Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C. J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M., et al. (2002). Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat. Med.* 8, 128–135. doi:10.1038/nm0202-128.

Hariharan, S., Johnson, C. P., Bresnahan, B. A., Taranto, S. E., McIntosh, M. J., and Stablein, D. (2000). Improved Graft Survival after Renal Transplantation in the United

States, 1988 to 1996. *N. Engl. J. Med.* 342, 605–612. doi:10.1056/NEJM200003023420901.

Hojo, M., Morimoto, T., Maluccio, M., Asano, T., Morimoto, K., Lagman, M., Shimbo, T., and Suthanthiran, M. (1999). Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 397, 530–534. doi:10.1038/17401.

Ikonen, T. S., Gummert, J. F., Hayase, M., Honda, Y., Hausen, B., Christians, U., Berry, G. J., Yock, P. G., and Morris, R. E. (2000). Sirolimus (rapamycin) halts and reverses progression of allograft vascular disease in non-human primates. *Transplantation* 70, 969–975.

Di Joseph, J. F., and Sehgal, S. N. (1993). Functional and histopathologic effects of rapamycin on mouse kidney. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 15, 45–56. doi:10.3109/08923979309066932.

Kahan, B. D., Wong, R. L., Carter, C., Katz, S. H., Von Fellenberg, J., Van Buren, C. T., and Appel-Dingemanse, S. (1999). A PHASE I STUDY OF A 4-WEEK COURSE OF SDZ-RAD (RAD) IN QUIESCENT CYCLOSPORINE-PREDNISONE-TREATED RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS<sup>1,2</sup>. [Miscellaneous Article]. *Transplant. Oct. 27 1999* 68, 1100–1106.

Kern, M., Popov, A., Kurts, C., Schultze, J. L., and Knolle, P. A. (2010). Taking off the brakes: T cell immunity in the liver. *Trends Immunol.* 31, 311–317. doi:10.1016/j.it.2010.06.001.

Kim, D. Y., Lim, C., Parasuraman, R., Raoufi, M., Yoshida, A., Arenas, J., Denny, J., Malinzak, L., Almarastani, M., Moonka, D., et al. (2006). Renal Disease Burden Following Liver Transplantation. *Transplant. Proc.* 38, 3663–3665. doi:10.1016/j.transproceed.2006.10.054.

Kirchner, D. G. I., Meier-Wiedenbach, I., and Manns, M. P. (2004). Clinical Pharmacokinetics of Everolimus. *Clin. Pharmacokinet.* 43, 83–95. doi:10.2165/00003088-200443020-00002.

Klintmalm, G., Bohman, S. O., Sundelin, B., and Wilczek, H. (1984). Interstitial fibrosis in renal allografts after 12 to 46 months of cyclosporin treatment: beneficial effect of low doses in early post-transplantation period. *Lancet* 2, 950–954.

Lebwohl, D., Anak, O., Sahnoud, T., Klimovsky, J., Elmroth, I., Haas, T., Posluszny, J., Saletan, S., and Berg, W. (2013). Development of everolimus, a novel oral mTOR inhibitor, across a spectrum of diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1291, 14–32. doi:10.1111/nyas.12122.

Lerut, J., and Sanchez-Fueyo, A. (2006). An Appraisal of Tolerance in Liver Transplantation. *Am. J. Transplant.* 6, 1774–1780. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01396.x.

Levey, A. S., Bosch, J. P., Lewis, J. B., Greene, T., Rogers, N., and Roth, D. (1999). A More Accurate Method To Estimate Glomerular Filtration Rate from Serum Creatinine: A New Prediction Equation. *Ann. Intern. Med.* 130, 461–470. doi:10.7326/0003-4819-130-6-199903160-00002.

Levy, G., Grazi, G. L., Sanjuan, F., Wu, Y., Mühlbacher, F., Samuel, D., Friman, S., Jones, R., Cantisani, G., Villamil, F., et al. (2006). 12-month follow-up analysis of a multicenter,

randomized, prospective trial in de novo liver transplant recipients (LIS2T) comparing cyclosporine microemulsion (C2 monitoring) and tacrolimus. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* 12, 1464–1472. doi:10.1002/lt.20802.

Luan, F. L., Ding, R., Sharma, V. K., Chon, W. J., Lagman, M., and Suthanthiran, M. (2003). Rapamycin is an effective inhibitor of human renal cancer metastasis<sup>1</sup>. *Kidney Int.* 63, 917–926. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00805.x.

Mahalati, K., and Kahan, B. D. (2001). Clinical pharmacokinetics of sirolimus. *Clin. Pharmacokinet.* 40, 573–585.

Maluccio, M., Sharma, V., Lagman, M., Vyas, S., Yang, H., Li, B., and Suthanthiran, M. 2 (2003). Tacrolimus enhances transforming growth factor-[beta]1 expression and promotes tumor progression. *Transplant. August 15 2003* 76, 597–602.

Marchetti, P. (2005). New-onset diabetes after liver transplantation: From pathogenesis to management. *Liver Transpl.* 11, 612–620. doi:10.1002/lt.20439.

Martel, R. R., Klicius, J., and Galet, S. (1977). Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55, 48–51.

Masetti, M., Montalti, R., Rompianesi, G., Codeluppi, M., Gerring, R., Romano, A., Begliomini, B., Di Benedetto, F., and Gerunda, G. E. (2010). Early Withdrawal of Calcineurin Inhibitors and Everolimus Monotherapy in de novo Liver Transplant Recipients Preserves Renal Function. *Am. J. Transplant.* 10, 2252–2262. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03128.x.

Montgomery, S. P., Mog, S. R., Xu, H., Tadaki, D. K., Hirshberg, B., Berning, J. D., Leconte, J., Harlan, D. M., Hale, D., and Kirk, A. D. (2002). Efficacy and Toxicity of a Protocol Using Sirolimus, Tacrolimus and Daclizumab in a Nonhuman Primate Renal Allograft Model. *Am. J. Transplant.* 2, 381–385. doi:10.1034/j.1600-6143.2002.20415.x.

Morard, I., Mentha, G., Spahr, L., Majno, P., Hadengue, A., Huber, O., Morel, P., and Giostra, E. (2006). Long-term renal function after liver transplantation is related to calcineurin inhibitors blood levels. *Clin. Transplant.* 20, 96–101. doi:10.1111/j.1399-0012.2005.00447.x.

Moreno, R., and Berenguer, M. (2006). Post-liver transplantation medical complications. *Ann. Hepatol.* 5, 77–85.

Morris, R. E. (1992). Rapamycins: Antifungal, antitumor, antiproliferative, and immunosuppressive macrolides. *Transplant. Rev.* 6, 39–87. doi:10.1016/S0955-470X(10)80014-X.

Nashan, B., Curtis, J., Ponticelli, C., Mourad, G., Jaffe, J., Haas, T., and 156 Study Group (2004). Everolimus and reduced-exposure cyclosporine in de novo renal-transplant recipients: a three-year phase II, randomized, multicenter, open-label study. *Transplantation* 78, 1332–1340.

National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: liver transplantation--June 20-23, 1983 (1984). *Hepatol. Baltim. Md* 4, 107S–110S.

Neuberger, J., and Adams, D. H. (1998). What is the significance of acute liver allograft rejection? *J. Hepatol.* 29, 143–150. doi:10.1016/S0168-8278(98)80190-6.

Neumayer, H.-H., Paradis, K., Korn, A., Jean, C., Fritsche, L., Budde, K., Winkler, M., Kliem, V., Pichlmayr, R., Hauser, I. A., et al. (1999). Entry-into-human study with the novel immunosuppressant SDZ RAD in stable renal transplant recipients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 48, 694–703. doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00085.x.

Palestine, A. G., Austin, H. A., 3rd, Balow, J. E., Antonovych, T. T., Sabnis, S. G., Preuss, H. G., and Nussenblatt, R. B. (1986). Renal histopathologic alterations in patients treated with cyclosporine for uveitis. *N. Engl. J. Med.* 314, 1293–1298. doi:10.1056/NEJM198605153142005.

Pascual, J., del Castillo, D., Cabello, M., Pallardo, L., Grinyo, J. M., Fernandez, A. M., and Brunet, M. (2010). Interaction Between Everolimus and Tacrolimus in Renal Transplant Recipients: A Pharmacokinetic Controlled Trial. [Miscellaneous Article]. *Transplant. April 27 2010* 89, 994–1000. doi:10.1097/TP.0b013e3181ccd7f2.

Randhawa, P. S., Shapiro, R., Jordan, M. L., Starzl, T. E., and Demetris, A. J. (1993). The Histopathological Changes Associated with Allograft Rejection and Drug Toxicity in Renal Transplant Recipients Maintained on FK506. *Am. J. Surg. Pathol.* 17, 60–68.

Saliba, F., Dharancy, S., Lorho, R., Conti, F., Radenne, S., Neau-Cransac, M., Hurtova, M., Hardwigsen, J., Calmus, Y., and Dumortier, J. (2011). Conversion to everolimus in maintenance liver transplant patients: A multicenter, retrospective analysis. *Liver Transpl.* 17, 905–913. doi:10.1002/lt.22292.

Saliba, F., De Simone, P., Nevens, F., De Carlis, L., Metselaar, H. J., Beckebaum, S., Jonas, S., Sudan, D., Fischer, L., Duvoux, C., et al. (2013). Renal Function at Two Years in Liver Transplant Patients Receiving Everolimus: Results of a Randomized, Multicenter Study. *Am. J. Transplant.* 13, 1734–1745. doi:10.1111/ajt.12280.

Sanchez, E. Q., Martin, A. P., Ikegami, T., Uemura, T., Narasimhan, G., Goldstein, R. M., Levy, M. F., Chinnakotla, S., Dawson III, S., Randall, H. B., et al. (2005). Sirolimus Conversion After Liver Transplantation: Improvement in Measured Glomerular Filtration Rate After 2 Years. *Transplant. Proc.* 37, 4416–4423. doi:10.1016/j.transproceed.2005.10.019.

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 596–603. doi:10.1016/j.ceb.2005.09.009.

Schuler, W., Sedrani, R., Cottens, S., Häberlin, B., Schulz, M., Schuurman, H. J., Zenke, G., Zerwes, H. G., and Schreier, M. H. (1997). SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation* 64, 36–42.

Sedrani, R., Cottens, S., Kallen, J., and Schuler, W. (1998). Chemical modification of rapamycin: the discovery of SDZ RAD. *Transplant. Proc.* 30, 2192–2194. doi:10.1016/S0041-1345(98)00587-9.

Sehgal, S. N. (1998). Rapamune® (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin. Biochem.* 31, 335–340. doi:10.1016/S0009-9120(98)00045-9.

Sehgal, S. N., Baker, H., and Vézina, C. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* 28, 727–732.

De Simone, P., Beckebaum, S., Koneru, B., Fung, J., and Saliba, F. (2013). Everolimus With Reduced Tacrolimus in Liver Transplantation. *Am. J. Transplant.* 13, 1373–1374. doi:10.1111/ajt.12215.

De Simone, P., Carrai, P., Precisi, A., Petruccelli, S., Baldoni, L., Balzano, E., Ducci, J., Caneschi, F., Coletti, L., Campani, D., et al. (2009a). Conversion to everolimus monotherapy in maintenance liver transplantation: feasibility, safety, and impact on renal function. *Transpl. Int.* 22, 279–286. doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00768.x.

De Simone, P., Metselaar, H. J., Fischer, L., Dumortier, J., Boudjema, K., Hardwigen, J., Rostaing, L., De Carlis, L., Saliba, F., and Nevens, F. (2009b). Conversion from a calcineurin inhibitor to everolimus therapy in maintenance liver transplant recipients: A prospective, randomized, multicenter trial. *Liver Transpl.* 15, 1262–1269. doi:10.1002/lt.21827.

De Simone, P., Nevens, F., De Carlis, L., Metselaar, H. J., Beckebaum, S., Saliba, F., Jonas, S., Sudan, D., Fung, J., Fischer, L., et al. (2012). Everolimus With Reduced Tacrolimus Improves Renal Function in De Novo Liver Transplant Recipients: A Randomized Controlled Trial. *Am. J. Transplant.* 12, 3008–3020. doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04212.x.

Starzl, T. E., Demetris, A. J., Trucco, M., Murase, N., Ricordi, C., Ildstad, S., Ramos, H., Todo, S., Tzakis, A., Fung, J. J., et al. (1993). Cell Migration and Chimerism After Whole-organ Transplantation: The Basis of Graft Acceptance. *Hepatology. Baltim. Md* 17, 1127–1152.

Starzl, T. E., Fung, J., Jordan, M., Shapiro, R., Tzakis, A., McCauley, J., Johnston, J., Iwaki, Y., Jain, A., Alessiani, M., et al. (1990). Kidney Transplantation Under FK 506. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 264, 63–67.

Starzl, T. E., Groth, C. G., Brettschneider, L., Penn, I., Fulginiti, V. A., Moon, J. B., Blanchard, H., Martin, A. J., and Porter, K. A. (1968). Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann. Surg.* 168, 392–415.

Starzl, T. E., Murase, N., Abu-Elmagd, K., Gray, E. A., Shapiro, R., Eghtesad, B., Corry, R. J., Jordan, M. L., Fontes, P., Gayowski, T., et al. (2003). Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet* 361, 1502–1510.

Whiting, P. H., Adam, B. J., Woo, J., Hasan, N. U., and Thomson, A. W. (1991). The effect of rapamycin on renal function in the rat: a comparative study with cyclosporine. *Toxicol. Lett.* 58, 169–179.

Wiesner, R. H., Demetris, A. J., Belle, S. H., Seaberg, E. C., Lake, J. R., Zetterman, R. K., Everhart, J., and Detre, K. M. (1998). Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Hepatology. Baltim. Md* 28, 638–645. doi:10.1002/hep.510280306.

Yuan, R., Kay, A., Berg, W. J., and Lebwohl, D. (2009). Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* 2, 45. doi:10.1186/1756-8722-2-45.



## Conclusioni Generali

Il trapianto di fegato è una terapia con ottime prospettive di sopravvivenza. Dallo studio presentato emerge il profilo di una coorte di trapiantati di fegato in Italia sostanzialmente paragonabile ai dati europei.

Si osserva come la sicurezza e l'affidabilità del trapianto sono in continuo progresso, con una diminuzione della mortalità post- e peri-operatoria. Tuttavia, i primi 6 mesi nel post-trapianto rimangono un periodo ancora critico, anche se si vedono timidi segnali di progresso. Superata questa soglia, la perdita del trapianto da rigetto acuto o cronico diventa un evento molto raro, ed il profilo di sopravvivenza diventa paragonabile a quello della coorte della popolazione di riferimento.

Le malattie dovute all'invecchiamento, la recidiva di epatopatia, e le patologie legate all'uso cronico dei farmaci immunosoppressori rappresentano la più grande minaccia alla sopravvivenza a lungo termine dei pazienti trapiantati.

Con gli studi multicentrici presentati, si è cercato non solo di imparare del passato, ma di anticipare alcune delle problematiche prevedibili nel futuro prossimo.

Lo studio EPOCAL ci ha permesso di dimostrare che l'utilizzo di everolimus, un immunosoppressore inibitore del mTOR, può essere introdotto precocemente e garantire una copertura immunosoppressiva efficace e sicura. La minimizzazione dell'uso di inibitori della calcineurina potrebbe consentire una terapia immunosoppressiva con maggiore sostenibilità nel lungo termine.

Studi sui meccanismi di tolleranza acquisita degli organi trapiantati sono necessari per individuare la sotto-popolazione di pazienti che potrebbe essere totalmente svezzata di agenti immunosoppressivi. Ugualmente ulteriori studi servirebbero a comprendere i meccanismi di tolleranza, per condurre i pazienti trapiantati a condizioni tali da avere il minor bisogno di farmaci immunosoppressivi.

Di fronte al limitato numero di organi a disposizione, studi con migliore prove sull'efficacia sono essenziali per poter costruire nuove strategie di allocazione d'organi. Allo stesso modo, nuovi protocolli per la raccolta e l'utilizzo di organi detti marginali sono necessari per migliorare l'assegnazione e la modalità di *follow-up* dei riceventi di questa categoria d'organi.

Sono numerose le vie immaginabili e, con la salda esperienza acquisita, tante quelle percorribili.