

RIASSUNTO.....	2
ABSTRACT	5
1 INTRODUZIONE.....	7
1.1. GAMMOPATIA MONOCLONALE DI INCERTO SIGNIFICATO	7
1.1.1. DEFINIZIONE	7
1.1.2. PREVALENZA	8
1.1.3. SIGNIFICATO CLINICO DELLA MGUS	9
1.1.4. EZIOPATOGENESI.....	10
1.1.5. FATTORI PREDITTIVI DELLA PROGRESSIONE DI MGUS A MIELOMA MULTIPLO O AD ALTRE PATOLOGIE	12
1.1.6. ALGORITMO DIAGNOSTICO NEI PAZIENTI CON MGUS	14
1.1.7. COMPLICANZE LEGATE ALLA PRESENZA DI UNA GAMMOPATIA MONOCLONALE	17
1.2. IL TRAPIANTO DI FEGATO	21
1.2.1. RIGETTO.....	21
1.2.2. RECIDIVA DI MALATTIA.....	22
1.2.3. NEOPLASIE “DE NOVO”	24
1.2.4. NEOPLASIE SOLIDE.....	26
1.2.5. DISORDINI LINFOPROLIFERATIVI POST-TRAPIANTO (PTLD)	26
1.2.6. INSUFFICIENZA RENALE DOPO TRAPIANTO	29
1.2.7. INFEZIONI	30
1.3. ASSOCIAZIONE DI MGUS AD ALTRE CONDIZIONI	32
2 SCOPO DELLO STUDIO.....	34
3 MATERIALI E METODI	35
3.1. DIAGNOSI DI GAMMOPATIA MONOCLONALE DI INCERTO SIGNIFICATO.....	35
3.2. VALUTAZIONE DEI PAZIENTI NEL PRE-TRAPIANTO.....	38
3.3. FOLLOW-UP DOPO TRAPIANTO DI FEGATO	38
3.3.1. IMMUNOSOPPRESSIONE	39
3.3.2. DIAGNOSI DELLE COMPLICANZE LEGATE AL GRAFT	40
3.3.3. DIAGNOSI DELLE COMPLICANZE NON LEGATE AL GRAFT	43
3.4. ANALISI STATISTICA.....	48
4 RISULTATI.....	49
4.1. MGUS NEI PAZIENTI CADIDATI AL TRAPIANTO.....	51
4.2. PAZIENTI CON MGUS POST TRAPIANTO	59
4.3. PAZIENTI TRAPIANTATI CON MGUS PERMANENTE VERSUS PAZIENTI TRAPIANTATI SENZA MGUS O CON MGUS TRANSITORIA	67
4.3.1. ANALISI UNIVARIATA E MULTIVARIATA	75
5 DISCUSSIONE.....	77
6 CONCLUSIONI.....	87
7 BIBLIOGRAFIA.....	88

RIASSUNTO

Premessa: La gammopatia monoclonale di incerto significato (MGUS) può svilupparsi sia in pazienti con cirrosi epatica che in pazienti sottoposti a trapianto di fegato (LT). Esistono pochi dati relativi alla prevalenza di MGUS nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato e al suo impatto sull'esito di trapianto. In particolare non sono presenti dati rilevanti per ciò che riguarda la progressione di una MGUS verso un disordine maligno a cellule B nei soggetti sottoposti a trapianto di organo solido.

Scopo: Lo scopo principale del nostro studio è stato di definire la prevalenza della MGUS in un gruppo di pazienti con patologie croniche avanzate del fegato, che si sono rivolti al nostro Centro per trapianto di fegato e stabilire la prevalenza di una MGUS “*de novo*” dopo trapianto di fegato. Scopo secondario è stato di valutare l'evoluzione della MGUS dopo trapianto di fegato. In particolare è stata considerata sia la possibile progressione di MGUS a mieloma multiplo od a linfoma, che il suo possibile contributo nella patogenesi di altre complicanze insorte dopo il trapianto di fegato.

Materiali e Metodi: Nel nostro studio sono stati inclusi 150 pazienti sottoposti a trapianto epatico con un follow-up superiore a dodici mesi. L'iter di valutazione per l'inserimento in lista d'attesa per trapianto è stato effettuato secondo le linee guida AISF-AASLD. Dopo il trapianto i pazienti sono stati sottoposti a follow-up che prevedeva esame clinico, screening di laboratorio ed eventuali esami strumentali di approfondimento. L'elettroforesi delle proteine plasmatiche è stata eseguita almeno ogni 6 mesi. Nei casi in cui l'elettroforesi proteica evidenziasse una componente monoclonale, la diagnosi di MGUS è stata posta sulla base dell'assenza di manifestazioni cliniche, del riscontro di una concentrazione di proteina monoclonale IgG circolante inferiore a 3 g/dl, del riscontro di una concentrazione di componente monoclonale IgG maggiore o uguale a 3 g/dl e di una qualsiasi quantità di IgA o IgM con quantità percentuale di plasmacellule nel midollo osseo inferiore al 10%.

Risultati: L'età dei pazienti al momento del trapianto, espressa come mediana, è di 52,5 anni (21-65 anni) e la durata media del follow-up è pari a $84.7 \pm 6,23$ mesi (range 12-192). Diciotto pazienti su 150 avevano una MGUS prima del trapianto. In dieci di questi pazienti la MGUS è scomparsa dopo il trapianto di fegato (MGUS "transitoria"). Una MGUS si è sviluppata dopo trapianto di fegato (MGUS "de novo") in 49 pazienti su 132. La prevalenza di MGUS "de novo" è risultata pari al 37%. Questo valore è molto più alto di quello osservato nei pazienti con malattie croniche del fegato in attesa di trapianto (12%, $p < 0.05$) e nella popolazione generale dei pazienti di età superiore ai 50 anni (3.2%, $p < 0.05$). Quarantanove pazienti hanno sviluppato MGUS "de novo" dopo trapianto; in 21 di questi pazienti l'MGUS è stata transitoria, in 28 la MGUS non è scomparsa durante il follow-up (MGUS "permanente"). Un paziente con MGUS presente già prima del trapianto ha sviluppato un mieloma micromolecolare. Nessun paziente con MGUS permanente ha sviluppato un linfoma. Confrontando complessivamente i pazienti con MGUS permanente ($n^\circ = 36$ pazienti) e i pazienti che non hanno mai sviluppato una MGUS ($n^\circ = 83$) insieme a quelli che hanno sviluppato una MGUS transitoria ($n^\circ = 31$), si è stata riscontrata nel primo gruppo una percentuale maggiore di infezioni opportunistiche severe (30,56% vs 13%, $p = 0,01$), di insufficienza renale (75% vs 45%, $p = 0,001$) e di mortalità (33% vs 17%, $p < 0.05$).

Nel confronto tra i due gruppi di pazienti non sono state riscontrate differenze significative per quanto riguarda le caratteristiche di base prima del trapianto (sesso, eziologia, gravità dell'epatopatia) ad eccezione dell'età risultata tendenzialmente maggiore nei pazienti con MGUS permanente. Non sono state riscontrate differenze significative neanche per quanto riguarda la funzionalità del graft al termine del follow up, le caratteristiche della terapia immunosoppressiva e lo sviluppo di altre complicanze quali il rigetto, le recidive di malattia, complicanze cardiovascolari, infezioni di CMV e EBV.

Conclusioni: La MGUS è frequente in pazienti con malattie epatiche croniche avanzate e la prevalenza di MGUS aumenta ulteriormente dopo il trapianto. Una MGUS permanente dopo trapianto di fegato si associa raramente a progressione a mieloma e sembra non associarsi a

progressione verso altri disordini linfoproliferativi a cellule B. Tuttavia, il suo sviluppo e la sua persistenza dopo il trapianto di fegato sono associate ad un rischio maggiore di complicanze, soprattutto di infezioni severe ed insufficienza renale e, probabilmente come conseguenza di ciò, e ad un tasso maggiore di mortalità.

ABSTRACT

Background - A monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) can develop in patients with liver cirrhosis as well as in liver transplant recipients. Few data are available today on the prevalence of MGUS in patients who underwent liver transplantation (LT) and on its impact on the outcome of LT. In particular there are no data relating to the potential progression of MGUS to B cell malignant disorder in subjects who underwent organ transplantation.

Aim - The main aim of our study was to define the prevalence of MGUS in a population of patients with advanced chronic liver diseases who referred to our Centre for LT and the prevalence of MGUS “*de novo*” after LT. The secondary aim was to evaluate the evolution of MGUS after LT. In particular it has been considered the possibility of MGUS turning to myeloma or lymphoma and its possible contribution in the pathogenesis of other complications after LT.

Study population and methods - One hundred and fifty liver transplant recipients with a follow-up longer than twelve months were included in the study. The inclusion in the transplant list has been performed in accordance with AISF-AALSD guidelines. After LT patients underwent a follow-up including medical examination, laboratory screening and if necessary in-depth instrumental examination. Blood serum proteins electrophoresis has been measured every six months. In presence of a monoclonal gammopathy, MGUS diagnosis was made on the basis of the absence of clinical manifestation, a concentration of circulating IgG monoclonal protein lower than 3g/dl or a concentration of circulating IgG monoclonal component higher than 3 g/dl and any amount of IgA, IgM with a percentage of plasma cells in the bone marrow lower than 10%.

Results – One hundred and fifty liver transplant patients were included in the study. Their median age at the time of transplantation was 52,5 years (21-65 years). The median follow-up was of 84.7 ± 6,23 months (range 12-192months). Eighteen out of 150 patients had a MGUS before LT (prevalence 12%); in 10 of them the MGUS disappeared during the follow-up post LT

(“transient”MGUS). MGUS developed after LT (MGUS “*de novo*”) in 49 patients out of 132 (prevalence 37%). The prevalence of MGUS “*de novo*” after LT is quite higher than what reported in patients with chronic liver disease waiting for transplant (12%, $p < 0.05$) and in people older than 50 years (3.2%, $p < 0.05$). In 28 of 49 patients with MGUS “*de novo*”, MGUS did not disappear during the follow-up (“*permanent MGUS*”). Eighty-three liver transplant recipients never had a MGUS. No patient with MGUS developed a lymphoproliferative disease, one patient with MGUS pre-OLT developed a smouldering myeloma.

Comparing patients who had permanent MGUS ($n=36$) developed before and after LT and patient with transient MGUS or without MGUS, the first group of patients showed a higher rate of severe infections (30,56% versus 13%, $p= 0,01$), chronic renal failure (75% versus 45%, $p= 0,001$) and mortality (33% versus 17%, $p<0.05$).

Patients with permanent MGUS and patients with transient MGUS or without MGUS showed no significant differences about aetiology of liver disease, CHILD and MELD at the time of LT, immunosuppressive therapy, liver graft function, development of rejection, diabetes and EBV and CMV infections and recurrence of the primary liver disease after LT. Patients with “*de novo*” MGUS were older than patients without MGUS (55 vs 50 years, $p= 0,04$) as well as patients with permanent MGUS than patients with a transient or without MGUS (57 versus 51 years, $p= 0,6$).

Conclusions - MGUS is frequent in patients with advanced chronic liver and in liver transplant recipients. The progression of a permanent MGUS after LT to myeloma is uncommon and a permanent MGUS is not associated with a progression to other lymphoproliferative diseases. Nevertheless, its development and persistence after LT are associated with a higher risk of complications, in particular severe infections, chronic renal failure and with a higher rate of mortality.

1 INTRODUZIONE

1.1. GAMMOPATIA MONOCLONALE DI INCERTO SIGNIFICATO

1.1.1. DEFINIZIONE

Si definisce gammopatia monoclonale una condizione caratterizzata dall'accumulo a livello sierico di un picco monoclonale di immunoglobuline o di parte di essa (catena leggera e/o catena pesante).

Le immunoglobuline sono proteine prodotte da plasmacellule costituite da due catene pesanti uguali tra di loro e da due catene leggere uguali tra di loro tenute insieme da legami chimici per costituire il Fab che è la struttura in grado di legare l'antigene. Le catene pesanti possono essere di diverso tipo (γ , α , μ , δ , e ϵ), le catene leggere possono essere di tipo kappa o lambda. A seconda del tipo di catena pesante presente le immunoglobuline vengono indicate come IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Molecole immunoglobuliniche intere e catene pesanti d'immunoglobuline non passano il filtro glomerulare e non si riscontrano nelle urine. Le catene leggere, dato il basso peso molecolare, sono filtrate dai glomeruli e, superata la fisiologica capacità di riassorbimento tubulare, rimangono nell'urina.

In condizioni normali, in un campo elettrico la popolazione delle immunoglobuline si muove in maniera eterogenea e forma un picco a base larga nella regione gamma. La presenza di un gammopatia monoclonale è espressione della proliferazione di un picco monoclonale di plasmacellule e all'elettroforesi delle proteine sieriche si evidenzia in zona gamma con un picco stretto e appuntito denominato componente M in quanto la loro identità strutturale le fa migrare con la medesima velocità elettroforetica.

La gammopatia monoclonale di incerto significato (MGUS) è il tipo più frequente di disturbo legato alla proliferazione monoclonale di plasmacellule (Kyle R.A; 2006). E' una condizione caratterizzata dalla presenza a livello sierico di un picco monoclonale di immunoglobuline, o parte di esse, in assenza di criteri diagnostici necessari per diagnosticare un mieloma multiplo o altri disordini linfoproliferativi quali plasmocitoma, macroglobulinemia di Waldenstrom, leucemia linfatica cronica, malattia delle catene pesanti, amiloidosi primaria (Kyle R.A; 2006).

Una gammopatia monoclonale viene definito di incerto significato (MGUS) in presenza a livello sierico di un picco monoclonale di immunoglobuline di concentrazione inferiore o uguale a 3 gr/dl, una percentuale di plasmacellule a livello midollare inferiore al 10% in assenza di manifestazioni cliniche legate ad un'eventuale proliferazione monoclonale di plasmacellule quali anemia, ipercalcemia, insufficienza renale, lesioni ossee di tipo litico (Kyle R.A; 2006). Il riscontro di catene leggere monoclonali nelle urine viene correntemente definito "proteinuria di Bence-Jones". Il paziente con la gammopatia monoclonale d'incerto significato è del tutto asintomatico e la diagnosi di tale condizioni solitamente è del tutto casuale. Tuttavia tale condizione può essere considerata come un disordine pre-neoplastico in quanto è ormai dimostrata l'elevata frequenza in cui evolve in mieloma multiplo o altri disturbi linfoproliferativi (Kyle R.A, 2002).

1.1.2. PREVALENZA

La presenza di una MGUS è una condizione piuttosto frequente nella popolazione generale e la sua prevalenza aumenta progressivamente con l'età.

Nel 2006 è stato pubblicato un articolo relativo al primo caso in cui è stata ricercata la presenza nel siero di una gammopatia monoclonale con l'utilizzo di tecniche sensibili in un'intera popolazione residente di un paese (Olmsted County, Minesota) (Kyle R.A, 2006). In questo studio la prevalenza di MGUS raggiungeva valori di circa 3,2% delle persone sopra i 50 anni e del 5,3% sopra i 70 anni (Kyle R.A, 2006). La prevalenza è maggiore negli uomini che nelle donne di pari età (4% vs. 2.7%). In entrambi i sessi la prevalenza aumenta all'aumentare dell'età. Considerando la fascia

d'età superiore agli 85 anni la prevalenza è dell'8.9% negli uomini e 7% nelle donne. Negli Stati Uniti è maggiore nella razza nera rispetto a quella bianca (Bladè J, 2006; Cohen H.J, 1998). L'età media alla diagnosi è di 70 anni, mentre meno del 2% ha un'età inferiore ai 40 anni.

Nello studio di Kyle R.A. et al pubblicato nel 2006, la componente monoclonale all'elettroforesi del siero risultava essere IgG nel 69%, IgM nel 17%, IgA nel 11% e biclonale nel 3%. La catena leggera presente nel siero era di tipo κ nel 62% e di tipo λ nel 38%. Nelle urine di 79 pazienti con MGUS l'immunofissazione rilevò una catena leggera monoclonale di tipo κ nel 16,5% e λ nel 5%.

1.1.3. SIGNIFICATO CLINICO DELLA MGUS

E' stato ormai dimostrato che la MGUS è una condizione caratterizzata dalla tendenza ad evolvere in mieloma multiplo o in altri disordini linfoproliferativi con una percentuale di progressione cumulativa dell'1% all'anno (Kyle R.A, 2002, Kyle R.A, 2003). .

In uno studio condotto presso la Mayo Clinic, la percentuale di progressione era di 17% a 10 anni, 34% a 20 anni e 39% a distanza di 25 anni dalla diagnosi di MGUS (Kyle R.A., 2004). L'evoluzione maligna é stata osservata persino dopo trenta anni dalla diagnosi (Kyle R.A. et al, 2002-2004).

Considerando i pazienti in cui si verificava una progressione da una condizione di MGUS ad un disordine linfoproliferativo, nel 69% la diagnosi era di mieloma multiplo, nell'12% di amiloidosi primaria, nell'11% di macroglobulinemia di Wandenstrom e nell'8% dei pazienti veniva fatta diagnosi di altri tipi di malattie linfoproliferative quali linfomi o leucemia linfatica cronica.

La stretta correlazione fra MGUS e successivo sviluppo di mieloma è stata confermata anche in studi più recenti (Landgren O, 2009). In questo studio infatti in tutti i casi in cui era stata fatta una diagnosi di mieloma multiplo in precedenza era stato individuato un quadro di gammopatia monoclonale di incerto significato.

1.1.4. EZIOPATOGENESI

L'eziopatogenesi responsabile dello sviluppo di una MGUS e della sua eventuale successiva progressione in malattia linfoproliferativa è solo in parte nota.

La produzione di una gammopatia monoclonale è conseguente alla proliferazione di un picco monoclonale di plasmacellule. Questo si verifica in seguito a riarrangiamento dei geni delle immunoglobuline da cui risulta la produzione di una proteina monoclonale idiotipica (Bergsagel PL, 2004). Nei pazienti con MGUS, il clone di plasmacellule e la concentrazione delle proteine monoclonali associate, solitamente, rimangono stabili per alcuni anni conservando tuttavia il loro potenziale evolutivo.

Mutazioni genetiche, angiogenesi del midollo osseo ed agenti infettivi sembrano giocare un ruolo importante nella progressione da MGUS a mieloma multiplo o ad altri disordini linfoproliferativi.

Non è ben conosciuto, tuttavia, lo specifico ruolo di ogni fattore.

- 1) **ABERRAZIONI CROMOSOMICHE:** alterazioni genetiche sono comuni nel mieloma multiplo e nella gammopatia monoclonale di incerto significato. Il 60% dei pazienti con mieloma ha una traslocazione 14q32 (sito dei geni che codifica per catene pesanti delle IgG), evidenziabile mediante tecniche di ibridazione in situ (FISH) (Avet-Loiseau et al, 1998). Le stesse alterazioni sono presenti anche nel 46% dei pazienti con MGUS (Avet-Loiseau et al, 1999a). Nello studio del 2005 di Chung et al il 40 % dei pazienti con mieloma micromolecolare o MGUS presentava iperdiploidia. Questa percentuale è simile a quella riportata in letteratura per il mieloma multiplo e suggerisce che l'iperploidia origina precocemente durante l'evoluzione della malattia. Ciò porterebbe ad affermare che la gammopatia monoclonale di incerto significato è generalmente associata ad instabilità cromosomica che si manifesta nel 50% circa dei casi con traslocazioni IgH (IgH traslocated MGUS) e nella maggior parte dei rimanenti con iperdiploidia (IgH traslocated MGUS). Anomalie del cromosoma 13 (monosomia 13 o 13q-) hanno un significato prognostico sfavorevole in quanto sembrano conferire una prognosi molto severa nei pazienti con

mieloma multiplo poiché sono associate ad un'elevata attività mitotica delle plasmacellule, ad una rapida ricorrenza della malattia e alla resistenza ai farmaci sin dall'esordio. Sembra inoltre che la monosomia del cromosoma 13 svolga un ruolo attivo nel passaggio da MGUS a mieloma multiplo, anche se questo non è chiaro poiché la frequenza della delezione del 13 è simile sia nell'MGUS che nel mieloma multiplo (Avet-Loiseau et al, 1999). Cambiamenti epigenetici, come una aberrante metilazione della regione 5' del promotore di un gene oncosoppressore è stata osservata nell'MGUS, sebbene queste mutazioni si riscontrino con una frequenza più bassa rispetto al mieloma multiplo (Takahashi et al, 2004) per cui il ruolo di questi cambiamenti nella progressione dell'MGUS non è ancora stato chiarito. Le mutazioni di K-ras e N-ras sono state ritrovate nel 5% di pazienti con gammopatia monoclonale di incerto significato mentre, nel caso di pazienti con il mieloma multiplo, la percentuale sale al 31%. Da ciò si ipotizza che esse potrebbero giocare un ruolo nella progressione del MGUS in mieloma multiplo (Rasmussen et al, 2005).

- 2) **RUOLO DELLE CITOCHINE.** Clinicamente le lesioni litiche ossee, osteopenia, ipercalcemia e le fratture patologiche differenziano il mieloma multiplo da gammopatia monoclonale di incerto significato. L'attivazione degli osteoclasti e l'inibizione degli osteoblasti sono responsabili delle lesioni ossee che fanno progredire MGUS a mieloma multiplo. L'attivazione degli osteoclasti è causata dall'iperespressione di varie citochine come il recettore dell'attivatore del fattore nucleare K β ligando (RANKL), che agisce sulla espressione di molecole di adesione che legano le plasmacellule allo stroma midollare (protezione dall'apoptosi) e la proteina infiammatoria dei macrofagi 1- α (MIP1- α) (Roodman, 2002). Anche l'interleuchina 1 β (IL-1 β) è prodotta dalle plasmacellule nel mieloma multiplo ed è un forte attivatore degli osteoclasti, favorendo così il riassorbimento osseo (Lust & Donovan, 1998). Un importante ruolo viene giocato anche dal tumor necrosis factor α (TNF- α) e dall'interleuchina 6 (principale fattore di crescita delle cellule

mielomatose, induce l'espressione di VEGF e inibisce la funzione di presentazione dell'antigene da parte delle cellule detritiche).

- 3) **ANGIOGENESI:** L'angiogenesi del midollo osseo aumenta progressivamente da MGUS benigno allo stadio avanzato del mieloma multiplo (Vacca et al, 1994, Rajkumar et al, 2000). L'aumentata angiogenesi sembra essere conseguente ad un alterato equilibrio fra i livelli di fattori angiogenetici e fattori anti-angiogenetici. Forse vi è una perdita di un inibitore dell'angiogenesi da cui potrebbe derivare l'aumento della stessa, che interviene nella progressione della patologia (Kumar et al, 2004)
- 4) **HELICOBACTER PYLORI:** Anche l'infezione da parte di Helicobacter pylori è stata presa in considerazione nell'eziopatogenesi della MGUS e della sua evoluzione in mieloma multiplo. Malik A.A. ha dimostrato in uno studio del 2002, che il 66% di pazienti con MGUS aveva l'infezione da Helicobacter pilory. L'eradicazione dell'infezione ha portato alla riduzione del picco M in 11 pazienti su 39 (Malik A.A., 2002). Per contro gli studi di prevalenza non hanno dimostrato un nesso tra MGUS ed infezione da Helicobacter Pilory (Rajkumar S.V, 2002).

1.1.5. FATTORI PREDITTIVI DELLA PROGRESSIONE DI MGUS A MIELOMA MULTIPLO O AD ALTRE PATOLOGIE

Sono stati individuati alcuni fattori predittivi di evoluzione di una condizione di MGUS a mieloma multiplo o ad altro tipo di disordine linfoproliferativo

- la quantità di proteine monoclonali (proteina M). Kyle R.A et al in uno studio del 2002 hanno dimostrato che il livello di proteina M al momento della diagnosi di MGUS rappresenta il fattore predittivo più importante di progressione a disordine linfoproliferativo. In particolare il rischio di progressione a mieloma multiplo ad una distanza di venti anni dalla diagnosi, era pari al 14% per i pazienti con una quantità di proteina M minore o uguale

a 5g/l, 25% se presentavano 15 g/l, 49% se presentavano un picco di 25g/l, fino ad arrivare al 64% per 30 g/l.

- il tipo di immunoglobulina: proteine M contenenti la catena pesante di tipo A o M rappresentano un fattore predittivo di evolutività. Blade et al (1992) hanno riportato che i pazienti con IgA hanno probabilità di sviluppare mieloma multiplo maggiore rispetto a pazienti con altri tipi di proteina M. Kyle et al, nel 2002, hanno dimostrato che i pazienti con IgM o IgA hanno un incrementato rischio di progressione rispetto a quelli con proteina IgG ($p=0,0001$).
- il numero di plasmacellule nel midollo. Il numero di plasmacellule nel midollo osseo è un importante fattore predittivo per la progressione. Baldini et al (1996) hanno individuato un rischio di trasformazione del 6-8 % nel caso di plasmacellule nel midollo osseo minori del 10%. Il rischio aumenta al 37% nel caso di plasmacellule tra il 10 e 30%. Cesana et al (2002), in uno studio condotto su 1104 pazienti con MGUS, hanno dimostrato che una percentuale di plasmacellule maggiore del 5% nel midollo osseo rappresenta un fattore di rischio indipendente di evoluzione di MGUS a disordini linfoproliferativi,
- il rapporto delle catene leggere kappa/lambda nel siero. Si è inoltre dimostrato che il rischio di progressione nei pazienti con un anomalo rapporto delle catene leggere (free light chain FLC) era significativamente più alto che nei pazienti con rapporto normale (hazard ratio 3.5; $p < 0.0001$) ed era indipendente dalla quantità e dal tipo di proteina M sierica (Rajkumar et al, 2005).

Un modello di stratificazione del rischio di progressione dell'MGUS è stato sviluppato da Kyle et al (2007). I pazienti con 3 fattori di rischio, ossia con un anomalo valore di FLC nel siero, con MGUS non IgG e con elevata proteina M ($\geq 15\text{g/l}$), presentano un rischio di progressione della malattia a 20 anni del 58%, del 37% con due fattori rischio presenti, del 21% con un unico fattore di rischio presente e del 5% nel caso di assenza di tali fattori di rischio.

1.1.6. ALGORITMO DIAGNOSTICO NEI PAZIENTI CON MGUS

Gli esami di laboratorio che permettono di fare diagnosi di una gammopatia monoclonale e di tipizzarla sono i seguenti:

- elettroforesi delle proteine sieriche su gel di agarosio: è il metodo di riferimento per individuare la presenza di un picco sierico di immunoglobuline e quantificarlo. Se ben condotta, con l'elettroforesi capillare è possibile rilevare una componente monoclonale di entità molto modesta (fino a 200 mg/L).
- test di immunosottrazione e di immunofissazione su gel di agarosio. Dopo che è stato individuato all'elettroforesi delle proteine sieriche la presenza di un picco monoclonale in zona gamma, l'immunosottrazione e l'immunofissazione vengono utilizzati come test di conferma e per identificare il tipo specifico di catena pesante e di catena leggera. L'immunofissazione è un test molto sensibile, infatti permette anche di individuare piccoli quantitativi di gammopatia monoclonale (Karen D.F, 1999).
- ricerca di proteinuria di Bence Jones (catene leggere delle immunoglobuline) in un campione della raccolta urine di 24 ore. Nei pazienti in cui si individua una gammopatia monoclonale > 1,5 gr/dl bisogna eseguire una raccolta urine delle 24 ore ed eseguire su tale campione di urine l'elettroforesi e il test di immunofissazione per individuare la presenza eventuale di proteinuria di Bence Jones. La proteinuria di Bence Jones può essere presente anche nelle condizioni di MGUS. Kyle in uno studio pubblicato nel 2006 ha riscontrato una proteinuria di Bence Jones nel 31% dei pazienti con MGUS (Kyle R.A, 2006).

Il riscontro di una gammopatia monoclonale nel siero di un paziente è molto frequente e richiede sempre l'esecuzione di una serie di indagini per distinguere le forme di MGUS dai casi in cui la presenza di una proteina M è espressione di un mieloma multiplo o di altri disordini linfoproliferativi.

Tale diagnosi differenziale si basa sui seguenti accertamenti:

- raccolta di notizie anamnestiche. In particolare è importante conoscere i disturbi lamentati dal paziente perché di fronte ad un'astenia, dolori dorsali e ossee altrimenti non spiegabili è sempre opportuno eseguire apprendimenti diagnostici
- esami di laboratorio standard ed in particolare un'emocromo completo con formula leucocitaria, studio della funzionalità renale, ionemia con calcemia, determinazione del livello di lattico deidrogenasi e di beta 2-microglobulinemia. La presenza di una condizione di anemia, di insufficienza renale e/o di ipercalcemia deve sempre porre il sospetto di mieloma multiplo.
- determinazione del rapporto sierico kappa/lambda. Ultimamente è stata introdotta nella pratica clinica anche la misurazione delle catene leggere presenti nel siero (Katzmann, 2002). In questo modo è possibile determinare il rapporto sierico fra le catene leggere kappa/lambda il cui valore normale è 0.26-1.65. E' stato dimostrato che un'alterazione di tale rapporto rappresenta un fattore di rischio indipendente di evolutività di una condizione di MGUS a mieloma multiplo.
- esecuzione di esami radiologici per individuare la presenza di eventuali lesioni osteolitiche (radiografie standard, TAC, RMN);
- aspirato midollare e biopsia ossea.
 - indicati sempre in caso di proteina M ≥ 15 g/l,
 - in tutti i casi di gammopatia monoclonale tipo IgA e IgM, indipendentemente dal livello di proteina M,
 - in tutti i casi di alterato rapporto delle catene leggere kappa/labda,
 - in tutti i casi di insufficienza renale, ipercalcemia, lesioni osteolitiche non altrimenti spiegabili.

L'esito di tali esami permette di differenziare una condizione di MGUS da una condizione di "smouldering" mieloma multiplo (SMM) detto anche mieloma asintomatico o mieloma micromolecolare, di mieloma multiplo e di altre malattie linfoproliferative.

Per "smouldering" mieloma multiplo si fa riferimento ad una condizioni caratterizzata da una proteina M di tipo IgG o IgA e con un livello di proteina M ≥ 30 gr/l e/o un livello di plasmacellule a livello midollare $\geq 10\%$ in assenza di manifestazioni cliniche di malattia linfoproliferativa quali anemia, insufficienza renale, ipercalcemia, lesioni ossee o altro (Internation Myeloma Working Group 2003). La condizione di SMM ha ovviamente un rischio di progressione in mieloma maggiore rispetto alla condizione di MGUS (51% a 5 anni, 66% a 10 anni e 73% a 15 anni) (Kyle R.A, 2007).

Nella tabella sottostante sono riassunti i criteri diagnostici delle cause principali di gammopatia monoclonale.

	MGUS	Mieloma multiplo "smouldering"	Mieloma multiplo	Macroglobulinemia di Waldenstrom
Plasmacellule nel midollo osseo [%]	<10	≥ 10	≥ 10	>10*
Proteina monoclonale circolante [g/dl]	<3	≥ 3	presente	presente tipo IgM
Manifestazione cliniche	assenti [^]	assenti [^]	presenti [^]	presenti [§]

Legenda:

I valori sono stati formulati dal International Myeloma Working Group (Kyle R.A, Rajkumar Sv, 2009).

[^] Le caratteristiche cliniche includono l'aumento della concentrazione del calcio sierico, danno renale, anemia, lesioni litiche allo scheletro, infezioni batteriche ricorrenti.

[§]Le caratteristiche cliniche includono anemia, sanguinamento mucocutaneo, epatosplenomegalia ed immunoglobuline di tipo IgM.

°Le caratteristiche cliniche includono fatica, perdita di peso, porpora, insufficienza renale con sindrome nefrosica, epatopatia, scompenso cardiaco congestizio, neuropatia periferica con ipotensione ortostatica interessamento del tratto gastrointestinale.

* infiltrato midollare linfoplasmacitoide avente uno specifico immunofenotipo di membrana.

La diagnosi di una condizione di MGUS impone un continuo follow up del paziente con una frequenza che dipende dal rischio evolutivo (Es: pazienti con proteina M \leq 15 gr/l, di tipo IgG e con rapporto k/lamba normale sono considerati a basso rischio e possono essere sottoposti a controlli con frequenza annuale).

1.1.7. COMPLICANZE LEGATE ALLA PRESENZA DI UNA GAMMOPATIA MONOCLONALE

La presenza di una gammopatia monoclonale nel siero e/o nelle urine si può associare a delle complicanze croniche. Lo sviluppo di manifestazioni cliniche legate alla presenza di una gammopatia monoclonale esclude per definizione una condizione di MGUS e definisce un quadro di mieloma multiplo. Le principali complicanze croniche sono le seguenti:

Infezioni

Per quanto riguarda l'aumentato rischio di infezioni nei pazienti con MGUS, vi è un unico studio di Gregersen circa il maggior rischio di batteriemia nei pazienti con una MGUS rispetto alla popolazione generale. Tale studio afferma che in oltre il 60% dei casi di morte di pazienti con MGUS, la causa è da ricercare nelle complicanze cardiovascolari (47.3%) e nelle infezioni batteriche (7.6%) (Gregersen H et al., 1998). E' noto che le infezioni rappresentano una delle principali cause di morbilità e mortalità nei pazienti con mieloma multiplo. Alcuni studi riportano stime di 1.29-2.22 episodi infettivi all'anno con frequenze variabili a seconda dello stadio della malattia. La frequenza delle complicanze infettive tende infatti ad aumentare con l'evoluzione della malattia (Paradisi F, 2001). L'elevato rischio infettivo è dovuto ad una disfunzione del sistema

immunitario. Nei pazienti con mieloma multiplo c'è un'alterazione dell'immunità umorale con ridotta produzione di immunoglobuline policlonali in seguito alla stimolazione antigenica. Questo si verifica per sostituzione delle cellule normali da parte delle cellule neoplastiche e per produzione da parte delle cellule tumorali di fattori che inibiscono la proliferazione dei B linfociti in risposta alla stimolazione antigenica. E' stata inoltre dimostrata un'alterata funzionalità dell'immunità cellulo-mediata (Lortholary O, 2000) con ridotta funzionalità dei neutrofili. Le infezioni interessano prevalentemente il tratto respiratorio ed urinario (Paradisi F, 2001). Il 43% delle infezioni che provocano il decesso dei pazienti sono ad eziologia batterica, il 28% ad eziologia funginea e il 7% virale. Per quanto riguarda le infezioni ad eziologia batterica, nei pazienti con mieloma in fase iniziale o ben controllato dalla chemioterapia sono responsabili soprattutto i cocchi Gram positivi, nei pazienti con mieloma avanzato e/o non responsivo a terapia aumenta la prevalenza di infezione da bacilli Gram negativi.

Lesioni ossee

Il mieloma multiplo è caratterizzato dalla comparsa di lesioni ossee di tipo litico che interessano l'80% dei pazienti (Oyajobi B.O. 2007). Le lesioni ossee sono dovute alla produzione da parte delle cellule tumorali di citochine che attivano gli osteoclasti. Sono state individuate diverse citochine coinvolte nell'attivazione degli osteoclasti fra cui si segnala receptor activator of nuclear factor - κ B ligand (RANKL) e la chemochina MIP-1 α (Oyajobi B.O 2007). Conseguenze cliniche delle lesioni osteolitiche sono dolore osseo, fratture patologiche, compressioni spinali, ipercalcemia.

Insufficienza renale

E' un'importante complicanza nei pazienti con mieloma multiplo. La patogenesi è multifattoriale:

- accumulo e precipitazione delle catene leggere che formano aggregati nei tubuli distali provocandone l'ostruzione. Le catene leggere, per il basso peso molecolare, sono normalmente filtrate dai glomeruli e arrivano al tubulo prossimale dove vengono in parte

riassorbite. Le cellule del tubulo prossimale assumono per endocitosi le catene leggere che vengono poi degradate nei lisosomi. (Batuma V et al, 1990,1997,1998; Santostefano M). Nel mieloma multiplo l'eccesso di catene leggere filtrate a livello glomerulare prodotte supera la capacità delle cellule tubulari di catabolizzarle e quindi esse arrivano nel lume del segmento distale del nefrone, dove si associano con la proteina di Tamm-Horsfall (uromodulina) che è una glicoproteina sintetizzata dalle cellule del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle e che ha affinità per la catena leggera monoclonale. Le catene leggere interagiscono, con uno specifico sito di legame della proteina di Tamm-Horsfall e formano aggregati che successivamente inducono l'ostruzione dei tubuli distali e del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle. (Huang ZQ, Sander PW 1995, 1997; Ying WZ, Sander PW 2001). Fattori quali la disidratazione, l'ipercalcemia, acidosi, la furosemide e l'uso di mezzi di contrasto iodato promuovono la formazione di questi aggregati (Sander PW et al 1990; Pirani CL et al 1987; Sander PW, Booker BB, 1992). L'ostruzione tubulare aumenta la pressione intraluminare, riduce la filtrazione glomerulare e riduce il flusso sanguigno interstiziale, compromettendo ulteriormente la funzione renale. A sua volta la riduzione della clearance tubulare delle catene leggere contribuisce ad aumentare la loro concentrazione nei tubuli. Si instaura così un circolo vizioso che porta alla nefropatia. Le catene leggere endocitate possono anche causare necrosi delle cellule tubulari.(Feeling J et al, 2007). L'esatto meccanismo non è ancora stato chiarito, ma sembra che l'aggregazione delle catene leggere dopo l'endocitosi potrebbe indurre una cascata che porta alla morte cellulare.

- sviluppo di nefropatia interstiziale. L'endocitosi delle catene leggere da parte delle cellule dei tubuli renali induce la produzione di citochine pro-infiammatorie quali l'interleuchina 6, l'interleuchina 8 e il TNF- alfa, principalmente attraverso l'attivazione dell'NF-kappa b e attivazione delle protein-chinasi. (Sengul S et al 2002, 2003). Queste citochine proinfiammatorie promuovono l'infiltrazione delle cellule infiammatorie che producono

metallo-proteasi. Ne deriva una deposizione di proteine nella matrice ed a questo segue una fibrosi che compromette ulteriormente la funzione renale.

- L'ipercalcemia è un'altra causa importante di insufficienza renale nel mieloma multiplo (Bladè J et al 2005). L'ipercalcemia è dovuta al riassorbimento osseo e formazione di lesioni osteolitiche per attivazione degli osteoclasti e viene ulteriormente potenziata dall'incapacità del rene di eliminare l'eccesso di calcio. A sua volta l'ipercalcemia danneggia la capacità di concentrazione del rene, causa vasocostrizione dei vasi renali, aumentata diuresi, che potrebbe causare ipovolemia e azotemia pre-renale.

Mortalità

In letteratura ci sono soltanto pochi studi riguardante il rapporto fra MGUS e mortalità che evidenziano dati spesso contrastanti.

Uno studio condotto presso la Mayo Clinic ha evidenziato un maggior tasso di mortalità nei pazienti con MGUS rispetto alla popolazione generale (Kyle, 1993). Balde et al, invece, in uno studio del 1992 non hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa di mortalità tra una un campione di 128 persone con MGUS e la popolazione generale (Balde et al., 1992). Uno studio olandese relativo a 334 pazienti con MGUS ha rilevato una leggera riduzione della sopravvivenza in confronto alla popolazione generale nei primi 5 anni di follow-up, mentre nei successivi 5 anni la sopravvivenza dei pazienti con MGUS diventa leggermente superiore (Van de Poel et al., 1995).

Lo studio di Gregersen sottolinea l'importanza delle malattie cardio-vascolari e dei tumori solidi come causa di mortalità nei pazienti con MGUS (Gregersen H. et al., 2001).

1.2. IL TRAPIANTO DI FEGATO

Il trapianto di fegato rappresenta l'unica possibilità terapeutica per i pazienti con epatite acuta fulminante e con cirrosi avanzata. Per questo, al momento attuale, la presenza di uno score di Child-Pugh ≥ 7 è considerata un'indicazione all'inserimento in lista d'attesa (Oellerich M, 1991).

Negli anni c'è stato un progressivo miglioramento dell'outcome post trapianto e attualmente la sopravvivenza a 1, 5 e 10 anni dal trapianto è rispettivamente pari a 83%, 71% e 61 % (European Liver Transplant Registry, 2007).

Il decorso dopo trapianto di fegato è tuttavia gravato da una serie di complicanze che possono essere distinte in complicanze legate al graft (rigetto del graft, ricorrenza di malattia primitiva, complicanze vascolari o biliari) o complicanze non legate al graft (complicanze cardiovascolari, infezioni, insufficienza renale, disordini linfoproliferativi, neoplasie de novo). Nella patogenesi delle complicanze non legate al graft è centrale il ruolo della terapia immunosoppressiva.

Vediamo in particolare alcune di queste complicanze:

1.2.1. RIGETTO

Dovuto all'attivazione del sistema immunitario del ricevente verso gli antigeni del donatore presenti a livello del graft. Fondamentale per prevenire la reazione di rigetto è l'avvio, subito dopo il trapianto, di terapia immunosoppressiva. Sorprendentemente, gli allotrapianti di fegato vengono rigettati in modo meno aggressivo rispetto ad altri organi. Il rigetto epatocellulare si può distinguere in 3 tipi:

1. Iperacuto: causato da anticorpi preformati la cui adesione all'endotelio provoca l'attivazione del complemento e microtrombosi intravascolari del graft. Si manifesta nelle prime dodici ore post-trapianto.
2. Acuto: causato dall'interazione APC-Th (Antigen Presenting Cell- T helper) mediata da MHC di classe II del complesso maggiore di istocompatibilità con successiva attivazione linfocitaria e

reclutamento di elementi citotossici. Si manifesta solitamente entro le prime 6 settimane dal trapianto.

3. Cronico: ad eziologia ignota, verosimilmente multifattoriale. La definizione di rigetto cronico risulta da una diagnosi clinica ed istologica. Accanto alla disfunzione del graft si assiste ad un quadro patologico caratterizzato da infiammazione, fibrosi, obliterazione dei vasi di medio e piccolo calibro con perdita dei dotti biliari.

Per fare diagnosi di rigetto si parte da un sospetto clinico (sviluppo di ittero con incremento degli indici di citolisi e di colestasi) che deve essere sempre confermato da una biopsia epatica. È importante effettuare anche la stadiazione del rigetto per valutare l'intensità dei processi di flogosi e di necrosi e stabilire la scelta terapeutica. Nelle forme lievi di rigetto acuto è sufficiente potenziare la terapia immunosoppressiva mentre nelle forme più severe (RAI score > 5) è necessario eseguire un trattamento steroideo. Se la diagnosi di rigetto cronico è precoce può essere utile la sostituzione della ciclosporina con tacrolimus.

1.2.2. RECIDIVA DI MALATTIA

Un problema estremamente importante nel paziente sottoposto a trapianto epatico è la recidiva dell'epatopatia di base. Non sempre la diagnosi della recidiva della patologia originaria risulta semplice. Questa, infatti, si può presentare con caratteristiche laboristico-istologiche difficilmente distinguibili da processi patologici di altra natura come il rigetto o fenomeni infettivi. Riuscire a fare una corretta diagnosi differenziale è fondamentale soprattutto per quanto riguarda le strategie terapeutiche.

Vediamo i tipi più frequenti di recidiva dell'epatopatia di base:

La recidiva di epatite HBV correlata presenta caratteristiche di aggressività più accentuate rispetto alla patologia di origine, portando a cirrosi ed insufficienza epatica in un paio d'anni dalla recidiva.

La combinazione di trattamento "preemptive" con lamivudina allo scopo di ridurre la replicazione virale pre-trapianto ed il trattamento profilattico post-trapianto con anticorpi anti-HBs (HBIG) e

lamivudina hanno ridotto il rischio di recidiva da HBV a meno del 5%, anche in pazienti con alti livelli di HBV DNA alla immissione in lista. (Shouval et al. 2000; Perrillo et al. 2001; Marzano et al. 2001). Grazie a queste misure profilattiche i pochi casi di recidiva post-trapianto ancora segnalati sono da attribuirsi al trapianto di pazienti che hanno sviluppato resistenza clinica alla lamivudina (HBV-DNA >5 log₁₀ copie/ml) nell'immediato pretrapianto. In questi casi per bloccare la replicazione virale si associano nuovi farmaci antivirali come l'adefovir. La diagnosi di recidiva HBV parte sempre da un sospetto clinico confermato da evidenze sierologiche (comparsa di HBsAg con riduzione del titolo nonostante la somministrazione mensile di HBIG, comparsa di HBV-DNA). La diagnosi di conferma è sempre istologica

Recidiva di epatite HCV correlata. La recidiva dell'infezione C dopo trapianto di fegato si manifesta nel 100% dei pazienti viremici pre-trapianto. La storia naturale della malattia post-trapianto è più rapida ed aggressiva rispetto a quella dei pazienti non trapiantati. La recidiva istologica dell'epatite C si sviluppa nel 75-80% dei casi ed 1/3 dei pazienti con epatite progredisce a cirrosi entro 5-7 anni. Queste percentuali mostrano un trend in aumento, perché sottostimate laddove non si eseguano biopsie protocollari. Altrettanto rapido appare dopo trapianto il decorso della cirrosi verso lo scompenso e l'insufficienza epatica rispetto a ciò che si osserva nell'immunocompetente. Un sottogruppo di pazienti (1-9%) sviluppa un'epatite colestatica fibrosante, rapidamente progressiva verso l'insufficienza epatica. La sopravvivenza a lungo termine dei pazienti trapiantati per epatite C è significativamente inferiore rispetto a quella dei pazienti senza epatite C (Berenguer M, 2000). La diagnosi di recidiva di epatite C si basa principalmente sulla biopsia epatica, utile sia quando vi sia un sospetto clinico che quando il paziente presenti le transaminasi normali. Esiste infatti una quota rilevante (dal 30 al 50%) di pazienti viremici senza evidenza malattia epatica. Il trattamento delle recidive di epatite HCV si basa sui farmaci antivirali. Il "timing ed il target" del trattamento antivirale nel post-trapianto sono a tutt'oggi controversi. Non è definito infatti quali pazienti debbano essere trattati (tutti quelli con recidiva di epatite cronica o solo quelli con più rapida evoluzione di malattia), né quando sia più opportuno iniziare il

trattamento (prima del trapianto, subito dopo il trapianto o dopo l'evidenza di recidiva). Inoltre, gli effetti collaterali soprattutto ematologici, rendono molto elevato il tasso di riduzione o sospensione della terapia, riducendo quindi l'efficacia terapeutica.

Recidiva di epatopatia alcool-correlata. La cirrosi ad eziologia alcolica è stata considerata per anni indicazione controversa al trapianto epatico per motivi etici in quanto considerata una malattia "autoindotta", per il rischio di ricadute e la scarsa compliance al trattamento immunosoppressivo. Prima del trapianto è richiesto un periodo di astinenza di almeno sei mesi con frequenti controlli e visite psicologiche. I casi di recidiva al consumo di alcool dopo trapianto sono del 20-30%. La necessità di discriminare fra consumi alcolici contenuti e "pesanti" ha spinto alla ricerca di possibili marker di questi ultimi (Peterson K, 2004). Gli usuali marker epatici, come GGT, non appaiono soddisfacenti a tale scopo (Rommelspacher, 1996) sia in termini di sensibilità che di specificità. La percentuale di transferrina deficitaria di carboidrati (CDT) (Berlakovich G et al., 1999) rispetto alla transferrina totale è un valido strumento per rilevare la ripresa al consumo alcolico post-OLT. Il livello di CDT diviene positivo dopo due settimane di consumo alcolico "pesante" (definito come 60 g od oltre di alcol etilico al giorno) ed anche dopo aver cessato tale uso il valore si normalizza gradatamente con un'emivita media di uguale durata. Recentemente la determinazione di tale marker è stata perfezionata con lo sviluppo di reagenti immunologici in grado di individuarla specificamente (Bean P, 2001) e con la più appropriata espressione del risultato in termini di percentuale della CDT rispetto alla transferrina totale (CDT %) invece che come valore assoluto (Anttila P et al., 2004).

1.2.3. NEOPLASIE "DE NOVO"

I pazienti sottoposti a trapianto di fegato hanno un rischio di sviluppare neoplasie "de novo" maggiore rispetto alla popolazione generale con incidenza che varia dal 5% al 15% (Vallejo GH, 2005). Le neoplasie "de novo" rappresentano la principale causa di mortalità tardiva nei pazienti

sottoposti a trapianto di fegato, quasi tre volte maggiore rispetto alla popolazione di riferimento (Herrero JI. 2005).

Da un punto di vista patogenetico un ruolo fondamentale nello sviluppo di tali neoplasie è svolto dalla ridotta sorveglianza immunitaria secondaria all'impiego degli immunosoppressori e la possibile azione mutagenetica diretta degli stessi. Alcuni studi sembrano associare l'uso di un determinato agente immunosoppressivo con lo sviluppo di determinati istotipi di neoplasie nel follow up post trapianto. Alcuni autori hanno infatti osservato un'associazione fra l'uso di ciclosporina e l'incidenza dei linfomi e del sarcoma di Kaposi (Penn I., 1991), l'uso del tacrolimus sembrerebbe invece associarsi allo sviluppo di disordini linfoproliferativi. Tali dati sono però spesso contrastanti e poco condivisi; è ragionevole pensare che sia l'immunosoppressione troppo spinta e protratta nel tempo a favorire un maggiore sviluppo di neoplasie ed una loro maggiore severità (Herrero JI. 2005; Vallejo G. 2003; Valero JM. 2003).

Il ruolo patogenetico della terapia immunosoppressiva è potenziato da altri cofattori fra cui si segnala l'età (Haagsma et al. 2000), l'eziologia alcolica dell'epatopatia di base, infezioni opportunistiche da virus oncogeni, l'esposizione ad altri fattori cancerogeni (fumo, alcol, raggi solari) (Vallejo G. 2003).

I pazienti sottoposti a trapianto per cirrosi alcolica hanno una incidenza di neoplasie maligne statisticamente superiore a quella dei pazienti trapiantati per altre eziologie (Saigal S. 2001; Kelly DM. 1998; Duvoux C. 1999; Jimenez C. 2002) e l'alcool è un sicuro fattore di rischio (fino a 25 volte maggiore) (Herrero JI. 2005; Benlloch S. 2004), in particolare nei pazienti che riprendono l'assunzione di alcool nel periodo post-trapianto (Cuadrado A. 2005) con un aumento dell'incidenza (Valero JM. 2003) ed una riduzione della sopravvivenza globale a 10 anni (Cuadrado A. 2005).

Il fumo è stato stimato fattore indipendente di rischio per la genesi delle neoplasie "de novo" da Herrero (Herrero JI. 2005), Duvoux e colleghi (Duvoux C. 1999) e da Valero e colleghi (Valero JM. 2003).

Per quanto riguarda la tipologia delle neoplasie de novo, queste possono essere distinte in due gruppi:

1.2.4. NEOPLASIE SOLIDE

La maggior parte delle neoplasie non ematologiche che si sviluppano dopo trapianto di fegato sono di tipo cutaneo. In uno studio Xiol X. et al (2001) hanno confermato l'aumentata incidenza di neoplasia anche solide nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato dopo parecchi anni di follow up (Penn I, 1996; Tan-Shalaby J et al, 1995; Kelly DM et al, 1998) ed in particolare lo sviluppo di tumori cutanei (Otley CC, 2000). I tipi di neoplasia cutanea risultate più frequenti erano il carcinoma a cellule basali ed il carcinoma squamoso. I tumori cutanei (non melanomi) si verificano solitamente in individui predisposti quando esposti ad altri fattori di rischio e, in particolare, con l'esposizione al sole (Di Giovanna JJ, 1998).

Le maggiori casistiche americane vedono, nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato, le "forme linfoproliferative" quale patologia preminente (57% di tutte le neoplasie "de novo") (Penn I. 1996), seguiti dalle forme cutanee (15-32%) e, in minor quota, dalle altre patologie neoplastiche (Saigal S. 2002). Le neoplasie a carico di altri organi e distretti non appaiono così significativamente rappresentate nella popolazione dei trapiantati (Vallejo G. 2003) e la loro incidenza, nelle varie casistiche, varia usualmente tra l.1 e il 2.6% (Jonas S. 1997; Jain AB. 1998; Levy M. 1993) (solo in due casistiche è significativamente maggiore (Herrero JJ. 2005). Per alcune forme neoplastiche, pur essendo stata osservata una incidenza maggiore rispetto alla popolazione di riferimento, la differenza non raggiungeva la significatività.

1.2.5. DISORDINI LINFOPROLIFERATIVI POST-TRAPIANTO (PTLD)

Lo sviluppo del linfoma dopo trapianto è stato descritto per la prima volta da Doak et al nel 1964 in un paziente sottoposto a trapianto renale (Doak et al, 1964). Il termine disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) invece è stato introdotto da Starzl et al nel 1984.

Gli stati d'immunodeficienza, sia essa congenita, iatrogena o acquisita, predispongono allo sviluppo di neoplasie linfoidi (Elenitoba-Johnson et al, 1997- Kamel OW, 1997). Questi disordini linfoproliferativi differiscono dai linfomi osservati nei pazienti immunocompetenti. Corrispondono raramente ad un linfoma a basso grado a cellule B, sono frequentemente extranodali, hanno un decorso aggressivo, sono più spesso associati con il virus di Epstein Barr (EBV) e possono rispondere alla riduzione o sospensione dell'immunosoppressione (Starzl TE et al, 1984-Nalesnik MA et al, 1991- Cohen JJ, 1991). Tra gli stati d'immunodeficienza iatrogena, i disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) sono abbastanza comuni. Il rischio di PTLD dipende dall'organo trapiantato con una frequenza compresa tra l' 1% e il 10% (Nalesnik MA, 1988; Reams BD, 2003; Reyes J, 1996; Leblond V, 2004), l'incidenza più alta si ritrova dopo trapianto di polmone o di piccolo intestino mentre un'incidenza molto minore si ritrova nel trapianto di rene. (Opelz G, 2004).

Nello studio retrospettivo di Kremers et al, il 25% dei pazienti sottoposti a trapianto ortotopico di fegato (OTL) era deceduto senza aver sviluppato un PTLD, mentre il 3,1% lo aveva sviluppato. I disordini linfoproliferativi post-trapianto erano stati osservati a partire da tre mesi fino a 15 anni e mezzo dopo il trapianto. L'incidenza di PTLD era più alta durante i primi 18 mesi del post trapianto, con un'incidenza cumulativa dello 0,5% a 6 mesi, dello 0,9% a 12 mesi e del 1,1% a 18 mesi. In conclusione i PTLD insorti nel post trapianto hanno una frequenza compresa tra 2% e 3,5%, (Leblond V. et al, 2004) e l'incidenza cumulativa risulta essere del 5,4% a 15 anni dopo il trapianto.

La patogenesi dei PTLD non è perfettamente nota ed è sicuramente multifattoriale.

E' stato dimostrato per l'infezione dal virus di Epstein-barr (EBV) un ruolo importante nella patogenesi dei PTLD (Birkeland SA, 2003; Thorley-Lawson DA, 2004; - Bustami, 2004; Cherikh WS, 2003). L'infezione da EBV è ubiquitaria e priva d'importanti conseguenze nella normale popolazione, ma nei pazienti trapiantati d'organo è associata ad una serie di disordini linfoproliferativi che vanno da un'iperplasia policlonale reattiva ad un linfoma maligno

monoclonale (Cohen JJ, 2000). I primi studi relativi a questi argomenti, attestavano che i PTLD erano maggiormente presenti nella forma EBV positiva mentre studi più recenti riferiscono un aumento dei PTLD negativi per EBV (Jain AB, 1998; Preston DS., 1992; Lovet JM, 1999). Questi sono considerati come distinti dai PTLD EBV positivi poiché essi tendono a manifestarsi molto tempo dopo il trapianto e hanno una prognosi peggiore. In uno studio Kremes et al (2006) hanno indicato che i PTLD precoci sono prevalentemente EBV positivi mentre quelli che compaiono più tardivamente sono prevalentemente EBV negativi. L'incidenza cumulativa dei due tipi di PTLD a più di dieci anni è simile. Ciò ha portato a ritenere probabile che l'aumento di frequenza dei PTLD-EBV negativi non sia da correlarsi tanto ad una variazione dei disordini, quanto invece al maggior numero di OTL eseguiti ed al più lungo follow up nei pazienti. Secondo i risultati di questo studio, inoltre, entrambi i gruppi di pazienti (EBV negativi vs. EBV positivi) hanno una mortalità di circa il 40% nel primo anno dopo la diagnosi ed una sopravvivenza a 5 anni del 50%.

Alcuni studi, avevano suggerito una relazione tra il tipo di patologia che aveva condotto il paziente al trapianto ed il rischio di sviluppare un PTLD (Gross TG et al, 1999; Shpilberg O. et al, 1999). Nel caso di trapianto di fegato una preesistente epatite autoimmune o una cirrosi biliare primitiva erano associate ad un maggior rischio nello sviluppo di questi disordini linfoproliferativi, tuttavia il numero di pazienti presi in esame era piuttosto scarso.

Si è inoltre notato che il trattamento per il rigetto con alte dosi di steroidi e di OKT3 (muromonab-CD3; che è un anticorpo monoclonale murino) era associato con un successivo sviluppo di PTLD mentre questo non accadeva con il trattamento con anticorpi policlonali. Inoltre il rischio susseguente alla terapia con OTK3 o steroidi era maggiore il primo anno dopo il trapianto mentre si riduceva nel follow up. Chiaramente le alti dosi di steroidi e OTK portavano ad uno stato d'immunosoppressione, che è un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di disordini linfoproliferativi. Alcuni studi, infine, sono risultati contrastanti in merito al ruolo assegnato a virus HCV, cirrosi alcolica ed età elevata quali fattori di rischio per PTLD (Marks R, 1995; Frisch M, 1996; Kahn HS, 1998; Levi F, 1998; Wassberg C., 1999).

Il trattamento dei PTLD consiste sempre nella riduzione della terapia immunosoppressiva ed in aggiunta viene frequentemente somministrata una terapia con anticorpi monoclonali (rituximab).(Svoboda J, 2006) (Choquet S, 2006). Nonostante la recente introduzione della terapia con rituximab (anticorpo monoclonale anti-CD20) per il trattamento dei disordini linfoproliferativi , la mortalità rimane tuttavia del 30-40% (Svoboda J et al, 2006) .

1.2.6. INSUFFICIENZA RENALE DOPO TRAPIANTO

Dopo trapianto di fegato si verifica un quadro di insufficienza renale acuta nel 17-95% dei casi. Questa ampio spettro di incidenza riportata in letteratura si ritiene sia dovuto principalmente all'utilizzo di criteri diagnostici non standardizzati per definire un quadro di insufficienza renale acuta. I principali fattori di rischio associati allo sviluppo di insufficienza renale acuta post-OLT sono il danno tossico o ischemico del rene subito durante l'intervento, lo sviluppo di una nefropatia farmaco-indotta e una preesistente condizione di insufficienza renale prima de trapianto. (Fraley DS, 1998; Lima EQ, 2003).

Lo sviluppo di insufficienza renale cronica dopo trapianto ha una prevalenza che varia dal 4-80% nelle diverse casistiche. Anche in questo caso l'ampia variabilità segnalata è dovuta all'utilizzo di criteri non standardizzati per definire un quadro di insufficienza renale cronica come pure alla diversa durata del follow up post trapianto nei diversi studi (Fisher NC, 1998; Ojo AO, 2003). I principali fattori di rischio per lo sviluppo di insufficienza renale cronica dopo trapianto di fegato sono l'uso di inibitori della calcineurina, lo sviluppo prima del trapianto di un'insufficienza renale o di episodi di sindrome epato-renale e lo sviluppo dopo trapianto di diabete mellito. Alcuni autori hanno inoltre segnalato come ulteriori fattori di rischio o sviluppo nel post-trapianto di un quadro di insufficienza renale acuta, un'etopatia HCV correlata e l'età avanzata (Ojo AO, 2003; Velidedeoglu E, 2002. C'è comunque un accordo unanime nel riconoscere la nefrotossicità legata all'uso degli inibitori della calcineurina. Questi farmaci hanno una nefrotossicità acuta dose-correlata che consiste in una vasocostrizione a livello dell'arteriola afferente con una conseguente riduzione del

flusso a livello glomerulare. L'uso cronico di tali farmaci invece si associa allo sviluppo di fibrosi interstiziale e nefropatia cronica. Diversi studi hanno confrontato la nefrotossicità della ciclosporina e del tacrolimus con risultati spesso contrastanti. Alcuni studi sembrano evidenziare un effetto simile sulla funzionalità renale dei due farmaci (Fisher NC, 1998; Platz KP, 1994). Pham PT ha invece segnalato una maggior nefrotossicità del tacrolimus rispetto alla ciclosporina in pazienti non diabetici sottoposti a trapianto di fegato (Pham PT, 2003). Uno studio recente ha invece segnalato un rischio di sviluppare nefropatia cronica maggiore nei soggetti sottoposti a trapianto di fegato trattati con ciclosporina rispetto al tacrolimus (Gonwa TA, 2002). La nefrotossicità legata all'uso della ciclosporina si riduce con la regolazione della dose basata sul livello ematico a 2 ore dall'assunzione (Sterneck M, 2002).

1.2.7. INFEZIONI

L'uso di terapia immunosoppressiva ovviamente aumenta il rischio di sviluppare infezioni opportunistiche. Lo sviluppo di gravi infezioni opportunistiche nel post trapianto rappresenta un fattore di rischio indipendente di mortalità nei pazienti sottoposti a trapianto (Wilkinson A, 2005). Nelle varie casistiche relative a soggetti sottoposti a questo tipo di trapianto, le infezioni batteriche presentano un'incidenza del 33-68%, quelle virali del 3-29% e quelle micotiche dell'1-26%. Queste complicanze possono essere suddivise, in base al periodo di insorgenza rispetto al momento del trapianto, in infezioni del primo mese, del secondo-sesto mese e successive al sesto mese.

Infezioni del primo mese post-trapianto

- Le **infezioni batteriche** hanno un'incidenza del 90-95% e sono causate generalmente da batteri aerobi gram-negativi (Enterobacteriacee, Pseudomonas, Klebsiella, Serratia) e meno comunemente da batteri gram-positivi (Staphylococcus aureus, stafilococchi coagulasi-negativi, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium). Si presentano come infezioni intraaddominali, polmoniti, infezioni della ferita chirurgica e dei cateteri o batteriemia.

- Le **infezioni micotiche** hanno un'incidenza del 14-50% e sono causate con frequenza decrescente da Candida (stomatite, esofagite, polmonite, infezioni urinarie o della ferita chirurgica), Aspergillus (polmonite, ascessi polmonari, cerebrali o intraaddominali) e Criptococcus neoformans (meningoencefalite).
- **Infezioni virali** da Herpes simplex (stomatiti, faringiti, lesioni genitali, encefaliti, lesioni oculari e viscerali) o Herpes virus 6 (polmoniti interstiziale, encefaliti, epatiti, aggravamento dell'infezione da CMV) sono molto rare.

Infezioni del secondo-sesto mese post-trapianto

Le infezioni che caratterizzano tale fase del follow up post trapianto possono essere di natura virale, batterica o funginea. Fra le infezioni virali meritano un'attenzione particolare le infezioni acute da EBC e CMV.) Le infezioni acute da CMV (nuove infezioni o riattivazioni di infezioni latenti) possono rimanere asintomatiche o manifestarsi come sindromi similmononucleosiche, polmonite, epatite, gastrite, colite ulcerativa e solo raramente corio retinite. Ne casi di infezione primaria post-trapianto nei riceventi sieronegativi, le infezioni tendono ad avere solitamente un andamento più aggressivo. Le infezioni da EBV possono anch'esse rimanere asintomatiche o manifestarsi con un quadro di mononucleosi infettiva. E' riconosciuto un loro ruolo patogenetico nello sviluppo di disordini linfoproliferativi post trapianto.

Infezioni successive al sesto mese dal trapianto

I pazienti con normale funzione d'organo e dosaggio standard di immunosoppressori hanno un rischio di complicanze infettive sovrapponibile a quello dei soggetti immunocompetenti. Nei pazienti con rigetto d'organo o che assumono alti dosaggi di immunosoppressori si ha un rischio più elevato di infezioni gravi quali criptococcosi, pneumocistosi, listeriosi, nocardiasi, aspergillosi sistemica.

1.3. ASSOCIAZIONE DI MGUS AD ALTRE CONDIZIONI

La presenza di un gammopatia monoclonale è stata osservata anche in altre condizioni oltre che nei disordini linfoproliferativi. Ulteriori studi sarebbero necessari per capire il significato di tali associazioni e per differenziare le associazioni in cui sussiste un reale significato patogenetico da altre legate a pura coincidenza dovute all'elevata prevalenza della MGUS nella popolazione, soprattutto di fasce di età avanzate.

E' stata descritta un'associazione fra MGUS e neuropatie periferiche e malattie del motoneurone (Ropper A.H, 1998; Younger D.S 1990), malattie reumatologiche come l'artrite reumatoide, e altre condizioni, come leucemia mielomonocitica cronica, leucemia neutrofilica cronica, lichen mixedematoso o pioderma gangrenoso

E' stata dimostrata un'associazione fra infezione cronica HCV correlata e presenza di una condizione di MGUS. In uno studio del 1998 è stata ricercata la presenza di MGUS in pazienti con epatopatia cronica: la presenza della proteina M è stata individuata nell'11% dei pazienti con epatopatia HCV correlata e solo nell'1% dei pazienti negativi al virus HCV (Andreone P, 1998). Alcuni autori suggeriscono un ruolo patogenetico dell'infezione cronica HCV correlata nello sviluppo di una condizione di MGUS e nella sua successiva progressione in malattia linfoproliferativa (Hamazaki K, 2003).

E' stata osservata la presenza di una gammopatia monoclonale in pazienti sottoposti a trapianto d'organo e sottoposti a terapia immunosoppressive. Dopo trapianto di fegato è stata descritta la comparsa di una condizione di MGUS con prevalenza variabile a seconda degli studi: Badley ha descritto la presenza di MGUS nel 28% dei pazienti sottoposti a trapianto di fegato (Badley A.D, 1996); Lemoine et al hanno rilevato una prevalenza dell'8,5% (Lemoine A et al., 2001).

Nello studio di Babel e di Regamey del 2004, in relazione ai trapianti renali, è stata descritta una prevalenza di MGUS compresa tra il 10-25% (Babel N, 2004; Regamey N, 2004), mentre la

prevalenza di MGUS dopo trapianto di cuore risulta essere del 25% nello studio di Caforio (Caforio et al., 2001).

Non è conosciuto il meccanismo patogenetico responsabile dello sviluppo di una gammopatia monoclonale nel post trapianto, tuttavia un ruolo centrale sembra essere rappresentato dalla diminuzione della sorveglianza immunologica dei linfociti T (dovuta in particolare all'elevata terapia immunosoppressiva nel primo periodo posttrapianto). È stato osservato che dosi cumulative di ciclosporina e steroidi nel primo anno dopo trapianto cardiaco così come la terapia nei pazienti con rigetto sono associate ad aumentato rischio di sviluppare MGUS (Caforio et al, 2001).

Tale dato è stato inoltre confermato da studi sui pazienti trapiantati di rene, nei quali lo sviluppo di una condizione di MGUS è associato all'utilizzo di alte dosi di immunosoppressione nel rigetto cronico del graft (Passweg J et al.,1996).

La ridotta sorveglianza immunologica conseguente alla terapia immunosoppressiva potrebbe favorire la proliferazione di un clone di cellule B in risposta ad infezioni virali quali CMV, EBV, HHV-8 (Passweg J et al.,1996, Hermouet et al., 2003).

Dallo studio del 2004 di Regamey è stata osservata una prevalenza di MGUS del 34% nei riceventi CMV-ve di graft da donatore CMV+ve rispetto al 6% dei riceventi CMV-ve di graft da donatori CMV-ve. Analogamente si è dimostrato che la prevalenza di MGUS nei pazienti HHV-8 +ve risulta del 29%, nei pazienti sierconvertiti da HHV-8 -ve a HHV-8 +ve dopo trapianto è del 38% e nei pazienti trapiantati che rimangono HHV-8 -ve è del 19 %. Per quanto riguarda l'infezione da EBV non è ancora stato chiarito il suo ruolo nella patogenesi della MGUS dopo trapianto d'organo, mentre è conosciuta la sua importanza come fattore causale circa lo sviluppo dei disordini linfoproliferativi post-trapianto.

2 SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo principale della tesi è stato riuscire a definire:

- a) la prevalenza delle gammopatie monoclonali ed in particolare della MGUS nei pazienti candidati al trapianto di fegato;
- b) la prevalenza di una MGUS “*de novo*” dopo trapianto;
- c) l’evoluzione della MGUS dopo trapianto di fegato.

E’ stato inoltre analizzato il significato clinico della MGUS nel post-trapianto sia in termini di sua possibile progressione a mieloma multiplo o a linfoma, sia per il possibile contributo nella patogenesi di altre complicanze croniche dopo trapianto di fegato.

Scopo ultimo è stata quindi quella di definire da un lato se si tratti effettivamente di gammopatie monoclonali di “incerto significato” e, dall’altro, se esse possano condizionare l’outcome del trapianto e la sopravvivenza del paziente dopo trapianto di fegato.

3 MATERIALI E METODI

In questo studio clinico longitudinale retrospettivo-prospettico sono stati inclusi i pazienti trapiantati di fegato presso il nostro centro dal 1995 al 2007. Tali pazienti sono stati seguiti nel periodo pre-trapianto di fegato e nel follow up post trapianto presso l'Ambulatorio Epatologico della Clinica Medica V riconosciuto dal 2001 come "Centro regionale specializzato nelle malattie di fegato". Come unico criterio di inclusione è stato considerato un follow-up post trapianto superiore a 12 mesi. La raccolta dei dati è stata conclusa a Maggio 2008.

Nell'elaborazione dei dati della nostra tesi abbiamo considerato le visite di follow-up eseguite a distanza di un mese, sei mesi, dodici mesi dal trapianto e al riscontro di un'eventuale gammopatia monoclonale. Abbiamo considerato come termine dei follow up l'ultima visita ambulatoriale precedente Maggio 2008 o il decesso del paziente. Ne casi in cui il paziente non è più venuto ai controlli presso il nostro Centro (drop out) abbiamo considerato come termine del follow up l'ultima visita ambulatoriale.

3.1. DIAGNOSI DI GAMMOPATIA MONOCLONALE DI INCERTO

SIGNIFICATO

Sia durante l'iter di valutazione per inserimento in lista d'attesa per trapianto di fegato, sia durante il follow up post trapianto, i pazienti hanno eseguito controlli seriati presso il nostro Ambulatorio integrato. In tali occasioni venivano sottoposti a :

- Anamnesi ed esame obiettivo finalizzata alla ricerca di segni e sintomi clinici relativi all'epatopatia di base come pure ad altre eventuali manifestazioni cliniche indipendenti dall'epatopatia di base (Es: dolori ossei suggestivi di lesioni osteolitiche),

- Esami bioumorali di routine (Es: emocromo con formula leucocitaria, determinazione degli indici di funzionalità epatica e renale, indici di colestasi, esame urine ecc). In tale occasione, venivano eseguiti anche i seguenti accertamenti:
 - elettroforesi capillare delle proteine sieriche su strumentazione CZE Beckman.
 - test di immunosottrazione con antisieri specifici Beckman per confermare la presenza di un picco monoclonale in zona gamma e tipizzare il tipo di immunoglobulina
 - test di immunofissazione manuale su gel di agarosio per confermare la presenza di un picco monoclonale in zona gamma e tipizzare il tipo di immunoglobulina
 - determinazione della proteinuria di Bence-Jones su campioni di urine delle 24 ore effettuata tramite immunofissazione su gel di agarosio in caso di evidenza a livello sierico di una gammopatia monoclonale

Nei casi di evidenza di una condizione di gammopatia monoclonale, la diagnosi di MGUS è stata posta sulla base dei seguenti criteri:

- assenza di sintomi clinici indicativi di mieloma multiplo e/o malattia linfoproliferativa quali dolori ossei (espressione di lesioni osteolitiche), sintomi riferibili a iperviscosità (cefalea, vertigini, sonnolenza fino al coma, epistassi, sintomi emorragici, offuscamento del visus, dispnea);
- negatività delle radiografie del cranio, delle ossa lunghe e del bacino per lesioni osteolitiche;
- presenza a livello sierico di un picco monoclonale di immunoglobuline di concentrazione inferiore o uguale a 3 gr/dl;
- plasmacellule midollari < 10%. La biopsia ossea è stata eseguita nei seguenti casi:
 - in caso di proteina M ≥ 15 g/dl (indipendentemente dal tipo di proteina M),
 - in tutti i casi di gammopatia monoclonale tipo IgA e IgM, indipendentemente dal livello di proteina M,

- in tutti i casi di dolori ossei, ipercalcemia, lesioni osteolitiche non altrimenti spiegabili.

L'evidenza di una condizione di MGUS durante la valutazione per inserimento in lista d'attesa per trapianto non ha rappresentato una controindicazione al trapianto. La diagnosi di un mieloma asintomatico e/o sintomatico come pure di altra malattia linfoproliferativa rappresentava una controindicazione assoluta al trapianto di fegato.

In seguito a diagnosi di una condizione di MGUS (sia nell'iter pre trapianto di fegato che durante il follow up post trapianto) i pazienti stati sottoposti a controlli clinici ravvicinati per definirne l'evoluzione.

I pazienti sono stati sottoposti a controlli ambulatoriali inizialmente ogni 3 mesi per valutare la comparsa di eventuali nuove manifestazioni cliniche e/o alterazioni degli esami di laboratorio. Il tipo e l'entità della gammopatia monoclonale sono stati controllati mediante l'elettroforesi proteica e immunofissazione su gel di agarosio. In caso di stabilità della condizione di MGUS i controlli clinici sono stati eseguiti ogni 6 mesi.

L'evoluzione a mieloma è stata esclusa sulla base di:

- assenza di sintomi clinici;
- negatività dell'esame obiettivo;
- quantità della componente monoclonale IgG < 3 g/dl;
- - quantità della componente monoclonale IgG \geq 3 g/dl o qualsiasi quantità della componente monoclonale IgA o IgM con percentuale di plasmacellule nel midollo osseo < 10%.

L'evoluzione a linfoma è stata esclusa sulla base di:

- assenza di sintomi;
- negatività dell'esame obiettivo;
- negatività della TAC toraco-addominale;
- negatività all'eventuale biopsia tissutale eseguita in caso di referto sospetto della TAC per malattie linfoproliferative.

3.2. VALUTAZIONE DEI PAZIENTI NEL PRE-TRAPIANTO

I pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti alla selezione per l'inserimento in lista trapianti, secondo le linee guida AISF-AASLD (AISF; Karen F. et al, 2005).

In particolare, per escludere la presenza di eventuali neoplasie solide, i pazienti sono stati sottoposti oltre all'anamnesi e all'esame obiettivo alle seguenti indagini: Rx torace e nei casi dubbi TAC toracica ed eventuale broncoscopia, EGDS e colonscopie ai pazienti di età maggiore ai 50 anni o con fattori di rischio per patologia neoplastica in ambito gastro-intestinale, dosaggio sierico di PSA libero e totale e visita urologica nei maschi, mammografia e PAP test e valutazione ginecologica nelle donne. Per escludere la presenza di eventuali malattie linfoproliferative sono stati eseguiti, in accordo con le linee guida sopra citate, esami di primo livello quali emocromo con formula leucocitaria, dosaggio delle sottopopolazioni linfocitarie e delle immunoglobuline sieriche, elettroforesi delle proteine plasmatiche. Nei casi sospetti per malattie linfoproliferative la diagnosi veniva confermata attraverso l'esecuzione di TAC e/o TAC/PET e biopsie tissutali.

3.3. FOLLOW-UP DOPO TRAPIANTO DI FEGATO

Dopo il trapianto di fegato, i pazienti sono stati sottoposti a stretto follow-up comprendente visite mediche ed esecuzione degli esami biumorali e strumentali, con una frequenza variabile in relazione al tempo trascorso dal trapianto ed alle condizioni cliniche del paziente. Indicativamente, in rapporto al tempo trascorso dal trapianto di fegato, i pazienti sono stati valutati una volta alla settimana per il primo mese post OLT, una volta ogni 2 settimane per i successivi tre mesi, una

volta al mese per i susseguenti 12 mesi. Negli anni successivi sono stati valutati almeno 2 volte all'anno, ad eccezione dei casi in cui le condizioni cliniche richiedessero valutazioni più frequenti.

Le visite di follow-up sono state finalizzate alla valutazione della funzionalità del graft e alla diagnosi di eventuali complicanze. In ciascuna di tali visite di follow-up sono stati raccolti dati clinici, sono stati eseguiti esami di laboratorio quali il dosaggio sierico di emocromo, urea, creatinina, ionemia comprendente anche calcemia, dosaggio della lattico deidrogenasi (LDH), aspartato-amminotrasferasi (AST), alanina-amminotransferasi (ALT), gammaglutamiltranspeptidasi (GGT), fosfatasi alcalina (ALP), tempo di protrombina (PT), International Normalized Ratio (INR), bilirubinemia totale, albuminemia ed elettroforesi delle proteine totali con eventuali test di immunofissazione e immunosottrazione, esame urine ed eventuale ricerca di proteinuria di Bence Jones su campioni della raccolta urine delle 24 ore. Veniva inoltre dosato il livello ematico degli inibitori della calcineurina (ciclosporina o tacrolimus a seconda dello schema immunosoppressivo) e posto in relazione alla dose del farmaco somministrata.

3.3.1. IMMUNOSOPPRESSIONE

Tutti i pazienti dopo trapianto hanno ricevuto una terapia immunosoppressiva con inibitori della calcineurina (CNI). Il livello ematico di tacrolimus è stato mantenuto nel range di 10-15 µg/l per il primo mese dopo il trapianto e tra 5-10 µg/l oltre il primo mese. La concentrazione ematica di ciclosporina prima della somministrazione orale del farmaco è stata mantenuta tra 250-350 µg/l durante il primo mese, 150-200 µg/l fra il secondo mese e il primo anno dal trapianto e valori tra 100-150 µg/l in seguito. Dal 2002 abbiamo iniziato a regolare la dose di ciclosporina da somministrare in base al livello ematico dosato a due ore dalla somministrazione mantenendo tale valore tra 800-1000 µg/l nel primo mese dopo il trapianto e tra 300-600 µg/l oltre questo periodo.

Nei pazienti che dopo il trapianto hanno sviluppato insufficienza renale e/o ipertensione arteriosa non facilmente controllabile con la terapia antiipertensiva è stato introdotto il mofetil micofenolato.

Parallelamente è stata ridotta la posologia del CNI, mantenendo i livelli ematici prima della somministrazione della prima dose giornaliera di tacrolimus e ciclosporina, rispettivamente tra 3-5 µg/ e 100-300 µg/l. La presenza di una MGUS dopo il trapianto non ha comportato alcuna modificazione della strategia immunosoppressiva.

3.3.2. DIAGNOSI DELLE COMPLICANZE LEGATE AL GRAFT

La valutazione della funzionalità del graft e delle eventuali complicanze legate al graft si è basata su:

- valutazione clinica con anamnesi ed esame obiettivo,
- esami di laboratorio: aspartato-amminotrasferasi (AST), alanina-amminotransferasi (ALT), gammaglutamiltranspeptidasi (GGT), fosfatasi alcalina (ALP), albumina, tempo di protrombina (PT), International Normalized Ratio (INR), bilirubina totale e bilirubina diretta, albuminemia e proteine mia,
- esami strumentali. L'ecografia epatobiliare con eco-color-doppler splancnico è stato eseguito con frequenza mensile subito dopo il trapianto, e con frequenza trimestrale e ogni sei mesi negli anni successivi. Ovviamente tale indagine è stata eseguita in urgenza in tutti i casi di riscontro di manifestazioni cliniche di possibili complicanze (Es: dolore addominale, comparsa di ascite , comparsa di ittero ecc) e di alterata funzionalità del graft agli esami bioumorali. Per fare diagnosi di eventuali complicanze sono stati eseguiti esami strumentali di secondo livello quali la TAC e/o la RMN addominale, l'angio-TAC e/o angio-RMN dell'addome ed eventuale angiografia addominale, colangio-RMN ed eventuale colangiografia retrograda o colangiografia transepatica per valutare la morfologia del fegato e per diagnosticare eventuali complicanze, come ad esempio stenosi o trombosi dell'arteria epatica o della vena porta o stenosi della delle via biliari. Nei casi sospetti per rigetto epatocellulare o di recidiva di epatopatia è stata eseguita una biopsia epatica eco-guidata.

In particolare per fare diagnosi delle principali complicanze legate al graft sono stati adottati i seguenti algoritmi diagnostici.

Rigetto epatocellulare

Il rigetto acuto epatocellulare è stato sospettato sulla base della comparsa di ittero e dell'incremento dei livelli degli indici di citolisi e di colestasi. La conferma della diagnosi è stata ottenuta, in tutti i casi, mediante agobiopsia epatica. La diagnosi istologica è stata seguita dalla determinazione del grading per definire l'intensità dei processi necro-infiammatori e definire quindi la strategia terapeutica.

Nei casi di colestasi ingrevescente la biopsia epatica veniva eseguita anche per diagnosticare un eventuale quadro di rigetto cronica

Recidive dell'epatopatia di base

Recidiva di epatite da HCV. La determinazione dell'HCV-RNA non è utile per fare diagnosi perchè risulta sempre positivo con livelli di viremia maggiori rispetto al pre-trapiato. Nel nostro studio la diagnosi di recidiva di epatite C è sempre stata effettuata con biopsia epatica. La biopsia è stata eseguita in tutti i casi di sospetto di complicanze del graft (aumento delle transaminasi e degli indici di colestasi) e di routine a distanza di 6 mesi e un anno dal trapianto.

Recidiva di epatite da HBV. Tutti i pazienti con epatopatia di base HBV correlata sono stati sottoposti nel post trapianto a profilassi della recidiva con anticorpi anti-Hbs e spesso anche con farmaci antivirali (lamivudina, adefovir).

Per diagnosticare un'eventuale recidiva sono stati monitorati i seguenti parametri:

- dosaggio del titolo di anti-Hb: il titolo veniva mantenuto entro i range terapeutici con la somministrazione mensile di anticorpi (HBIG) anti HBS
- antigeni virali quali HBsAg, HBeAg e HBcAg,

- HBV-DNA con determinazione quantitativa
- Biopsia epatica.

Nei pazienti con titoli stabili di anti-HBs non è stato eseguito il dosaggio di HBsAg, né di HBeAg o anti-HBe, né HBV DNA. In pazienti con titoli anti-HBs in progressiva diminuzione a fronte di un regolare somministrazione di HBIG, è stato eseguito il dosaggio di HBsAg, HBeAg, anti-HBe e HBV DNA. La comparsa di HBsAg, anche in presenza di bassi titoli di anti-HBs, ha richiesto sempre la determinazione di HBeAg, anti-HBe e HBV DNA, oltre che degli esami epatici e della biopsia epatica per confermare la diagnosi di recidiva.

Recidiva di epatopatia colestatica (cirrosi biliare primitiva, colangite sclerosante ed epatite autoimmune). La diagnosi veniva sospettata sulla base di un incremento degli indici enzimatici di citolisi epatica, accompagnato dall'aumento degli indici di colestasi. La diagnosi definitiva si è basata sempre sulla biopsia epatica. Per la diagnosi veniva eseguita anche la ricerca di autoanticorpi anti-nucleo (ANA) e/o antimuscolo liscio (SMA) e/o anti-microsomi di fegato o di rene (LKM).

Recidiva di epatopatia alcolica

La diagnosi è stata sospettata in base alla comparsa di segni di danno/disfunzione del graft in presenza di una ripresa del consumo alcolico confermata da:

- anamnesi
- e/o
- alterazione dei markers di abuso alcolico quali alcoluria, ETG urinario e transferrina deficitaria di carboidrati (CDT)
- e/o
- valutazione da parte di uno specialista Tossicologo.

La diagnosi è stata confermata dalla biopsia epatica.

Complicanze vascolari e biliari

Complicanze vascolari e biliari sono state sospettate sulla base dell'incremento degli indici enzimatici di citolisi epatica e/o degli indici di colestasi. La diagnosi è stata confermata nel caso delle complicanze vascolari da un ecoDoppler splancnico e da una Angio-TC e/o Angio-RMN dell'addome superiore. Nel caso delle complicanze biliari la diagnosi è stata confermata da una Colangio-RMN e/o da una Colangio-TC o, limitatamente ai primi tre mesi dopo trapianto, da una Colangiografia per via trans-Kehr.

3.3.3. DIAGNOSI DELLE COMPLICANZE NON LEGATE AL GRAFT

Infezioni

Nei primi tre mesi dopo il trapianto, in occasione di ogni controllo ambulatoriale venivano eseguiti i seguenti accertamenti microbiologici e/o sierologici:

- urocoltura, emocoltura, tampone nasale ed esame microbiologico di un campione di bile prelevato in sede di drenaggio;
- esami sierologici e microbiologici finalizzati alla diagnosi di infezioni virali acute quali ricerca di IgM e IgG anti-CMV, degli antigeni pp65 o pp76 di CMV e/o del CMV-DNA, ricerca degli anticorpi anti-EBV IgM e IgG e dell'EBV-DNA, sierologia per virus herpes simplex.

Trascorsi i primi tre mesi dopo trapianto, nel caso in cui i dati clinici e biumorali raccolti facessero sospettare lo sviluppo di qualche complicanza infettiva sono stati eseguiti esami di conferma e di approfondimento (esami microbiologici e sierologici, strumentali, biopsie tissutali).

In presenza di infezione acuta da CMV ed EBV asintomatiche, rilevate unicamente da dati sierologici (comparsa di anticorpi IgM) e in assenza di alcuna manifestazione clinica non è stata effettuata alcuna terapia, ma è stata aumentata la frequenza dei controlli sierologici con dosaggi di anticorpi anti-EBV ed anti-CMV e monitoraggio delle condizioni cliniche e della funzionalità del graft. La comparsa di IgM anti EBV o CMV in assenza di alcuna manifestazione clinica e la

successiva sieroconversione spontanea in assenza di terapia antivirale non sono state considerate, nella raccolta dei dati della tesi, come complicanze infettive. Sono state considerate tali solo se associate a qualche manifestazione clinica.

Le complicanze di natura infettiva sono state suddivise in tre categorie a seconda della gravità clinica:

- lievi quando non hanno rappresentato un pericolo per la funzionalità del graft e/o per la vita del paziente e hanno richiesto una terapia di supporto o un'eventuale terapia antimicrobica domiciliare. Alcuni esempi sono rappresentati da positività colturale della bile del drenaggio biliare, infezione basse vie urinarie, positività di un tampone nasale, sinusiti;
- medie quando hanno richiesto un ricovero ospedaliero senza rappresentare un pericolo per la vita del paziente e/o la funzionalità del graft. Esempi di infezioni opportunistica di media gravità sono state polmoniti, gastroenteriti, infezioni alte vie urinarie;
- gravi quando hanno rappresentato un pericolo imminente per la funzionalità del graft o per la vita del paziente quali ad esempio epatiti di CMV, aspergillosi polmonari, polmoniti da Pseudocisti carinii, sepsi.

Insufficienza renale

Una prima valutazione della funzionalità renale si è basata sulla valutazione dei valori di azotemia e creatininemia. In presenza di valori di creatininemia superiori a 110 $\mu\text{mol/l}$ abbiamo sempre eseguito un esame delle urine con determinazione dell'osmolarità urinaria e della proteinuria per capire la causa dell'insufficienza renale.

La misurazione del livello sierico di creatininemia è però poco sensibile per la determinazione della funzionalità renale e può sovrastimarla del 20-30%. Il metodo migliore di valutazione della funzionalità renale sarebbe la valutazione della di filtrazione glomerulare (VFG) che può essere stimata attraverso la clearance della creatinina. Ci sono varie formule di stima della clearance della

creatinina. Nel nostro studio la clearance della creatinina è stata calcolata con la formula MRDR (Modification of Diet in Renal Disease):

$$\text{eGFR}[\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2] = 186 \times [\text{creatinina sierica}[\text{mg}/\text{dl}]]^{(-1,154)} \times [\text{età} [\text{anni}]]^{(-0,203)} \times 0.742 \text{ (se donne)} \times 1.210 \text{ (se uomo)}$$

La funzionalità renale normale quando i valori di stima del filtrato glomerulare sono superiori a 90ml/min. Le linee guida della National Kidney Foundation parlano di malattia renale per valori di VFG compresi fra 60 e 90 ml/min (Clinical practice guidelines for chronic kidney disease. 2002). Si parla di malattia renale cronica per valori di VFG < 60 ml/min. Nella valutazione delle complicanze dopo trapianto di fegato abbiamo considerato un quadro di insufficienza renale cronica in presenza di valori di VFG \leq 60 ml/min stimata attraverso la formula MDRD.

Complicanze neoplastiche

Per fare una diagnosi precoce di eventuali neoplasie “*de novo*” insorte dopo trapianto di fegato i pazienti sono stati sottoposti ai seguenti accertamenti.

Per quanto riguarda il tumore della mammella è stata eseguita una mammografia ogni 12-24 mesi e per valutare l'eventuale sviluppo di un carcinoma della cervice uterina è stato eseguito annualmente come test di screening il Pap test .

Per individuare un tumore all'ovario sono stati effettuati l'esame clinico, l'ecografia pelvica per via transvaginale e la determinazione del Ca -125 una volta all'anno (Lu HK. 2004).

Per il tumore della prostata è stato fatto il dosaggio del PSA insieme alla visita urologica negli uomini sopra i 50 anni, come raccomandato dall'American Cancer Society e dall'American Urological Association.

Per il cancro del colon retto ai pazienti con età superiore ai 50 anni è stato eseguito lo screening che prevede la ricerca del sangue occulto fecale ripetuta annualmente, e la colonscopia ogni 5 anni. Nei

pazienti con familiarità per la neoplasia, lo screening è stato più aggressivo con l'esecuzione della colonscopia più frequentemente.

Nei pazienti con particolari fattori di rischio, quali ad esempio tabagismo e/o trapianto per cirrosi alcolica, sono stati effettuati esami quali Rx torace, eventuale broncoscopia e/o TAC torace, EGDS e colonscopia, per l'elevato rischio di neoplasie dell'apparato respiratorio e dell'apparato gastro-intestinale, rispettivamente (Burra P 2005).

Nel caso di pazienti sottoposti a trapianto per epatocarcinoma, la sorveglianza per una recidiva dell'epatocarcinoma (HCC) è stata basata sulla valutazione di un'ecografia epatica ogni 3 mesi e di una TAC dell'addome superiore con tecnica trifasica ogni 6 mesi per i primi tre anni dopo trapianto, e sulla base di un'ecografia epatica ogni 6 mesi e di una TAC annuale per i 2 anni successivi.

Per quanto riguarda lo screening delle neoplasie cutanee, è stata eseguita una visita dermatologica ogni 6 mesi.

Complicanze metaboliche

Diabete mellito

La diagnosi di diabete mellito è stata posta in seguito al riscontro di una glicemia:

- > 126 mg/dl (7 mmol/l) a digiuno (nessun apporto calorico nelle ultime 8 ore);
- >200 mg/dl (11,1 mmol) dopo 2 ore da un carico orale di glucosio (OGGT= 75 gr);
- >200 mg/dl in qualsiasi momento della giornata accompagnato dai sintomi classici quali poliuria, polidipsia, calo ponderale.

Iperlipidemie

La diagnosi di ipercolesterolemia è stata posta sulla base del riscontro di un valore di colesterolo totale nel siero maggiore od uguale a 240 mg/dl (LDL160 mg/dl, HDL < 35 mg/dl).La diagnosi di ipertrigliceridemia è supportata dall'individuazione di un valore di trigliceridi nel siero maggiore a 200 mg/dl.

Complicanze cardiovascolari

L'ipertensione arteriosa "de novo" è stata diagnosticata dal riscontro in pazienti trapiantati precedentemente normotesi di una pressione arteriosa con valori:

- $\geq 140/90$ in pazienti non diabetici;
- $\geq 130/80$ mmHg in pazienti diabetici.

La cardiopatia ischemica è stata diagnosticata mediante l'esecuzione dei seguenti esami:

- Accurata anamnesi cardiologia finalizzata ad individuare la presenza di eventuali fattori di rischio cardio-vascolari (età, familiarità, fumo di sigarette, diabete mellito, ipercolesterolemia ecc..) e precedenti anamnestici;
- Elettrocardiogramma;
- Test da sforzo al cicloergometro;
- Ecocardiogramma con stress farmacologico con dobutamina;
- Coronarografia, nel solo caso di positività dell'ECG e/o all'ecocardiogramma e/o del test da sforzo

Lo scompenso cardiaco è stato diagnosticato mediante:

- Anamnesi (patologie precedenti e disturbi);
- Esame obiettivo
- Ecocardiogramma

Le aritmie (quali fibrillazione atriale cronica o parossistica, extrasistoli) sono state diagnosticate mediante:

- ECG
- ECG dinamico sec. Holter

3.4. ANALISI STATISTICA

Le variabili quantitative (età, CHILD e MEL pre OLT, esami di laboratorio di funzionalità del graft e di funzionalità renale come pure i dosaggi dei farmaci immunosoppressivi e i loro livelli ematici) sono state analizzate in modo descrittivo riportando la mediana, il minimo ed il massimo.

Per quanto riguarda le variabili qualitative (sesso M/F, eziologia dell'epatopatia di base, sviluppo di complicanze dopo trapianto, schema di terapia immunosoppressiva utilizzato) sono stati riportati il numero e la percentuale di casi in ciascuna categoria.

Le variabili parametriche sono state confrontate fra i vari gruppi indipendenti di pazienti analizzati mediante la t di Student e per quanto riguarda le variabili non parametriche con il test di chi-quadrato o il test esatto di Fisher a seconda delle condizioni di applicabilità.

E' stata eseguita uno studio di regressione logistica univariata per individuare i possibili fattori di rischio per sviluppo dopo trapianto di infezioni opportunistiche medio-gravi e di insufficienza renale cronica e fattori di rischio di mortalità. La presenza di MGUS persistente e altri fattori di rischio per lo sviluppo di infezioni opportunistiche medie-gravi, di insufficienza renale e di mortalità post trapianto di fegato sono stati poi introdotti in un modello di regressione logistica multivariata. I risultati delle regressioni logistiche sono stati espressi riportando il valore di p , dell'*odds-ratio* e del relativo intervallo di fiducia al 95% (IC95%). Nell'analisi multivariata sono stati considerati statisticamente significativi i fattori con $p < 0,05$.

Infine, per analizzare gli effetti della presenza di una GM sulla sopravvivenza dopo trapianto sono state applicate le curve di sopravvivenza secondo Kaplan-Maier. L'analisi statistica per ciò che concerne le curve di sopravvivenza in relazione alla presenza o meno di una MGUS è stata effettuata secondo Kaplan-Meier. Il confronto tra le curve di sopravvivenza è stato effettuato con il Log-rank test.

4 RISULTATI

Questo è uno studio clinico in parte retrospettivo, in parte prospettico.

In tal studio sono stati inclusi 50 pazienti consecutivi sottoposti a trapianto di fegato per epatopatia avanzata in un periodo di tempo compreso dal 1995 al 2007. Tali pazienti sono stati seguiti nel periodo pre-trapianto di fegato e nel follow up post trapianto presso l'Ambulatorio Epatologico della Clinica Medica V riconosciuto dal 2001 come "Centro regionale di riferimento delle malattie di fegato".

Come criterio di inclusione è stato richiesto un follow up post trapianto almeno superiore a 12 mesi. Nella raccolta ed elaborazione dei dati abbiamo considerato termine del follow up post trapianto Maggio 2008 o l'ultimo controllo ambulatoriale per i pazienti deceduti o che non si sono più presentati alle visite di controllo presso il nostro Centro (drop out).

Il gruppo di pazienti studiati è composto da 29 femmine (19,3%) e 121 maschi (80,6%), presenta un valore mediano dell'età al momento del trapianto di 52,5 anni (21-65 anni) e al termine del follow up di 59 anni (26-74 anni).

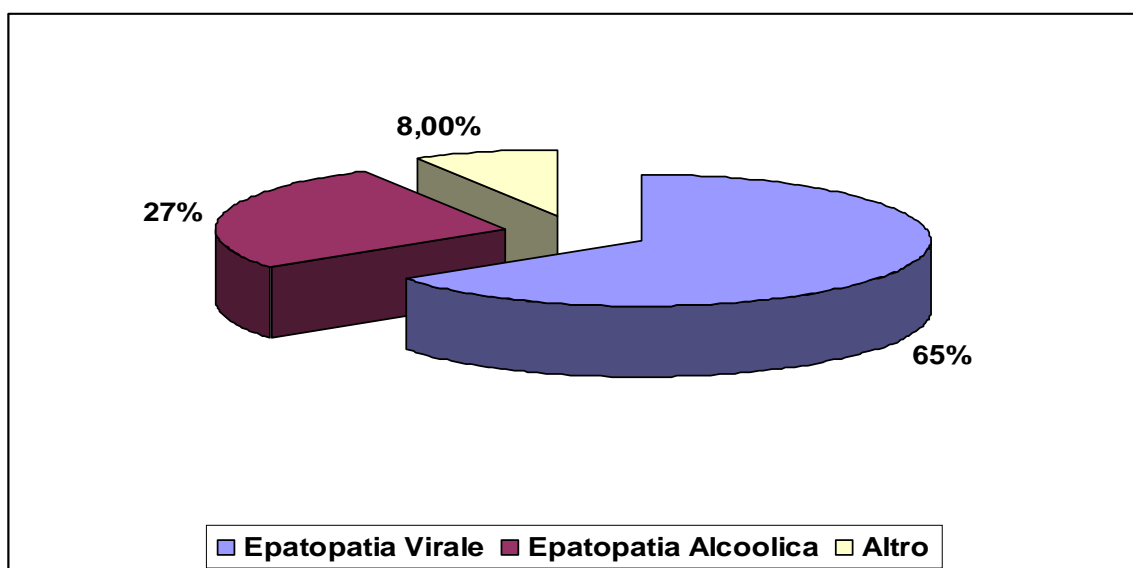
La durata media del follow-up è risultata pari a $84.7 \pm 6,23$ mesi (range 12 – 192 mesi).

L'eziologia dell'epatopatia di base che ha portato il paziente al trapianto è così distribuita nella nostra casistica:

- Eziologia virale: presente in 98 pazienti su 150 (65%) di cui:
 - o cirrosi epatica HBV correlata: 34 pazienti. Sei di questi pazienti avevano un epatocarcinoma su fegato cirrotico
 - o cirrosi epatica HCV correlata: 58 pazienti. Dodici di questi pazienti avevano sviluppato un epatocarcinoma su fegato cirrotico
 - o cirrosi epatica HCV-HBV correlata: 6 paziente.
- Eziologia alcolica: presente in 41 pazienti su 150 (27 %) di cui :

- Solo alcool: 34 pazienti. Uno di questi pazienti aveva sviluppato un epatocarcinoma.
 - Alcool + HBV: 3 pazienti,
 - Alcool + HCV: 4 pazienti,
- Altre cause: presenti in 11 pazienti su 150 (7.3 %). In particolare, fra le cause di epatopatia cronica, si segnala cirrosi epatica autoimmune, cirrosi biliare primitiva, colangite sclerosante primitiva.

Figura n° 1: causa dell' epatopatia di base dei pazienti dello studio



Tale distribuzione di prevalenza dei vari tipi di epatopatia di base corrisponde a quelle descritte dai dati in letteratura relative alle indicazioni a trapianto di fegato per epatopatia cronica in Italia e in Europa (Rene A, 2009; Linee Guida AISF sul trapianto di fegato).

Complessivamente al momento del trapianto i pazienti avevano un valore mediano di CHILD e di MELD rispettivamente di 9 (range 5-13) e di 14 (range 7-31) e il 14,6% dei pazienti aveva un'insufficienza renale prima del trapianto o aveva avuto episodi di sindrome epato-renale prima del trapianto.

I pazienti sono stati sottoposti ad uno stretto follow up sia prima che dopo il trapianto con visite mediche ed accertamenti bioumorali e strumentali, come precedentemente descritto nei capitoli di “Materiali e Metodi”.

I dati relativi alla presenza di una gammopatia monoclonale di incerto significato sono stati analizzati nei pazienti prima e dopo il trapianto di fegato, al fine di valutarne l’evoluzione clinica.

4.1. MGUS NEI PAZIENTI CANDIDATI AL TRAPIANTO

In 18 pazienti è stata diagnosticata una MGUS prima del trapianto di fegato. La prevalenza quindi di MGUS nei pazienti candidati al trapianto è risultata del 12%.

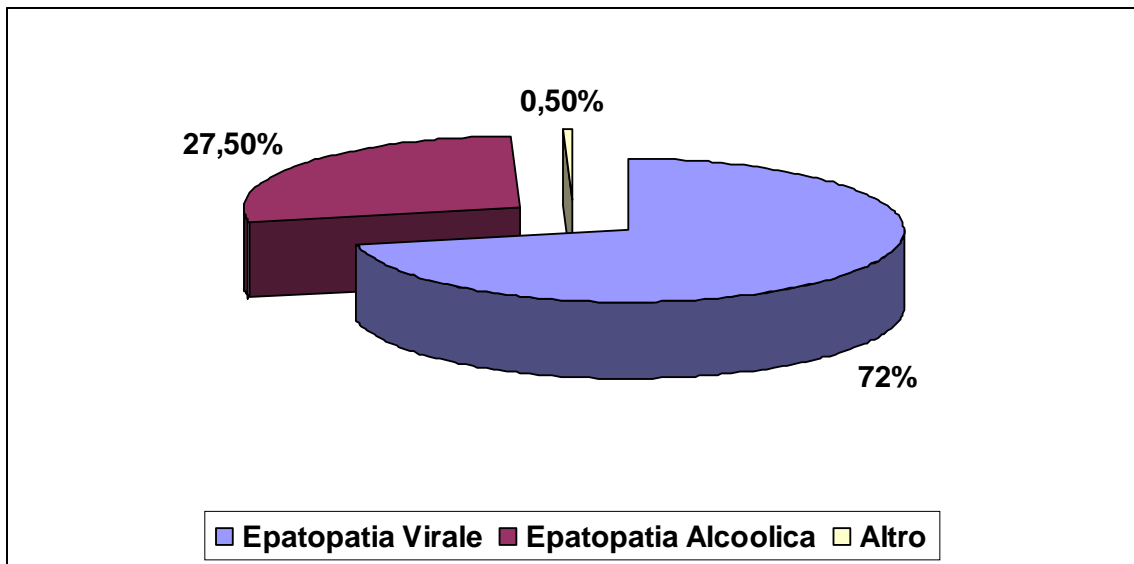
La prevalenza di gammopatia monoclonale nei pazienti candidati al trapianto di fegato è risultata superiore in forma statisticamente significativa ($p < 0.05$) a quella riscontrata nella popolazione generale aumenta di età superiore ai 50 anni che è pari al 3,2% (Bladè J, 2006).

L’età di questo gruppo di pazienti al momento del trapianto era di 53,5 anni (valore mediano, range 27-63 anni) , 5 pazienti erano di sesso femminile e 13 di sesso maschile.

Per quanto riguarda l’eziologia dell’epatopatia di base è stata osservata la seguente distribuzione:

- Eziologia virale: presente in 13 pazienti su 18 (72,2 %) di cui :
 - o cirrosi epatica HBV correlata: 6 pazienti;
 - o cirrosi epatica HCV correlata: 6 pazienti;
 - o cirrosi epatica HCV-HBV correlata: 1 paziente.
- Eziologia alcolica: presente in 5 pazienti su 18 (27,8 %) di cui :
 - o Solo alcool: 4 pazienti;
 - o Alcool + HCV : 1 pazienti,
- Altre cause: presente in 1 paziente su 18.

Figura n°2: cause dell'epatopatia di base in pazienti con MGUS insorta prima del trapianto



La mediana dei valori di MELD e CHILD al momento del trapianto era rispettivamente 10 e 15 con valori minimi e massimi rispettivamente di 6-13 e 8-22. Tre di questi pazienti avevano avuto episodi di sindrome epato-renale in anamnesi o presentavano un quadro di insufficienza renale al momento del trapianto.

Per quanto riguarda la tipologia di MGUS nei pazienti candidati al trapianto abbiamo rilevato quanto segue:

- IgG: presente in 13 pazienti su 18 (72,2%);
- IgM: presente in 2 pazienti su 18 (11,1%);
- IgA: presente in 2 pazienti su 18 (11,1%);
- IgG + IgA: presente in un paziente su 18 (5,6%)

Confrontando la tipologia di MGUS presente nei pazienti candidati al trapianto di fegato con quelli riscontrati nella popolazione generale (Kyle, Rajkumar 2006) non sono state riscontrate significative.

Per quanto riguarda il livello della gammopatia monoclonale nel siero, prima del trapianto e durante il follow up post trapianto, in 7 pazienti è risultata sempre non dosabile, in un paziente è risultata

sempre superiore a 10 gr/L e negli altri pazienti sono stati riscontrati valori inferiori a 5 gr/L. La proteinuria di Bence Jones è stata riscontrata in 3 casi.

Confrontando i pazienti in cui è stata diagnosticata una condizione di MGUS prima del trapianto (18) e quelli senza MGUS prima del trapianto (132) non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa per quanto riguarda l'età, l'eziologia dell'epatopatia di base, il CHILD e il MELD pre-trapianto. Nel gruppo di pazienti in cui si è sviluppato una MGUS prima del trapianto è stata riscontrata una frequenza maggiore di insufficienza renale prima del trapianto (20% vs 12%; p= NS) (Tab 1).

Tabella n° 1: caratteristiche di base dei pazienti che hanno sviluppato MGUS prima del trapianto e dei pazienti che non hanno sviluppato MGUS prima del trapianto.

	MGUS pre OLT (18 pazi)	no MGUS pre OLT (132 pazi)	P
Sesso F/M	3/15	24/86	NS
Età al momento del trapianto	53,8 (27-63)	52 (21-67)	NS
Eziologia (virus/alcool/altro) (%)	72/22/5	70/22,5/7,5	NS
CHILD pre OLT	10 (6-13)	8 (5-13)	NS
MELD pre OLT	15 (8-22)	14 (7-31)	NS
Insuff renale pre OLT (%)	20	12	NS

Legenda: i valori dell'età del CHILD e del MELD sono espressi riportando i valori della mediana e del valore minimo e massimo tra parentesi.

In 10 dei 18 pazienti (55,5%) che presentavano una MGUS in fase pretrapianto, durante il follow up post trapianto la gammopatia monoclonale si è negativizzata; ciò vuol dire non è stato più possibile individuare la presenza di una proteina M nel siero con le tecniche di elettroforesi,

immunofissazione ed immonosottrazione. In seguito alla negativizzazione della MGUS, l'elettroforesi delle proteine sieriche è risultata nella norma o compatibile con uno stato infiammatorio. La negativizzazione della gammopatia monoclonale si è verificata a distanza di $21 \pm 5,43$ mesi dal trapianto. In 5 di questi pazienti il livello della proteina M, prima della sua scomparsa, era risultato sempre non dosabile; in 3 casi in dosaggio era risultato inferiore a 4 gr/l per poi diventare durante il follow up post trapianto non dosabile e quindi non più evidenziabile. Non abbiamo dati sicuri sul dosaggio della proteina M degli altri due pazienti prima della sua negativizzazione.

Negli altri 8 pazienti la MGUS comparsa prima del trapianto è rimasta anche durante tutto il follow up post trapianto. In 4 casi il dosaggio è risultato sempre inferiore a 1 gr/l, in due casi il dosaggio era > 10 gr/l. Non abbiamo dati sicuri sull'andamento del dosaggio della proteina M negli altri 2 casi.

Confrontando il gruppo di pazienti che avevano la MGUS prima del trapianto e che l'hanno conservata anche nel post-trapianto rispetto al gruppo di pazienti nei quali gammopatia monoclonale si è negativizzata dopo il trapianto, non ci sono differenze statisticamente significative per quanto riguarda l'età al momento del trapianto, l'eziologia dell'epatopatia di base, la gravità dell'epatopatia di base valutata attraverso lo score CHILD e il punteggio MELD, la presenza di insufficienza renale pre-trapianto (Tab n°2). Non è stata evidenziata alcuna differenza anche in relazione allo schema di terapia immunosoppressiva e dosaggi degli immunosoppressori al termine del follow up (Tab n° 5). Per ciò che concerne la funzionalità del graft, nei pazienti in cui la MGUS persiste dopo trapianto, al termine del follow up sono stati riscontrati valori di ALP, GGT e bilirubinemia totale tendenzialmente maggiori rispetto a pazienti con MGUS transitoria. (Tab n° 4). A conferma di questo dato, nei pazienti in cui la MGUS persiste dopo il trapianto la percentuale di recidive dell'epatopatia di base è tendenzialmente maggiore rispetto ai pazienti in cui la MGUS si negativizza (70% vs 30%, $p=0.06$).

Non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa per ciò che concerne lo sviluppo nel post trapianto di reazioni di rigetto epatocellulare e diabete mellito. I casi di insufficienza renale al termine del follow up sono risultati tendenzialmente più frequenti nei pazienti con MGUS persistente (75% vs 40 %, p= NS), confermato da valori di creatininemia ed azotemia tendenzialmente maggiori (Tab n° 3 e 4). Il numero complessivo di infezioni è risultato sovrapponibile nei due gruppi di pazienti con una percentuale di infezioni medio-gravi maggiori nei pazienti con MGUS persistente, indipendentemente dalla loro eziologia (25% vs 10%, p= 0,03); le infezioni acute da parte di CMV e EBV hanno avuto un'uguale distribuzione fra i due gruppi di pazienti.

Per quanto riguarda lo sviluppo di neoplasie dopo trapianto, in un paziente con MGUS permanente è stata fatta diagnosi istologica di mieloma micromolecolare asintomatico a distanza di 6 anni dal trapianto. In questo paziente si era verificato un progressivo aumento del dosaggio della proteina M (da 10 g/l a 16 g/l). La diagnosi di mieloma è avvenuta a distanza di 6 anni dal trapianto in coincidenza con un aumento della proteina monoclonale e di una tipizzazione non più solo di tipo IgG ma anche di tipo IgM. Un paziente con MGUS che si era negativizzata dopo trapianto ha sviluppato in seguito un linfoma intestinale. Per quanto riguarda il tasso di mortalità e le cause di decesso (Tab n°6) i numeri sono troppo esigui per poter fare considerazioni statistiche.

Tabella n° 6: cause di morte dei pazienti con MGUS permanente e MGUS transitoria comparse prima del trapianto di fegato.

	Paz con MGUS pre OLT permanente (8 pz)	Paz con MGUS pre OLT transitoria (10 pz)
Mortalità	3 pazienti	1 pazienti
Neoplasie	-----	1 paziente (linfoma)
Recidiva	2 pazienti su 3 (66,6%)	-----
Altre	1 paziente su 3 (33,4%)	-----

Tabella n° 2: caratteristiche di base dei pazienti che hanno sviluppato una MGUS permanente prima del trapianto e dei pazienti che hanno sviluppato una MGUS prima del trapianto che si è poi negativizzata.

	MGUS pre OLT permanente (8 paz)	MGUS pre OLT transitoria (10 paz)	p
Sesso F/M	1/7	2/10	NS
Età	55,5 (50-63)	52 (27-63)	NS
Eziologia (virus/alcool/altro) (%)	50/37,5/12,5	80/20/0	NS
CHILD pre OLT	10 (6-13)	10 (7-12)	NS
MELD pre OLT	15 (14-22)	14 (8-21)	NS
Insuff renale pre OLT (%)	20	10	NS

Legenda: i valori dell'età del CHILD e del MELD sono espressi riportando i valori della mediana e del valore minimo e massimo tra parentesi.

Tabella n°3: complicanze post OLT nei pazienti che hanno sviluppato una MGUS permanente prima del trapianto e nei pazienti che non hanno sviluppato una MGUS prima del trapianto che si è poi negativizzata.

	MGUS pre OLT permanente (8 paz)	MGUS pre OLT transitoria (10 paz))	p
Infezioni opportunistiche	40	35	NS
Infezioni medio-gravi	25	10	0,04
Infezioni acute da CMV	50	25	NS
Infezioni acute da EBV	14	11	NS
Rigetto epatocellulare	12,5	20	NS
Recidiva di epatopatia	75	30	0,06
Diabete	12,5	50	NS
Insufficienza renale	75	40	NS
Neoplasie “ <i>de novo</i> ”	12,5	10	NS
Mortalità	37,5	10	NS

Legenda: tutti valori sono espressi come valori percentuali

Tabella n°4: esami bioumorali al termine del follow up nei pazienti che hanno sviluppato una MGUS permanente prima del trapianto e dei pazienti che non hanno sviluppato una MGUS prima del trapianto che si è poi negativizzata.

	MGUS pre OLT permanente (8 paz)	MGUS pre OLT transitoria (10 paz)	p
AST (U/L)	22.00 (19.00-159.00)	24 (14- 61)	NS
ALT (U/L)	19 (11-101)	26 (8-83)	NS
GGT (U/L)	53 (12-137)	23 (10-53)	NS
ALP (U/L)	105.00 (56-628)	75 (46-106)	NS
Bilirubina tot (µmol/L)	22,10 (10.7-204)	11,70 (4.30-21.30)	NS
Albumina (g/L)	44 (21-52)	43 (40-45)	NS
PT (%)	88 (65-90)	91 (24-102)	NS
Emoglobina (g/dl)	15 (9-16.3)	13.85 (11.50-14.80)	NS
Urea (mmol/L)	8.45 (4.50- 23.20)	7.85 (3.60- 13.90)	NS
Creatinina (µmol/L)	123.00 (94.00-252.00)	89.00 (63-199.00)	NS

Legenda: i dati sono espressi riportando i valori della mediana e del valore minimo e massimo tra parentesi.

Tabella n°5: caratteristiche terapia immunosoppressiva nei pazienti che hanno sviluppato una MGUS permanente prima del trapianto e dei pazienti che non hanno sviluppato una MGUS prima del trapianto che si è poi negativizzata.

	MGUS pre OLT permanente (8 paz)	MGUS pre OLT transitoria (10 paz)	p
Schema di terapia (mono-duplica-triplice)	0/6/2	1/6/3	NS
CyA/FK 506/altro	1/7/0	4/5/1	NS
Durata terapia steroidea (mai assunti/ <6 mesi/ >6 mesi)	0/2/5	3/1/6	NS
Dose CyA al termine follow up (mg/die)	50 (1 paziente)	150 (125-175)	NS
Livello plasm CyA al termine follow up (µg/L)	200	165 (150-250)	NS
Dose FK 506 al termine follow up (mg/die)	2,25 (2-3)	2,5 (1-5)	NS
Livello FK 506 al termine follow up (µg/L)	5,70 (4-13)	6,15 (5-12)	NS

Legenda: CyA= ciclosporina, FK 506= tacrolimus. I dati relativi alla dose e al livello ematico di ciclosporina e tacrolimus sono espressi riportando i valori della mediana e del valore minimo e massimo tra parentesi.

4.2. PAZIENTI CON MGUS POST TRAPIANTO

Dopo il trapianto di fegato 49 pazienti che non presentavano una gammopatia monoclonale nel pre-trapianto hanno sviluppato una MGUS nel post-trapianto (“*de novo*”), la cui prevalenza è risultata pari del 37%. La prevalenza di MGUS “*de novo*” nei pazienti sottoposti a trapianto è risultata superiore in forma statisticamente significativa ($p < 0,05$) sia rispetto alla popolazione di pazienti con malattia epatica cronica in attesa di trapianto (12%) sia rispetto alla popolazione generale di età > 50 anni popolazione generale (3.3%).

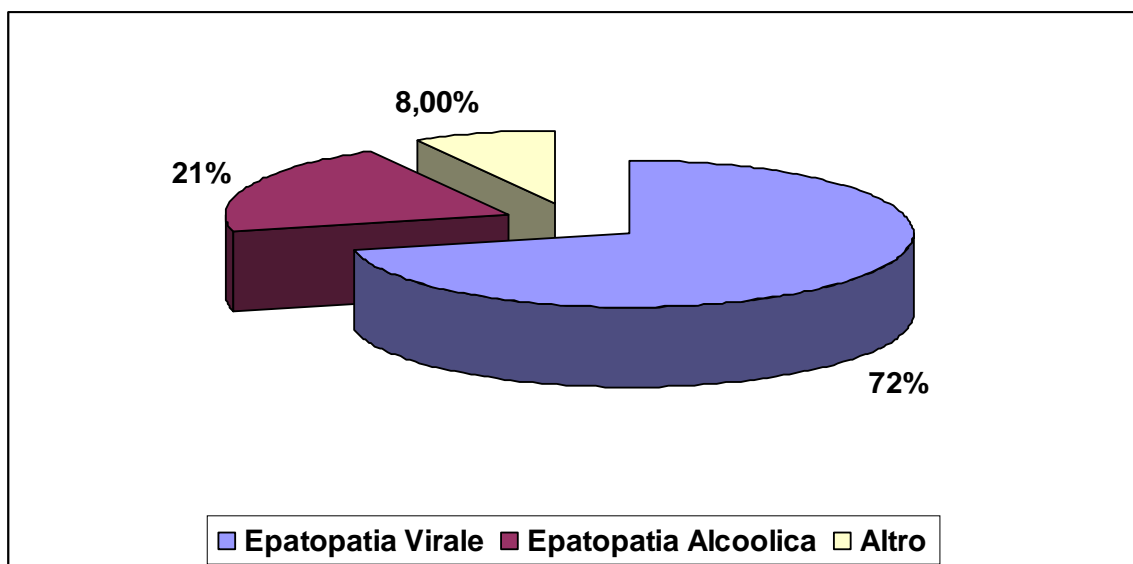
In questi pazienti la MGUS è stata diagnosticata mediamente 20.71 ± 5.32 mesi dopo il trapianto.

L'età di questo gruppo di pazienti al momento del trapianto espresso come mediana, valore minimo e massimo era 55 anni (38-67 anni), 11 pazienti erano di sesso femminile e 38 di sesso maschile.

Per quanto riguarda l'eziologia dell'epatopatia di base è stata osservata la seguente distribuzione:

- Eziologia virale: presente in 35 pazienti su 49 (71,4 %) di cui :
 - o cirrosi epatica HBV correlata: 11 pazienti;
 - o cirrosi epatica HCV correlata: 23 pazienti;
 - o cirrosi epatica HCV-HBV correlata: 1 paziente.
- Eziologia alcolica: presente in 10 pazienti su 49 (20,4%) di cui :
- Altre cause: presente in 4 paziente su 49 (8%).

Figura n° 3: cause dell'epatopatia di base dei pazienti con MGUS "de novo" insorta dopo trapianto.



I valori di MELD e CHILD al momento del trapianto, espressi come mediana, valore minimo e massimo, erano rispettivamente 8 (5-13) e 12 (7-28). Otto di questi pazienti avevano avuto episodi di sindrome epato-renale in anamnesi o presentavano un quadro di insufficienza renale al momento del trapianto.

Per quanto riguarda la tipologia di gammopatia monoclonale nei pazienti candidati al trapianto abbiamo rilevato quanto segue:

- IgG: presente in 36 pazienti su 48 (73 %);
- IgM: presente in 3 pazienti su 48 (6,2%);
- IgA: presente in 2 pazienti su 48 (4,2%);
- IgG + IgA: presente in 1 paziente su 48 (2,1%);
- Non conosciuti: 7 pazienti su 48 (14,5%)

I vari tipi di gammopatia monoclonale in questo gruppo di pazienti hanno la stessa distribuzione osservata nella popolazione generale (Kyle, Rajkumar 2006).

Per quanto riguarda il livello della gammopatia monoclonale nel siero è risultato sempre inferiore a 5 gr/l. In 24 pazienti la proteina M è risultata addirittura non dosabile. La proteinuria di Bence Jones è stata riscontrata in 3 casi.

Confrontando i pazienti che hanno sviluppato dopo trapianto di fegato una condizione di MGUS (49) rispetto ai pazienti che non hanno mai sviluppato una condizione di MGUS (né prima né dopo trapianto, 83 pazienti) non è stata evidenziata alcuna differenza per quanto riguarda il sesso, l'eziologia dell'epatopatia di base, il CHILD e il MELD e la presenza di insufficienza renale al momento del trapianto. Nei pazienti che hanno sviluppato MGUS dopo trapianto l'età è risultata significativamente maggiore rispetto all'altro gruppo di pazienti (Tab n° 7).

Tabella n° 7: caratteristiche di base dei pazienti che hanno sviluppato MGUS dopo trapianto e dei pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS.

	MGUS post OLT (49 paz)	MGUS mai (83 paz)	p
Sesso F/M	11/38	13/70	NS
Età media (anni)	55 (38-67)	50 (21-66)	0,04
Eziologia (virus/alcool/altro) (%)	61/30/8	67/25/7,2	NS
CHILD pre OLT	8 (5-13)	8,5 (5-13)	NS
MELD pre OLT	12 (7-28)	14 (7-31)	NS
Insuff renale pre OLT (%)	76	82	NS

Legenda: i valori dell'età del CHILD e del MELD sono espressi riportando i valori della mediana e del valore minimo e massimo tra parentesi.

Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa anche per quanto riguarda lo schema di terapia immunosoppressiva utilizzato dopo trapianto di fegato, la durata di un'eventuale terapia steroidea, livelli ematici e dosaggi di immunosoppressori utilizzati (Tab n° 10). Per quanto riguarda la funzionalità del graft non sono state confrontate differenze significative dei valori di AST, ALT, GGT e ALP e bilirubinemia, dato confermato da una prevalenza di recidiva dell'epatopatia di base sovrapponibile (55% vs 53%, p= NS, Tab n° 9).

Tabella n° 8: complicanze post OLT nei pazienti che hanno sviluppato MGUS dopo trapianto e nei pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS.

	MGUS post OLT (49 paz)	MGUS mai (83 paz)	p
Infezioni opportunistiche	51	43	NS
Infezioni medio-gravi	26	12,5	0,03
Infezioni acute da CMV	26,19	16,44	NS
Infezioni acute da EBV	2,38	3,9	NS
Rigetto epatocellulare	24	16	NS
Recidiva di epatopatia	55	53	NS
Diabete	20	27	NS
Insufficienza renale	67	41	0,0005
Neoplasie “ <i>de novo</i> ”	22,45	15,6	NS
Mortalità	26	18	NS

Legenda: tutti valori sono espressi come valori percentuali

Tabella n°9: esami bioumorali al termine del follow up nei pazienti che hanno sviluppato MGUS dopo trapianto e dei pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS.

	MGUS post OLT (49 paz)	MGUS mai (83 paz)	p
AST (U/L)	31 (14-251)	32,5 (12-183)	NS
ALT (U/L)	33,5 (8-216)	30 (4-207)	NS
GGT (U/L)	41 (7-1497)	35,5 (8-621)	NS
ALP (U/L)	98 (41-1370)	90 (40-700)	NS
Bilirubina tot (µmol/L)	16,2 (5,7-240)	14,3 (5,5-412)	NS
Albumina (g/L)	44 (29-49)	44 (26-51)	NS
PT (%)	83 (26-120)	80 (24-110)	NS
Emoglobina (g/dl)	13 (7,3-17,8)	13,8 (7,8-17,8)	NS
Urea (mmol/L)	10,2 (3,7-28)	7,8 (3,7-34)	0,0112
Creatinina (µmol/L)	117 (56-568)	94 (56-994)	0,006

Legenda: i dati sono espressi riportando i valori della mediana e del valore minimo e massimo tra parentesi.

Tabella n°10: caratteristiche terapia immunosoppressiva nei pazienti che hanno sviluppato MGUS dopo trapianto e dei pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS.

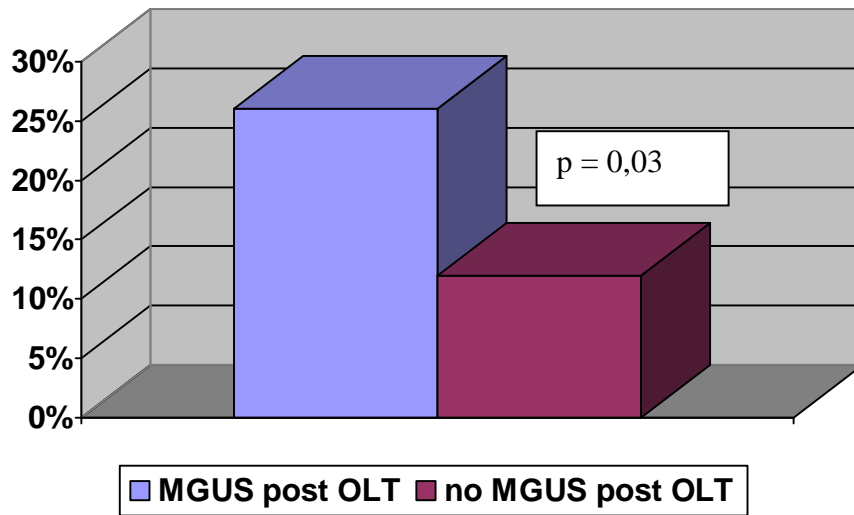
	MGUS post OLT (49 paz)	MGUS mai (83 paz)	p
Schema di terapia (mono-duplica-triplice) (%)	6/69/24	10,8/66/22,8	NS
CyA/FK 506/altro (%)	36/63/0	27,7/72/0	NS
Durata terapia steroidea (mai assunti/ <6 mesi/> 6 mesi) (%)	14/14/71	15,6/13/71	NS
Dose CyA Al termine follow up (mg/die)	100 (25-300)	125 (50-250)	NS
Livello plasm CyA Al termine follow up (µg/L)	305 (113-687)	332 (102-721)	NS
Dose FK 506 Al termine follow up (mg/die)	2 (0,5-6,5)	2,5 (0,5-7,5)	NS
Livello FK 506 Al termine follow up (µg/L)	5,9 (2,1-15)	4,5 (1,2-12,2)	NS

Legenda: CyA= ciclosporina, FK 506= tacrolimus. I dati relativi alla dose e al livello ematico di ciclosporina e tacrolimus sono espressi riportando i valori della mediana e del valore minimo e massimo tra parentesi.

Per quanto riguarda lo sviluppo delle altre complicanze post-OLT (Tab n° 8), fra questi due gruppi di pazienti, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative di prevalenza di rigetto epatocellulare, sviluppo di diabete e di neoplasie dopo trapianto. In particolare nessun paziente con MGUS post trapianto ha sviluppato mieloma multiplo o malattie linfoproliferative, mentre 4 pazienti che nella loro storia non avevano mai avuto MGUS hanno sviluppato linfomi non Hodgkin a localizzazione prevalentemente intestinale.

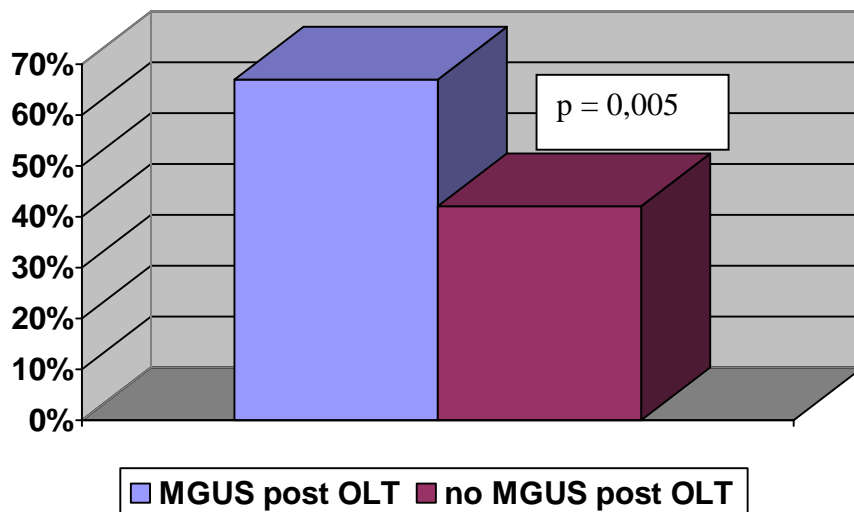
Non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa per quanto riguarda il numero totale di infezioni opportunistiche ed infezioni acute da EBV e da CMV post OLT, ma i pazienti con MGUS post trapianto, rispetto i pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS, hanno avuto più infezioni medio-gravi (26% vs 12,05%, p= 0,03, vedere Figura n° 1), indipendentemente dalla loro eziologia.

Figura 4: sviluppo di infezioni medio-gravi post OLT



E' stata inoltre riscontrata una differenza significativa per quanto riguarda lo sviluppo di insufficienza renale dopo trapianto. Al termine del follow up l'insufficienza renale è stata riscontrata nel 65% dei pazienti con MGUS post trapianto e nel 42% dei pazienti senza MGUS (p = 0.005, Fig n°1) con valori medi di azotemia e creatininemia significativamente maggiori (vedere Tab n° 9).

Figura 5: sviluppo di insufficienza renale post OLT



La mortalità è risultata tendenzialmente maggiore nel gruppo di pazienti con MGUS post trapianto (26% vs 18%, p= NS). Non è stata evidenziata una significatività per quanto riguarda le cause di decesso nei due gruppi di pazienti.

Tabella 11: cause di morte dei pazienti con MGUS post trapianto e dei pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS

	Pazienti con MGUS post OLT (49 pz)	Paz che non hanno mai sviluppato MGUS (83 pz)	P
Mortalità	13 pazienti (26,5%)	15 pazienti (18%)	NS
Neoplasie	5 pazienti su 13 (38,4%)	3 pazienti su 15 (20%)	NS
Recidiva	6 pazienti su 13 (46%)	6 pazienti su 15 (40%)	NS
Altre	2 paziente su 13 (15%)	6 paziente su 15 (40%)	NS

Considerando i 49 pazienti in cui si è sviluppata una condizioni di MGUS post trapianto, in 21 casi l'MGUS si è negativizzata durante il follow up (42,8%) a distanza di $51,05 \pm 10,45$ mesi dal trapianto.

4.3. PAZIENTI TRAPIANTATI CON MGUS PERMANENTE VERSUS PAZIENTI TRAPIANTATI SENZA MGUS O CON MGUS TRANSITORIA

Abbiamo quindi considerato complessivamente tutti i pazienti con una gammopatia persistente dopo trapianto comprendendo in questo gruppo sia gli 8 pazienti che avevano la MGUS prima del trapianto e l'hanno conservata dopo il trapianto, sia i 28 pazienti in cui una MGUS non transitoria è comparsa dopo il trapianto. Questo gruppo di pazienti è stato confrontato con quelli che o non

hanno mai avuto una MGUS (83 pazienti) o hanno avuto una MGUS transitoria comparsa prima (10 pazienti) o dopo il trapianto (31 pazienti).

Fra i due gruppi di pazienti non sono state evidenziate differenze significative per ciò che riguarda il sesso, il CHILD e il MELD, e i casi di insufficienza renale al momento del trapianto. L'età al momento del trapianto è risultata tendenzialmente maggiore nei pazienti con MGUS permanente rispetto agli altri pazienti ($p = 0,06$; Tab n° 12).

Tabella n° 12: caratteristiche di base dei pazienti con MGUS persistente e dei pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS o con MGUS transitoria.

	MGUS mai + MGUS transitoria (114 paz)	MGUS persistente (36 pazi)	p
Sesso F/M	21/94	8/28	NS
Età media (anni)	51 (21-67)	57 (38-64)	0,06
Eziologia (virus/alcool/altro) (%)	66/26/7	61/30/8	NS
CHILD pre OLT	9 (5-13)	8 (5-13)	NS
MELD pre OLT	14 (7-31)	12 (8-22)	NS
Insuff renale pre OLT (%)	17,78	26	NS

Legenda: i valori dell'età del CHILD e del MELD sono espressi riportando i valori della mediana e del valore minimo e massimo tra parentesi.

Non sono state riscontrate differenze significative per quanto riguarda la terapia immunosoppressiva, e in particolare per lo schema di terapia (monoterapia, duplice o triplice), il tipo di inibitore di calcineurina usato, la dose e il livello ematico del farmaco a termine del follow up e la durata di un'eventuale terapia steroidea (maggiore o minore a 6 mesi) (Tab n° 15). Per quanto riguarda lo sviluppo di complicanze dopo trapianto (Tab n°13) non sono state riscontrate differenze per quanto riguarda lo sviluppo di malattie cardiovascolari considerate complessivamente mentre sono stati registrati meno casi di diabete mellito nel gruppo di pazienti con MGUS

permanente (13,89% vs 29,82%, $p= 0,049$); non sono state evidenziate differenze per quanto riguarda i casi di rigetto epatocellulare. Le recidive dell'epatopatia di base sono tendenzialmente più frequenti nei pazienti con MGUS permanente (63% vs 50%, $p= NS$), gli esami di funzionalità del graft sono risultati sovrapponibili ad eccezione del valore dell'ALP risultata maggiore nei pazienti con MGUS persistente. I pazienti con MGUS permanente avevano anche valori di emoglobina minori rispetto agli altri pazienti (12,9 vs 13,9 g/dl) ($p < 0,005$). (Tab n° 14).

Tabella n° 13: *complicanze post OLT nei pazienti con MGUS persistente e nei pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS o con MGUS transitoria.*

	MGUS mai + MGUS transitoria (114 paz)	MGUS persistente (36 paz)	p
Infezioni opportunistiche	42,98	52,78	NS
Infezioni medio-gravi	13,16	30,56	0,0162
Infezioni acute da CMV	19,12	30,41	NS
Infezioni acute da EBV	4,81	3,23	NS
Rigetto epatocellulare	17,86	22,22	NS
Recidiva di epatopatia	50	63	NS
Diabete	29,82	13,89	0,05
Insufficienza renale	44,64	75	0,0015
Neoplasie “ <i>de novo</i> ”	14,91	25	NS
Mortalità	17,54	33,33	0,04

Legenda: tutti valori sono espressi come valori percentuali

Tabella n°14: esami biumorali al termine del follow up nei pazienti con MGUS persistente e nei pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS o con MGUS transitoria.

	MGUS mai + MGUS transitoria (114 paz)	MGUS persistente (36 paz)	p
AST (U/L)	29 (12-251)	30 (14-159)	NS
ALT (U/L)	29 (4-207)	43 (8-219)	NS
GGT (U/L)	33 (7-621)	61 (9-1490)	NS
ALP (U/L)	89 (40-700)	104 (56-1370)	0,02
Bilirubina tot (µmol/L)	13,8 (4,3-412)	15 (7,8-240)	NS
Albumina (g/L)	44 (26-51)	43 (21-53)	NS
PT (%)	0 (24-120)	82 (26-120)	NS
Emoglobina (g/dl)	13,9 7,8-15	12,90 (7,3-17)	0,02
Urea (mmol/L)	8,30 (3,6-34,4)	10,50 (4,50-28)	0,005
Creatinina (µmol/L)	96 (56-994)	165 (67-359)	0,0003

Legenda: i dati sono espressi riportando i valori della mediana e del valore minimo e massimo tra parentesi.

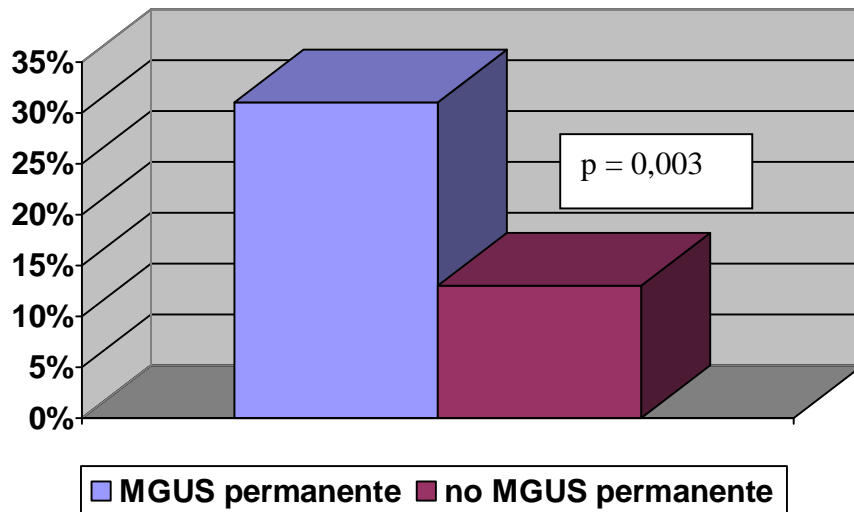
Tabella n°15: caratteristiche terapia immunosoppressiva nei pazienti con MGUS persistente e nei pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS o con MGUS transitoria.

	MGUS mai + MGUS transitoria (114 paz)	MGUS persistente (36 paz)	p
Schema di terapia (mono-duplice-triplice) (%)	9/67,5/22,8	5/66,6/27,7	NS
CyA/FK 506/altro (%)	29/69/0,8	33,3/66,6/0	NS
Durata terapia steroidea (mai assunti/<6 mesi/> 6 mesi) (%)	16,6/12,2/71	13,8/19,4/66,6	NS
Dose CyA al termine follow up (mg/die)	125 (25-500)	100 (25-300)	NS
Livello plasm CyA al termine follow up (µg/L)	135 (100-350)	93,40 (75-300)	NS
Dose FK 506 al termine follow up (mg/die)	2 (0,5-7,5)	2,5 (0,5-6,5)	NS
Livello FK 506 al termine follow up (µg/L)	5,70 (4-9,7)	4,70 (3-12)	NS

Legenda: CyA= ciclosporina, FK 506= tacrolimus. I dati relativi alla dose e al livello ematico di ciclosporina e tacrolimus sono espressi riportando i valori della mediana e del valore minimo e massimo tra parentesi.

Nei due gruppi di pazienti si è verificata un'uguale prevalenza di infezioni opportunistiche ma i pazienti con MGUS permanente hanno avuto infezioni più gravi rispetto agli altri pazienti (p= 0,018, Fig n° 2), indipendentemente dalla loro eziologia. Non c'è stata differenza statisticamente significativa per quanto riguarda le infezioni acute da CMV e EBV dopo il trapianto (Tab n° 13).

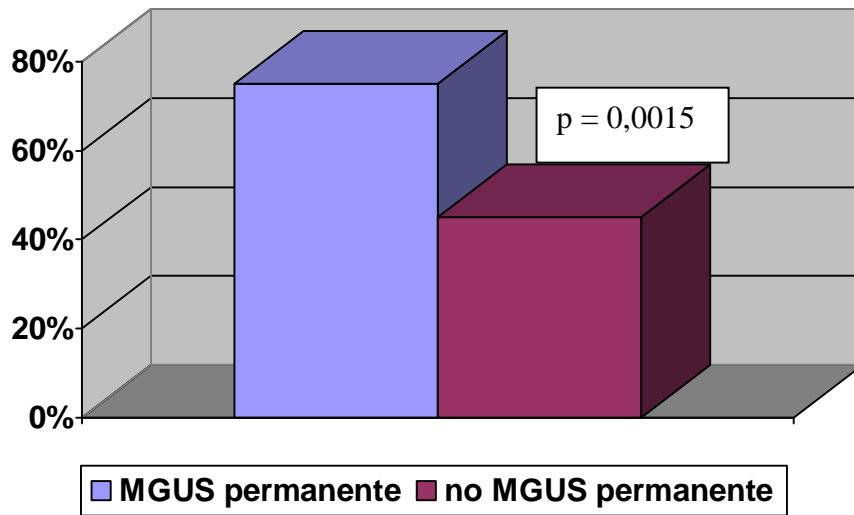
Figura 6: sviluppo di infezioni medio-gravi post OLT



I nuovi casi di neoplasia post trapianto di fegato hanno avuto un'uguale distribuzione fra i due gruppi. Nei pazienti con MGUS permanente è stata fatta diagnosi di un caso di mieloma micromolecolare e 8 casi di neoplasie solide; nei pazienti che non hanno mai avuto MGUS o che hanno avuto una gammopatia monoclonale transitoria sono stati diagnosticati dopo il trapianto 5 casi di linfomi, 11 casi di tumori solidi. Non è stato riscontrato nessun caso di mieloma.

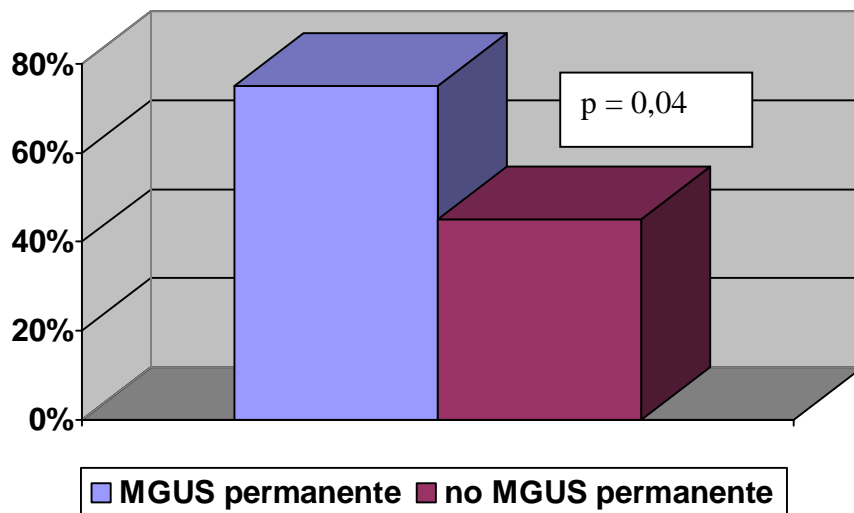
Il 75% dei pazienti con MGUS permanente avevano al termine del follow up un'insufficienza renale, presente solo nel 45% degli altri pazienti ($p = 0,0015$; Fig n°3); al termine del follow up infatti i valori di azotemia e creatinine mia, espressi come mediana, nei due gruppi di pazienti sono risultati rispettivamente 10,50 mmol/l (4,50-28 mmol/l) e 127,50 $\mu\text{mol/l}$ (67-359 $\mu\text{mol/l}$) versus 8,30 mmol/l (3,60-34 mol/l) e 96 $\mu\text{mol/l}$ (56-994 $\mu\text{mol/l}$) ($p < 0,05$).

Figura 7: sviluppo di insufficienza renale post OLT



Nei pazienti con MGUS permanente il tasso di mortalità al termine del follow up è risultato maggiore (33,3% vs 17,5%, p= 0,0438).

Figura 8: mortalità post OLT



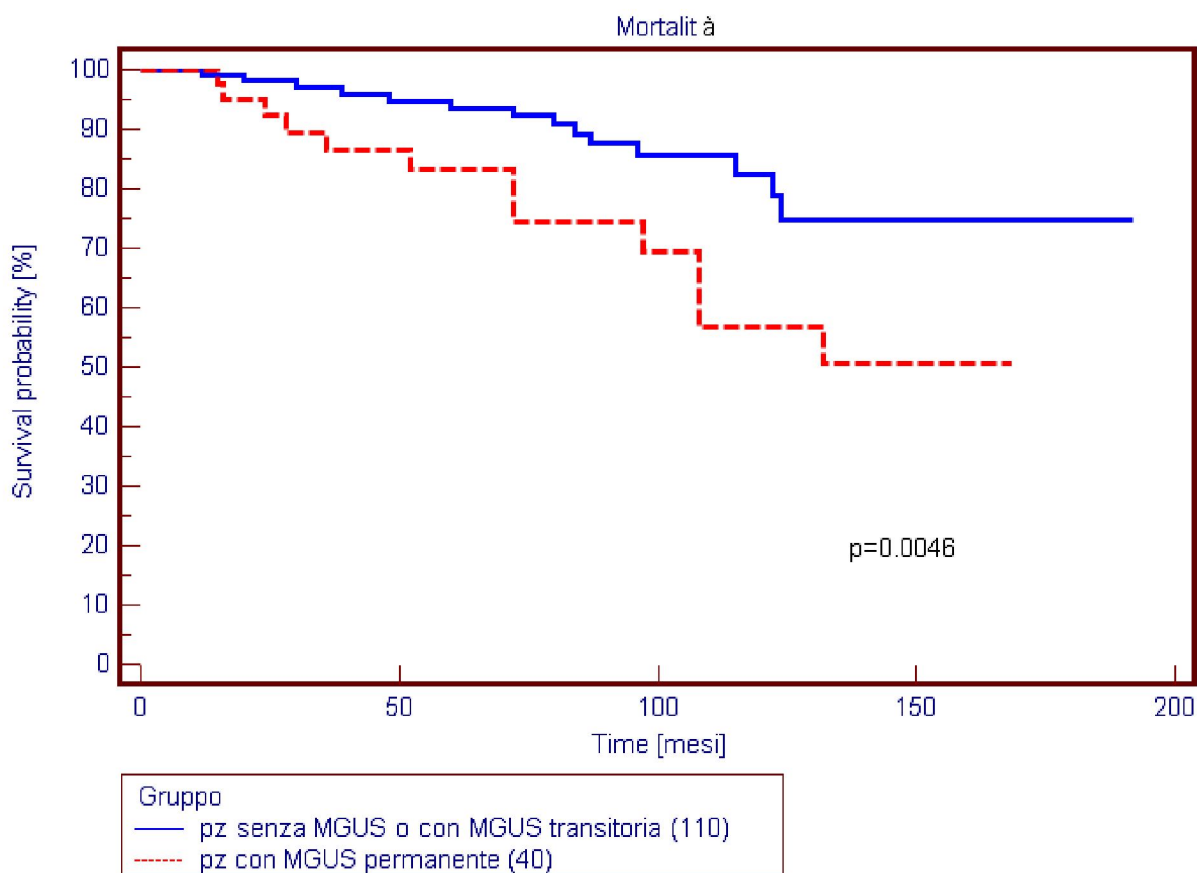
L'analisi delle cause di morte non ha evidenziato differenze significative tra due gruppi, come indicato nella tabella sottostante.

Tabella n° 16: cause di morte ne pazienti con MGUS persistente (sviluppato prima e dopo trapianto di fegato) e dei pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS o che hanno sviluppato una forma transitoria

	Pazienti con MGUS permanente (36 pz)	Pazienti che non hanno mai avuto MGUS o con MGUS transitoria (114 pz)	P
Mortalità	12 pazienti (33,3%)	20 pazienti (17,5%)	0,04
Neoplasie	4 pazienti su 12 (33,3%)	5 pazienti su 20 (25%)	NS
Recidiva	7 pazienti su 12 (58,3%)	10 pazienti su 20 (50%)	NS
Altre	12 paziente su 12(16,6%)	5 paziente su 20 (25%)	NS

Anche le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier evidenziano la maggiore probabilità di sopravvivenza nel tempo del gruppo di pazienti che non hanno mai avuto MGUS o con MGUS transitoria rispetto ai pazienti con MGUS permanente (Figura n° 9).

Figura 9: Curva di Kaplan-Meier relativa alla mortalità nei gruppi in analisi.



4.3.1. ANALISI UNIVARIATA E MULTIVARIATA

Per approfondire il peso relativo della presenza di una condizione di MGUS persistente come fattore di rischio di queste complicanze e di mortalità post trapianto di fegato abbiamo quindi eseguito un'analisi univariata e multivariata.

Per quanto riguarda lo sviluppo di infezioni opportunistiche medio gravi, l'analisi univariata ha evidenziato come possibili fattori di rischio lo sviluppo di una reazione di rigetto epatocellulare dopo trapianto, lo sviluppo di una condizione di MGUS persistente, lo sviluppo di diabete dopo trapianto e, in relazione alla terapia immunosoppressiva, l'uso di schemi di triplice terapia (inibitore di calcineurina + mofetil micofenolato + steroidi) rispetto a schemi di duplice terapia (inibitore calcineurina + mofetil micofenolato o steroidi) e l'uso di terapia steroidea per più di 6 mesi. All'analisi multivariata ha individuato come fattori di rischio indipendenti solo lo sviluppo di una reazione di rigetto epatocellulare dopo trapianto e lo sviluppo di una condizione di MGUS persistente (Tab n° 17)

Tabella n° 17: fattori di rischio indipendenti per infezioni opportunistiche medio-gravi (analisi multivariata)

	p	Stima di ODDS RATIO	Intervallo di confidenza	
Rigetto	0.0171	3.773	1.266	11.242
MGUS persistente	0.0111	3.766	1.353	10.480
Diabete post OLT	0.241	1.894	0.659	5.518
Terapia steroidea > 6 mesi	0.537	0.676	0.194	2.351
Schema terapia immunopressiva (triplice versus duplice)	0.334	0.572	0.183	1.780

Per quanto riguarda la sviluppo di insufficienza renale cronica dopo trapianto, l'analisi unitaria ha individuato come possibili fattori di rischio l'eziologia virale dell'epatopatia virale, la presenza di un quadro di insufficienza renale prima del trapianto, l'uso di ciclosporina rispetto al tacrolimus come immunosoppressore di base, lo sviluppo di diabete dopo trapianto e lo sviluppo di una

condizione di MGUS persistente. L'analisi multivariata ha individuato come fattori di rischio indipendenti per lo sviluppo di insufficienza renale dopo trapianto, la presenza già prima del trapianto di una condizione di insufficienza renale e l'uso della ciclosporina rispetto al tacrolimus come immunosoppressore di base (Tab n°18).

Tabella n°18: fattori di rischio indipendente di insufficienza renale post-OLT (analisi multivariata)

	p	Stima di ODDS RATIO	Intervallo di confidenza	
Eziologia alcolica (rispetto virale)	0.2293	1.969	0.750	5.171
Altra eziologia (rispetto virale)	0.6061	0.871	0.140	5.409
Insufficienza renale pre OLT	0.0227	3.585	1.195	10.755
Uso di CyA (rispetto a FK)	0.0097	4.301	1.424	12.988
Diabete post OLT	0.1151	2.217	0.824	5.967
MGUS persistente	0.1349	2.287	0.773	6.766

L'analisi univariata ha individuato come possibili fattori predittivi di mortalità dopo trapianto lo sviluppo di una condizione di MGUS persistente, le recidive dopo trapianto dell'epatopatia di base e lo sviluppo di gravi infezioni opportunistiche come pure di insufficienza renale cronica. Con l'analisi multivariata lo sviluppo dopo trapianto di fegato di gravi infezioni opportunistiche e di insufficienza renale si sono confermati fattori di rischio indipendenti di mortalità con valori di OR rispettivamente di 3,28 e 2,67. Lo sviluppo di recidive dell'epatopatia di base e da presenza di una MGUS persistente non sono risultati significativi come fattori di rischio di mortalità.

Tabella n°19: fattori di rischio indipendenti di mortalità post OLT (analisi multivariata)

	p	Stima di ODDS RATIO	Intervallo di confidenza	
Infezioni medio-gravi	0.0153	3.283	1.256	8.579
Insufficienza renale post-OLT	0.0340	2.667	1.077	6.606
Recidiva di epatopatia	0.1877	0.561	0.237	1.326
MGUS persistente	0.5025	1.375	0.542	3.486

5 DISCUSSIONE

Uno degli scopi principali della tesi è stato quello di definire la prevalenza delle gammopatie monoclonali ed in particolare della MGUS nei pazienti candidati al trapianto di fegato. La prevalenza della MGUS riscontrata nei pazienti candidati al trapianto (12%), è risultata superiore in forma statisticamente significativa ($p < 0.05$) a quella riscontrata nella popolazione generale dei pazienti di età superiore ai 50 anni, che è pari al 3.2% (Bladè J, 2006). Questo dato è facilmente spiegabile se si considera che il 65% dei pazienti inclusi nello studio presentava una patologia epatica ad eziologia virale ed in particolare ad un'eziologia HCV-correlata.

Come è noto l'epatite cronica HCV-correlata è spesso caratterizzata da disordini linfoproliferativi a carico dei linfociti B che possono tradursi nella comparsa di una crioglobulinemia in circa il 40% dei casi ma che comporta una gammopatia monoclonale asintomatica con produzione del fattore reumatoide in circa l'80% dei casi.

Per ciò che concerne più specificatamente la MGUS crio-ve esistono, tuttavia, solo 2 studi che hanno proposto risultati contraddittori. Andreone P et al. nel 1996 ha segnalato, in accordo con la nostra osservazione, una prevalenza di 8.1% nei pazienti con epatopatia cronica HCV-correlata (Andreone P, 1996) superiore a quella osservata nella popolazione generale. Per contro Mangia A. et al. nel 1996 ha segnalato nei pazienti con epatite cronica da HCV una prevalenza di MGUS pari all'1.9% e quindi non significativamente diversa da quella osservata nella popolazione generale (Mangia A et al., 1996). L'ipotesi che esista un'associazione non casuale tra lo sviluppo della MGUS e l'eziologia virale, in particolare quella da HCV, non è esclusa dai risultati dello studio dal momento che la presenza di una MGUS è risultata tendenzialmente più frequente nei pazienti con malattia epatica ad eziologia virale rispetto a quelli con malattia epatica ad altra eziologia (Figura n° 2 e 3). Questo dato può essere comunque la semplice conseguenza del fatto che la cirrosi ad eziologia virale rappresenta la principale indicazione al trapianto nella nostra casistica. A conferma

di ciò la prevalenza della MGUS non è risultata diversamente distribuita nei pazienti candidati al trapianto quando sono stati distinti per eziologia (Tabella n° 1). In questo senso i risultati dello studio sembrano differire dalle osservazioni proposte in precedenza da Andreone P. et al (Andreone P et al., 1996) e da Mangia A et al. (Mangia A, 1996).

La prevalenza di MGUS “*de novo*” nei pazienti sottoposti a trapianto è risultata pari al 37% e quindi superiore in forma statisticamente significativa ($p < 0.05$) sia a quella osservata nei pazienti con malattia epatica cronica in attesa di trapianto (12%) che a quella riscontrata nella popolazione generale di età superiore ai 50 anni (3.2%). Questa osservazione differisce rispetto a quelle proposte da altri Autori per ciò che concerne il trapianto di organi solidi, le cui prevalenze risultano mediamente più basse. Una prevalenza di MGUS compresa tra il 10% ed il 25% ed una pari al 25 % è stata riportata nei pazienti sottoposti a trapianto renale (Babel N, 2004; Regamey N, 2004) e nei pazienti sottoposti a trapianto di cuore (Caforio ALP et al., 2001), rispettivamente. Per ciò che concerne il trapianto di fegato sono state riportate in precedenza delle prevalenze di MGUS “*de novo*” nel post-trapianto comprese tra l’8.5 % (Lemoine A et al., 2001) ed il 28 % (Badley AD, 1996).

Quali fattori di rischio per lo sviluppo di una MGUS “*de novo*” dopo trapianto di organo solido sono stati proposti: l’età del ricevente, l’immunosoppressione, l’intensità dell’immunosoppressione e lo status rispetto al donatore per ciò che concerne il CMV e l’HHV-8. In particolare, per ciò che riguarda l’immunosoppressione, una maggiore incidenza di episodi di rigetto ed una dose cumulativa maggiore sia di ciclosporina sia di steroidi è stata osservata nei pazienti con MGUS “*de novo*” dopo trapianto di cuore (Caforio ALP et al., 2001). L’impiego di OKT3 o globuline anti timociti nelle fasi immediatamente successive al trapianto o nel trattamento degli episodi di rigetto è stato segnalato come fattore di rischio per lo sviluppo di una MGUS “*de novo*” dopo trapianto di fegato (Regamey N, 2004). I nostri risultati sembrano confermare l’importanza dell’età come fattore di rischio per lo sviluppo di MGUS “*de novo*” dopo trapianto di fegato (Tab n° 7) come pure per lo

sviluppo in una condizione di MGUS permanente (comparsa sia prima che dopo il trapianto) (Tab n° 12). I nostri risultati non sembrano invece evidenziare alcuna relazione tra la prevalenza degli episodi di rigetto e lo sviluppo di una MGUS “*de novo*” dopo trapianto di fegato. Non evidenziano neppure una correlazione fra lo sviluppo di MGUS “*de novo*” dopo trapianto di fegato e il regime di terapia immunosoppressiva utilizzato sia in termini di schema di terapia (monoterapia/duplicata terapia/triplice terapia), sia per quanto riguarda il tipo di inibitore della calcineurina utilizzato (ciclosporina/tacrolimus) e la dose cumulativa utilizzata, sia per quanto riguarda la durata della terapia steroidea dopo trapianto (Tab n° 8 e 10).

Il meccanismo responsabile dello sviluppo di una MGUS “*de novo*” dopo trapianto di organo solido non è stato ancora definito. Si ipotizza che un deficit della sorveglianza immunologica mediata dai linfociti T, consenta l’ “escape” proliferativo ad un clone di cellule B. In questo ambito va considerato il possibile ruolo patogenetico sia dell’età del ricevente (Lemoine A, 2001) sia delle stimolazioni antigeniche virali quali il CMV, l’HHV-8 ed EBV. Un’età del ricevente maggiore di 46 anni si associa ad una probabilità superiore di sviluppare una MGUS (Lemoine A, 2001). È stato inoltre osservato (Regamey N. 2004) che la prevalenza della MGUS risulta maggiore nei riceventi CMV–ve di graft da donatori CMV +ve, rispetto ai riceventi CMV –ve di graft da donatori CMV–ve (34 % vs 6 %). Analogamente, per quanto concerne l’infezione da HHV-8, che viene trasmessa solo con il trapianto di organi solidi, la prevalenza della MGUS “*de novo*” dopo trapianto di fegato è risultata superiore nei pazienti trapiantati HHV-8 +ve (29%) o sierconvertiti da HHV-8 –ve a HHV8+ve dopo trapianto (38%), rispetto ai pazienti trapiantati che rimangono HHV-8 –ve (19%). Meno noto è il ruolo dell’infezione da EBV quale fattore di rischio per lo sviluppo di MGUS “*de novo*” dopo trapianto di organo solido. Cariche virali più elevate di EBV sono state osservate nei pazienti con MGUS “*de novo*” rispetto a quelle osservate nei pazienti trapiantati senza MGUS (Babel N, 2004). L’infezione da EBV è stata già chiaramente identificata quale fattore causale di disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD), così come è stata già descritta un’alta prevalenza

di una gammopatia monoclonale nei pazienti con PTLD (Badley AD, 1996; Tsai DE, 2005; Rosselet A et al., 2009).

Nel nostro studio non abbiamo osservato una differenza statisticamente significativa per ciò che concerne l'età fra i pazienti che sviluppano una MGUS "*de novo*" dopo trapianto e i pazienti che non la sviluppano anche se l'età tende ad essere maggiore nel primo gruppo di pazienti come pure nei pazienti che sviluppano un MGUS permanente rispetto ai pazienti che non sviluppano mai MGUS o sviluppano una forma transitoria di MGUS. Nel nostro studio non è stata riscontrata neanche una differenza significativa né per ciò che concerne la prevalenza di infezioni da CMV ed EBV tra i pazienti che hanno o non hanno sviluppato una MGUS dopo il trapianto di fegato.

Le osservazioni relative al ruolo attribuito all'infezione da EBV nella patogenesi del PTLD consentono di introdurre l'altro scopo principale della tesi che è stato quello di definire l'evoluzione della MGUS dopo trapianto di fegato.

La presenza di una MGUS è considerata un fattore di rischio per lo sviluppo sia del mieloma che di altri disordini maligni plasmacellulari o ad altre cellule B quali la macroglobulinemia di Waldenstrom, linfoma a cellule B, leucemia linfocitica cronica e amiloidosi primaria. Il rischio cumulativo di progressione della MGUS verso queste patologie nella popolazione generale è del 12% a 10 anni, 25 % a 20 anni, 30% a 25 anni. Il rischio di progressione della MGUS a mieloma o ad altri disordini maligni associati è dell'1 % ad 1 anno (Kyle RA et al., 2002). Fattori di rischio per questa progressione nella popolazione generale sono stati individuati in: tipologia IgA o IgM della proteina monoclonale, valore dell'albuminemia al momento della diagnosi e quantità di proteina monoclonale (Kyle RA, 2003). Per ciò che concerne il terzo fattore è stato recentemente segnalato che il rischio di progressione della MGUS a mieloma od a disordini linfoproliferativi nella popolazione generale a 10 anni è pari a 14%, 26%, 34 % e 41 % per quantità di proteina monoclonale pari a 0.5 g/dl, 1.5 g/dl, 2.0 g/dl, > 2.5 g/dl.

Non esistono dati rilevanti per ciò che concerne la possibile progressione di una MGUS verso un disordine maligno a cellule B nei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido. Questa carenza è fonte di continua incertezza e di continue riserve quando in un potenziale candidato ad un trapianto di organo solido viene posta diagnosi di MGUS.

Nella valutazione della progressione di una condizione di MGUS a mieloma o ad altro disordine linfoproliferativo bisogna sottolineare il dato emerso dal nostro studio: spesso la MGUS dopo trapianto di fegato, sia essa “*de novo*” o meno, non rappresenta una condizione permanente. Infatti nel 46.2% dei casi la MGUS “*de novo*” dopo trapianto rappresenta una condizione transitoria, dal momento che si negativizza nella maggior parte dei casi entro il primo anno dalla sua comparsa, in accordo con le osservazioni di Pham H et al. nel 1998 (Pham H, 1998).

Nel nostro studio c'è stato un unico caso di progressione di una MGUS a mieloma molecolare. Il paziente aveva sviluppato già prima del trapianto una condizione di MGUS di tipo IgG con un valore di proteina M di 1,1 g/dl. La biopsia midollare eseguita prima del trapianto aveva confermato il quadro di MGUS. Dopo il trapianto si è verificato un progressivo incremento del valore di proteina M fino a valori > 1.5 g/dl che hanno richiesto la ripetizione della biopsia epatica con diagnosi di mieloma molecolare. La diagnosi di mieloma è avvenuta a distanza di 6 anni dal trapianto in coincidenza con un aumento della proteina monoclinale e di una tipizzazione non più solo di tipo IgG ma anche di tipo IgM.

Nel periodo di follow up considerato nello studio nessun paziente con MGUS “*de novo*” dopo trapianto di fegato ha sviluppato un mieloma. Queste osservazioni sono in accordo con Rostaing L. et al., relativa alla comparsa, in periodo di follow-up da 3 a 9 anni dopo trapianto di rene, di un mieloma micromolecolare in 2 su 5 pazienti con MGUS comparsa in fase pre-trapianto (Rostaing L et al. 1994). Sono in accordo anche con quanto descritto da Lemoine A et al. nel 2001 nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato (Lemoine A, 2001), e da Caforio ALP et al. nei pazienti con MGUS dopo trapianto di cuore (Caforio ALP et al., 2001). In questi studi infatti non c'era stato alcun caso di evoluzione a mieloma di una condizione di MGUS comparsa dopo trapianto.

Nella nostra casistica sono stati segnalati in tutto 5 casi di linfomi (prevalenza del 3,3%). Nel periodo di follow-up considerato dallo studio, non abbiamo osservato alcuna progressione della MGUS “*de novo*” permanente o transitoria dopo trapianto verso un altro disordine linfoproliferativo a cellule B. Quattro pazienti che hanno sviluppato durante il follow up un linfoma non avevano mai sviluppato in precedenza una condizione di MGUS, il quinto paziente aveva sviluppato una condizione di MGUS prima del trapianto che a distanza di circa un anno era poi scomparsa, molto prima della comparsa del disordine linfoproliferativo.

In quest’ambito la nostra osservazione contrasta sia con quella di Pham H del 1998 e Lemoine A del 2001 relativa ai pazienti trapiantati di fegato, che con quella di Caforio ALP et al. Del 2001 relativa ai pazienti trapiantati di cuore. Complessivamente questi studi segnalano una prevalenza di PTLD variabile dal 1.1% al 15.7% nei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido, con MGUS nel post-trapianto pari al 7.8%.

Dal momento che nel presente studio è stata riscontrata una prevalenza di PTLD pari al 3.3 % e, dunque, simile sia a quella osservata da Lemoine A. et al. (2.3%), sia a quella osservata da Caforio ALP et al. (2.3%), le ragioni della discrepanza circa l’associazione tra MGUS e PTLD vanno ricercate altrove. In relazione allo studio di Lemoine A et al., va osservato che gli Autori esprimono lo sviluppo di PTLD non in funzione di una diagnosi di MGUS, ma in funzione di una “gammopatia” il cui il carattere monoclonale era riconosciuto solo nel 44% dei casi. A ciò si aggiunge il fatto che nel presente studio poco più del 10% dei pazienti presenta una MGUS di forma IgM o IgA. In relazione allo studio della Caforio ALP et al. va osservato che l’intensità dell’immunosoppressione che caratterizza il trapianto di cuore è molto più marcata rispetto a quella attuata nei pazienti inclusi nel nostro studio.

Ma, in relazione all’evoluzione clinica della MGUS, il risultato più originale del nostro studio è stato quello di evidenziare un’associazione tra la presenza di MGUS “*de novo*” permanente o

transitoria dopo trapianto o della MGUS permanente (sviluppata sia prima che dopo i trapianto) e lo sviluppo di complicanze quali le infezioni batteriche e virali severe e l'insufficienza renale.

In pochi studi relativi all'evoluzione clinica di una MGUS nella popolazione generale, la presenza della gammopatia monoclonale è stata considerata come un possibile fattore di rischio per lo sviluppo di infezioni batteriche e/o virali. Questo nonostante sia ben noto che il mieloma ed altri disordini linfoproliferativi a cellule B -possibile evoluzione di una MGUS- siano caratterizzati da profonde alterazioni delle difese immunitarie e da una rilevante prevalenza di infezioni batteriche e/o virali anche severe (Jacobson DR Sem. Oncol. 1986, Schutt P Leukemia e Lymphoma 2006).

Va comunque osservato che nella popolazione generale è stato segnalato da un unico studio un aumentato rischio di batteriemia nei pazienti con MGUS (Gregersen H, 1998); in questo studio l'Autore ha messo in evidenza come in oltre il 60% dei casi di morte in pazienti con MGUS, la causa di morte non sia rappresentata dalla progressione della MGUS verso disordini linfoproliferativi a cellule B, bensì da cause non neoplastiche tra cui le più rappresentate sono le complicanze cardiovascolari (47.3 %) e le infezioni batteriche (7.6 %).

Nel nostro studio la presenza di una condizione di MGUS non ha evidenziato un'associazione con la prevalenza del numero totale di infezioni opportunistiche sviluppate dai pazienti ma con lo sviluppo di infezioni severe che indipendentemente dalla loro eziologia, hanno richiesto il ricovero ospedaliero del paziente rappresentando in alcuni casi un rischio per il graft o per la sopravvivenza del paziente stesso (26% nei pazienti con MGUS "de novo" dopo trapianto vs 12,5% nei pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS e 30,5% nei pazienti con MGUS permanente vs 13% nei pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS o solo in forma transitoria). Tale osservazione vale sia per quanto riguarda i pazienti che hanno sviluppato una condizione di MGUS "de novo" dopo trapianto di fegato rispetto ai pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS (26% vs 12,5%, $p=0,03$) ma riguarda in modo ancora più significativo i casi di MGUS permanente (sviluppata sia prima che dopo trapianto di fegato) rispetto ai pazienti che non hanno mai sviluppato una condizione di MGUS o solo una forma transitoria dopo trapianto (30,5% vs 13%, $p=0,016$).

In letteratura sono noti vari fattori di rischio indipendenti per lo sviluppo di infezioni opportunistiche dopo trapianto di fegato legati in gran parte alle caratteristiche della terapia immunosoppressiva e all'uso di terapia steroidea per il trattamento di eventuali reazioni di rigetto epatocellulare. Nel nostro studio l'analisi di regressione logistica multivariata ha evidenziato come fattori di rischio indipendenti di sviluppare infezioni severe sia la MGUS permanente che lo sviluppo di reazioni di rigetto. Non ha invece attribuito un ruolo significativo allo schema di terapia immunosoppressiva utilizzato e alla durata della terapia steroidea.

Analogamente, i risultati dello studio dimostrano che nei pazienti con MGUS "*de novo*" dopo trapianto di fegato la presenza di una gammopatia monoclonale si associa ad una maggiore prevalenza di insufficienza renale rispetto ai pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS (65% vs 42%; $p=0,005$). Questa correlazione viene confermata ulteriormente confrontando la prevalenza di insufficienza renale cronica dopo trapianto fra i pazienti con MGUS permanente (insorta prima o dopo trapianto) rispetto ai pazienti che non hanno mai sviluppato MGUS o solo in forma transitoria (75% vs 45%; $p=0,0015$) (Fig n° 5 e 7).

La nefrotossicità di una condizione di MGUS è già nota e descritta in letteratura. Il meccanismo responsabile della nefrotossicità di questa complicanza è rappresentato principalmente dal deposito a livello glomerulare e soprattutto tubulare di catene leggere (Sanders PW, 1992). A questo si somma l'effetto tossico delle stesse catene leggere sulle strutture renali. Le catene leggere, per il basso peso molecolare, una volta filtrate dai glomeruli arrivano al tubulo prossimale dove sono catabolizzate. Quindi vengono endocitate attraverso il legame in tandem cubilina/megalina e, una volta captate attraverso la via endosoma/ lisosoma clatrina-dipendente, vengono degradate nei lisosomi (Batuman V et al., 1990-1997-1998; Santostefano M, 2005). Una volta superata la capacità delle cellule tubulari di catabolizzare le catene leggere, queste appaiono nel fluido tubulare del segmento distale del nefrone dove si associano alla proteina di Tamm-Horsfall, che ha affinità per la catena leggera monoclonale (Huang ZQ, Sander PW, 1995-1997; Ying WZ, Sander PW, 2001).

Sino ad oggi la presenza di una MGUS non era mai stata identificata come un fattore di rischio per lo sviluppo di insufficienza renale cronica dopo trapianto di un organo solido ed in particolare di un trapianto di fegato. Trattandosi di un risultato assolutamente originale abbiamo voluto approfondirne il significato attraverso un'analisi univariata prima e multivariata dopo comprendente i fattori di rischio noti per lo sviluppo di insufficienza renale dopo trapianto di fegato.

I fattori di rischio segnalati in letteratura per lo sviluppo di insufficienza renale cronica dopo trapianto di fegato sono: l'uso di inibitori della calcineurina, ipertensione arteriosa, diabete mellito, eziologia HCV della malattia epatica primitiva, disfunzione del graft e presenza di insufficienza renale nel pre-trapianto. Nel nostro studio l'analisi di regressione logistica univariata ha individuato come fattori di rischio indipendenti di insufficienza renale cronica post OLT la presenza nel pre-trapianto di insufficienza renale e l'utilizzo della ciclosporina rispetto all'uso del tacrolimus e la presenza di una MGUS permanente. L'analisi multivariata ha però identificato solo i primi 2 fattori come fattori di rischio per lo sviluppo di un'insufficienza renale cronica.

L'evidenza di un maggior rischio di sviluppare insufficienza renale cronica dopo trapianto di fegato dei pazienti trattati con ciclosporina rispetto all'uso del tacrolimus conferma i dati dello studio di Gonwa TA pubblicato nel 2002 e sembra invece contraddire i risultati di alcuni studi precedenti che indicavano una pari nefrotossicità dei due farmaci (Fisher NC, 1998; Platz KP, 1994) o maggiore del tacrolimus rispetto alla ciclosporina (Pham PT, 2003). In tale contesto è opportuno però precisare che solo a partire dal 2003 abbiamo iniziato a regolare la dose di ciclosporina da somministrare sulla base del livello ematico del farmaco dosato a due ore dalla somministrazione (C2). La regolazione del dosaggio del farmaco su C2 si associa infatti ad una minor frequenza di effetti collaterali fra cui lo sviluppo di insufficienza renali a parità di efficacia immunosoppressiva e di reazioni di rigetto.

L'analisi di regressione logistica multivariata ha riconosciuto come fattori predittivi di mortalità lo sviluppo di infezioni opportunistiche severe e lo sviluppo di insufficienza renale cronica dopo trapianto. Non ha invece riconosciuto un ruolo predittivo indipendente per quanto riguarda le

recidive dell'epatopatia di base e lo sviluppo di una condizione di MGUS permanente. Questa osservazione non annulla tuttavia il significato prognostico negativo che la presenza di una MGUS permanente può avere nel post-trapianto. Infatti l'impatto negativo di una MGUS permanente sulla mortalità post-OLT può passare attraverso una maggiore prevalenza di infezioni severe e una maggiore prevalenza di insufficienza renale. E' quindi verosimile che la maggiore prevalenza di complicanze infettive e di insufficienza renale nei pazienti con MGUS "de novo" dopo trapianto di fegato permanente o transitoria, così come in quelli con MGUS "de novo" o meno, permanente dopo trapianto di fegato, renda ragione del più elevato tasso di mortalità osservato in tali pazienti nel presente studio. In particolare, una differenza statisticamente significativa è stata riscontrata per ciò che concerne la mortalità tra i pazienti con MGUS permanente (33.3%) e pazienti senza MGUS o con MGUS transitoria (17.5%) dopo trapianto di fegato ($p < 0.05$). Ad ulteriore conferma di questo dato anche le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier evidenziano la maggiore probabilità di sopravvivenza nel tempo del gruppo di pazienti che non hanno mai avuto MGUS o hanno sviluppato solo una MGUS transitoria rispetto ai pazienti con MGUS permanente (Fig n° 9).

Questa osservazione conferma quella già citata in precedenza di Gregensen H. (Gregensen H, 2001), secondo la quale i pazienti con MGUS muoiono più spesso per cause non inerenti la progressione neoplastica della gammopatia monoclonale.

6 CONCLUSIONI

I risultati dello studio indicano che la prevalenza della MGUS nei pazienti candidati al trapianto di fegato e, soprattutto, nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato è superiore a quella osservata nella popolazione generale.

La MGUS non rappresenta, dopo trapianto di fegato, una condizione permanente in tali pazienti potendo regredire nel 46.2% dei casi.

La presenza di una MGUS permanente dopo trapianto di fegato si associa raramente ad una progressione a mieloma e sembra non associarsi ad una progressione verso altri disordini linfoproliferativi a cellule B.

La presenza di una MGUS in un candidato al trapianto non può rappresentare, pertanto, una controindicazione al trapianto stesso, soprattutto se la componente monoclonale è di tipo IgG e se è caratterizzata da una bassa quantità della proteina monoclonale.

Ciò nonostante la presenza di una MGUS permanente in fase post-trapianto si associa ad un maggior tasso di mortalità probabilmente legato ad altre complicanze quali le complicanze infettive e l'insufficienza renale.

7 BIBLIOGRAFIA

- Andreone P, Zignego A.L, Cursaro C, et Prevalence of monoclonal gammopathies in patients with hepatitis C infection. *Annals of Internal Medicine*, 1998; 129: 294-298.
- Anttila P et al., Method-dependent characteristics of carbohydrate-deficient transferrin measurements in the follow-up of alcoholics. *Alcohol*. 2004; 39: 59-63.
- Avet-Loiseau H., Li, J.Y., Fancon, T. et al. High incidence of traslocations t(11 ;14)(q13 ;q32) and t(4 ;14)(p16 ;q32) in patient with plasma cell malignancies. *Cancer Research*, 1998, 58, 5640-5645.
- Avet-Loiseau, H., Fancon, T., Daviet, A., et a 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome. *Cancer Research*, 1999; 59: 4546-4550.
- Avet-Loiseau, H., Li, J.Y., Morineau, N, et al. Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. Intergroupe of Francophone du Myelome. *Blood*, 1999, 94 : 2583-2589.
- Babel N, Schwarzmann F, Pruss A, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) is associated with an increased frequency of Epstein-Barr Virus (EBV) – Latently infected B lymphocytes in long-term renal transplant patients. *Transplantation Proceedings* 2004, 36: 2679-2682.
- Badley A.D, Portela D.F, Patel R, et al. Development of monoclonal gammopathy precedes the development of Ebstein-barr virus induced post transplant lymphoproliferative disorders. *Liver Tranplantation and Surgery* 1996 ; 2, : 375-382.
- Baldini, L.,Guffanti, A., Cesana, B.M., et al. Role of different hematologic variables in defining the risk of malignant trasformation in monoclonal gammaopathy. *Blood*,1996; 87: 912-918.

- Batuman V, Dreisbach AW, Cyran J. Light-chain binding sites on renal brush-border membranes. *Am J Physiol* 1990; 258: F1259-1265.
- Batuman V, Guan S. Receptor-mediated endocytosis of immunoglobulin light chains by renal proximal tubule cells. *Am J Physiol* 1997; 272: F521-F530.
- Batuman V, Verroust PJ, Navar GL, et al. Myeloma light chains are ligands for cubulin(gp280). *Am J Physiol* 1998; 275: F246-F25.
- Bavink JNB, Hardie DR, Green A, et al. The risk of skin cancer in renal transplant recipients in Queensland, Australia. A follow-up study. *Transplantation* 1996;61:715-721.
- Bean P et al., Innovative technologies for the diagnosis of alcohol abuse and monitoring abstinence. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001; 25:309-316.
- Benlloch S, Berenguer M, Prieto M, et al. De novo internal neoplasms after liver transplantation: increased risk and aggressive behavior in recent years? *Am J Transplant* 2004; 4:596-604.
- Berenguer M. et al. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol* 2000;32:673-684. 99.
- Berenguer M. et al. Hepatitis C virus and host: an imbalance induced by immunosuppression? *Hepatology* 2000;32:433-435.P
- Bergsagel PL, Kuehl WM. The molecular biology of multiple myeloma. In: Malpas JS, Bergsagel DE, Kyle RA, Anderson KC, eds *Myeloma biology and management*. 3rd ed Philadelphia. Saunders, 2004 :35-58.
- Berlakovich G et al. Carbohydrate deficient transferrin for detection of alcohol relapse after orthotopic liver transplantation for alcoholic cirrhosis. *Transplantation* 1999; 67:1231-1235
- Birkeland SA, Hamilton-Dutoit S. Is posttransplant lymphoproliferative disorder (PTLD) caused by any specific immunosuppressive drug or by the transplantation per se? *Transplantation* 2003; 76:984-988.

- Blade J, Rosinol L. Renal, hematologic and infectious complications in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; 18: 635-652.
- Bladé J., M.D. Monoclonal Gammopathy of Undeterminate Significance. *New England Journal of Medicine* 335 ;26 2765-2768.
- Blade, J.L., Lopez – Guillermo, A., Rozman, C., et al. Malignant transformation and life expectancy in monoclonal gammopathy of undetected significance. *British Journal of Haematology*,1992; 81:391-394.
- Bustami RT, Ojo AO, Wolfe RA et al. Immunosuppression and the risk of post-transplant malignancy among cadaveric first kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2004;4:87-93.
- Caforio ALP, Gambino A, Belloni Fortina A, et al. Monoclonal gammopathy in heart transplantation: risk factor analysis and relevance of immunosuppressive load. *Transplantation Proceedings* 2001; 33: 1583-1584.
- Cesana, C., Klersy, C., Barbarano, L., et al. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 2002; 20, 1625-1634.
- Cherikh WS, Kauffman HM, McBride MA, et al. Association of the type of induction immunosuppression with posttransplant lymphoproliferative disorder, graft survival, and patient survival after primary kidney transplantation. *Transplantation* 2003;76: 1289-1293.
- Chng, W.J., Van Wier, S.A., Ahmann, G.J., et al. A validated FISH trisomy index demonstrates the hyperdiploid and non- hyperdiploid dichotomy in MGUS. *Blood* 2005 106,2156-2161.
- Clinical practice guidelines for chronic kidney disease. *Am J. Kidney Dis* 2002; 39: S1-266.
- Cohen JJ. Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease associated with acquired immunodeficiency. *Medicine (Baltimore)* 1991;70: 137-160.

- Cohen W.J., Crawford J, Rao M.K., et al. Racial differences in the prevalence of monoclonal gammopathy in a community-based sample of the elderly. *American Journal of Medicine*; 1998, 104, 439-444.
- Cuadrado A et al., Alcohol recidivism impairs long-term patient survival after orthotopic liver transplantation for alcoholic liver disease. *Liver Transpl.* 2005; 11:420-426.
- DE, Kyle RA , Anderson KC, eds. *Myeloma : biology and management* .3rd ed. Philadelphia: Saunders,2004:67-81.
- DeFronzo RA, Cooke CR, Wright JR, et al. Renal function in patients with multiple myeloma. *Medicine (Baltimore)* 1978; 57: 151-166 .
- DiGiovanna JJ. Posttransplantation skin cancer: scope of the problem, management and role for systemic retinoid chemoprevention. *Transplant Proc* 1998; 30:2771-2775.
- Doak PB, Montgomerie JZ, North JD, et al. Reticulum cell sarcoma after renal homotransplantation and azathioprine and prednisone therapy. *Br Med J* 1968; 4 :746.
- Dotti G, Fiocchi R, Motta T et al. Epstein – Barr virus-negative lymphoproliferative disorders in long-term survivors after heart, kidney, and liver transplant. *Transplantation* Mar 15 2000; 69: 827 – 833.
- Duvoux C, Delacroix I, Richardet JP, et al. Increased incidence of oropharyngeal squamous cell carcinomas after liver transplantation for alcoholic cirrhosis. *Transplantation* 1999; 67:418-21.
- Duvoux C, Pageaux GP, Vanlemmens C et al. Risk factors for lymphoproliferative disorders after liver transplantation in adults: An analysis of 480 patients. *Transplantation* 2002; 74: 1103 – 1109.
- Dymyna M.K, Sukru E, Stephen R., et al. Liver transplant recipients are not at increased risk for nonlymphoid solid organ tumors. *Cancer* 1998;83:1237-1243.
- Elenitoba-Johnson KS, Jaffe ES. Lymphoproliferative disorders associated with congenital immunodeficiencies. *Semin Diagn Pathol* 1997;14:35-47.

- Espana A, Redondo P, Fernandes AL, et al. Skin cancer in heart transpant patients. Am J Acad Dermatol 1995;32:458-465 .
- European Liver Transplant Registry. Data analysis booklet. Paris 2007 available at <http://www.eltr.org>.
- Fisher NC, Nightingale PG, Gunson BK et al. Chronic renal failure following liver transplantation. Transplantation 1998; 1998: 59-66.
- Fonseca R. Cytogenetics in multipe myeloma. In: Malpas JC, Bergsagel DE, Kyle RA, Anderson KC, eds Myeloma :biology and management. 3rd ed Philadelphia . Saunders, 2004 :61-81.
- Fraley DS, Burr R, Bernardi J et al. Impact of acute renal failure on mortality in end stage liver disease with or without transplantation. Kidney Int 1998; 54;: 518.
- Frish M, Hjalgrim H, Olsen JH, et al. Risk for subsequent cancer diagnostic of basal-cell carcinoma. A population based, epidemiologic study. Ann Intern Med 1996; 125: 815 – 821.
- Gonwa TA, Mai ML, Melton LB et al. End stage renal disease after orthotopic liver transplantationusing calcineurin based immunotherapy. Transplantation; 2002; 72: 1934-1939.
- Gregersen H, Madsen KM, Sorensen HT, et al. The risk of bacteremia in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. Eur J Haematol 1998; 61 (2): 140-4.
- Gross TG, Steinbuch M, DeFor et al. B cell lymphoproliferative disorders following hematopoietic stem cell transplantation: risk, factors, treatment and outcome. Bone marrow Transplant 1999;23:251-258.
- Guan S, el-Dahr S, Dipp S, Batuman V. Inibition of Na-K-ATPase activity and gene expression by a myeloma light chain in proximal tubule cells. J Investig Med 1999;47:496-501.
- Haagsma EB, Hagens VE, Schaapveld M, et al. Increased cancer risk after liver transplantation: A population study, J Hepatol 2001; 34:84-91.

- Hallek M, Bergsagel DE, Anderson KC. Multiple Myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998;91:3-21.
- Hamazaki K, Baba M, Hasegawa H, et al. Chronic hepatitis C associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2003, 18, 459-460.
- Hermouet S, Sutton CA, Rose TM et al. Qualitative and quantitative analysis of human herpes-viruses in chronic and acute B cell lymphocytic leukemia and in multiple myeloma. *Leukemia* 2003; 17(1): 185
- Herrero Ji, Lorenzo M, Quiroga J et al. De novo neoplasia after liver transplantation: an analysis of risk factors and influence on survival. *Liver Transpl* 2005; 11; 89-97.
- Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, et al. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004;104:607-18.
- Huang ZQ, Sanders PW. Biochemical interaction between Tamm-Horsfall glycoprotein and Ig light chains in the pathogenesis of cast nephropathy. *Lab Invest* 1995;73:810-817.
- Huang ZQ, Sanders PW. Localization of a single binding site for immunoglobulin light chain of human Tamm-Horsfall glycoprotein. *J Clin Invest* 1997;99:732-736.
- International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology*; 2003; 121, 749-757.
- Jain A, Nalesnik M, Reyes J et al. Posttransplant lymphoproliferative disorders in liver transplantation: A 20-year experience. *Ann Surg* 2002; 236: 429 – 436.
- Jain AB, Yee LD, Nalesnik MA, et al. Comparative incidence of the novo non lymphoid malignancies after liver transplantation under tacrolimus using Surveillance Epidemiologic End Result data. *Transplantation* 1998; 66: 1193 – 1200.

- Jain AB, Yee LD, Nalesnik MA, Youk et al. Comparative incidence of de novo non-lymphoid malignancies after liver transplantation under tacrolimus using surveillance epidemiologic end result data. *Transplantation* 1998; 66:1193-2000.
- Jimenez C, Rodriguez D, Marques E, et al. De novo tumors after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 2002; 34:297-8.
- Jonas S, Rayes N, Neumann U, et al. De novo malignancies after liver transplantation using tacrolimus-based protocols or cyclosporine-based quadruple immunosuppression with an interleukin-2 receptor antibody or antithymocyte globulin. *Cancer* 1997;80:1141-1150.
- Jonas S, Rayes N, Neumann U, S, et al. De novo malignancies after liver transplantation using tacrolimus-based protocols or cyclosporine-based quadruple immunosuppression with an interleukin-2 receptor antibody or antithymocyte globulin. *Cancer* 1997; 80:1141-50.
- Kahn HS, Tatham LM, Patel AV, et al. Increased cancer. *JAMA* 1998; 280: 910 – 912.
- Kamel OW. Iatrogenic lymphoproliferative disorders in non-transplantation settings. *Semin Diagn Pathol* 1997;14:27-34.
- Karen D.F, Alexanian R., Goeken J.A, et al. Guidelines for clinical and laboratory evaluation patients with monoclonal gammopathies. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* . 1999; 123; 106-107.
- Katzmann J.A, Clark R.J, Abraham R.S, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clinical Chemistry*. 2002, 48, 1437-1444.
- KC, eds . *Myeloma: biology and management*.3rd ed. Philadelphia: Saunders,2004:35-58.
- Keeling J, Herrera GA. The mesangium as a target for glomerulopathic light and heavy chains : pathogenic considerations in light and heavy chain-mediated glomerular damage. *Contrib Nephrol* 2007;153:116-134.
- Kelly DM, Emre S, Guy SR, et al. Liver transplant recipients are not at increased risk for non-lymphoid solid organ tumors. *Cancer* 1998;83:1237-1243.

- Kelly DM, Emre S, Guy SR, et al. Liver transplant recipients are not at increased risk for non-lymphoid solid organ tumors. *Cancer*. 1998; 83:1237-43.
- Kremers W.K., Devarbhavi H.C., Wiesner R.H., et al. Post-transplant Lymphoproliferative Disorders Following Liver Transplantation: Incidence, Risk Factors and Survival. *American Journal of Transplantation* 2006;6:1017-1024.
- Kumar, S., Witzig, T.E., Timmin, M., et al. Bone marrow angiogenic ability and expression of angiogenic cytokines in myeloma: evidence favoring loss of marrow angiogenesis inhibitory activity with disease progression. *Blood*, 2004;:104, 1159 – 1165.
- Kyle R.A, Therneau T.M, Rajkumar S.V, et al. Long term follow up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*; 2003; 102; 3759-64.
- Kyle R.A., Rajkumar V. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering multiple myeloma: emphasis on risk factors for progression. *British journal of Haematology*; 2007, 139, 730-743.
- Kyle R.A., Therneau T.M., Rajkumar SV, et al. Long-term follow-up of 241 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance: the original Mayo clinic series 25 years later. *Mayo clinic Proc* 2004; 79:859-66.
- Kyle R.A.,Therneau T.M., Rajkumar SV et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006; 354:1362-9.
- Kyle, R.A. Sequence of testing for monoclonal gammopathies. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 1999; 123, 114-118.
- Kyle, R.A., Katzmann J.A., Lust J.A. et al. Immunochemical characterization of immunoglobulins. In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 6th edn (ed by N.R. Rose, R.G. Hamilton & B. Detrich . AMS Press, Washington ,DC). 2002; pp.71-91.
- Kyle, R.A., Remstein, E.D., Therneau, T.M., et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*, 2007; 356, 2582 – 2590.

- Kyle, R.A., Therneau T.M., Rajkumar, S.V., et al. A long term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *New England Journal of Medicine*, 2002, 346, 564 –569.
- Kyle RA. “Benign” monoclonal gammopathy – after 20 to 35 years of follow-up. *Mayo Clinic Proceedings* 1993; 68: 26-36.
- Landgren O, Kyle R.A, Pfeiffer R.M, e. Monoclonal gammopathy of undetermined significance preceding multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009; 113; 5412-5417.
- Lemoine A, Pham P, Azoulay D, et al. Detection of gammopathy by serum protein electrophoresis for predicting and managing therapy of lymphoproliferative disorder in 911 recipients of liver transplants. *Blood* 2001; 98: 1332-1338.
- Lesblond V, Davi F, Charlotte F et al. Posttransplant lymphoproliferative disorders not associated with Epstein-Barr: A distinct entity? *J Clin Oncol Jun* 1998 ;16:2052-2059.
- Lesbond V, Choquet S. Lymphoproliferative disorders after liver transplantation. *J Hepatol* 2004 ; 40 : 728-735.
- Levi F, La Vecchia C, Te VC, et al. Incidence of invasive cancer following basal cell skin cancer. *AM J Epidemiol* 1998; 147: 722 – 726.
- Levy M, Backman L, Husberg B, et al. De novo malignancy following liver transplantation: a single-center study. *Transplant Proc* 1993; 25:1397-9.
- Lima EQ, Zanetta DM, Castro I et al. Risk factors for development of acute renal failure after liver transplantation. *Ren Fail* 2003; 25: 553-560.
- Llovet JM, Bruix J. Prognostic assessment and medical treatment of advanced hepatocellular carcinoma. In: Arroyo V, Bosh J, Bruguera M, Rodes J, Sánchez Tapias JM (eds). *Treatment of liver diseases*. Barcelona: Masson, 1999; 345 – 354.
- Lorenzini S., Andreone P., Gramenzi A., et al. Posttransplant Lymphoproliferative disorders in liver transplanted patients: A Report of four cases. *Transplantation proceedings* 2006; 38,1477-1480.

- Lortholary O, Ascioğlu S, Moreau P et al. Invasive Aspergillosis as an opportunistic infection in non allografted patients with multiple myeloma: a European organization for research and treatment of cancer. *Clin Infect Dis*, 2000; 30, 41.
- Lust, J.A., Donovan, K.A. Biology of the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) to multiple myeloma. *Cancer Control* 1998; 5, 209-217.
- Malik, A.A., Ganti, A.K., Potti, A., et al. Role of Helicobacter Pylori infection in the incidence and clinical course of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *American Journal of Gastroenterology* 2002; 97, 1371-1374.
- Marks R. An overview of skin cancer. Incidence and causation. *Cancer* 1995; 75 (suppl): S607 – S612.
- Marzano et al. Prevention of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation in cirrhotic patients treated with lamivudine and passive immunoprophylaxis. *J Hepatol* 2001 Jun;34(6):903-10.
- McGregor JM, Berkhout RJ, Rozycka M, et al. p53 mutations implicate sunlight in post-transplant skin cancer irrespective of human papillomavirus. *Oncogene* 1997;15:1737-1740.
- McLaughlin K, Wajstaub S, Marotta P et al. Increased risk for posttransplant lymphoproliferative disease in recipients of liver transplants with hepatitis C. *liver Transpl* 2000; 6: 570 – 574.
- Nalesnik MA, Makowka L, Starzl TE. The diagnosis and treatment of posttransplant lymphoproliferative disorders. *Curr Probl Surg* 1988;25: 367-472.
- Nalesnik MA. Lymphoproliferative disease in organ transplant recipients. *Springer Semin Immunopathol* 1991;13: 199-216
- Nelson BP, Nalesnik MA, Bahler DW, et al. Epstein-Barr virus-negative post-transplant lymphoproliferative disorders: A distinct entity? *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 375 – 385.
- Oellerich M, Burdelski M, Lautz H.U. Predictors of one year pretransplant survival in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1991; 14: 1029-1034.

- Ojo AO; Held PJ, Port FK; et al. Chronic renal failure after transplantation of a non renal organ. *N Engl J Med.* 2003; 349: 931-94.
- Ong CS, Keogh AM, Kossard S, et al. Skin cancer in heart transplant recipients. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:27-34.
- Otley CC, Pittelkow MR. Skin cancer in liver transplant patients. *Liver Transpl.* 2000;6:253-262.
- Oyajobi B.O. Multiple myeloma, hypercalcemia. *Arthritis research and therapy*, 2007, 9.
- Paradisi F, Corti G, Cinelli R. Infections in multiple myeloma. *Infections disease Clinics of North America*, 2001, 15: 373-384.
- Passweg J, Thiel G, Bock HA Monoclonal gammopathy after intense induction immunosuppression in renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11(129): 2461.
- Penn I . The changing pattern of post trasplant malignancies. *Trasplant Proc* 1991; 23: 1101 – 3.
- Penn I. Cancer in the immunosuppressed organ recipient. *Trasplant Proc* 1991;23: 1771 – 2.
- Penn I. Post-transplant malignancies. *Transplant Proc* 1999; 31:1260-1262.
- Penn I. Post-transplantation de novo tumors in liver allograft recipients. *Liver Tranpl Surg* 1996;2:109-113.
- Perrillo et al. A multicenter United States-Canadian trial to assess lamivudine monotherapy before and after liver transplantation for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 33:424-432.
- Peterson K. Biomarkers for alcohol use and abuse: a summary. *Alcohol Res Health.* 2004/2005; 28: 30-37.
- Pham PT, Wilkinson AH, Danovitch GM et al. The effect of cyclosporine versus tacrolimus on long term renal function in liver transplant recipients. Presented at he Annual Meeting of the American Society of Nefrology, 2003, Novembre 17.

- Pirani CL, Valeri A, D'Agati V, et al. Renal toxicity of non steroidal anti-inflammatory drugs. *Contrib Nephrol* 1987; 55: 159-175.
- Platz KP, Mueller AR, Blumhardt G et al. Nephrotoxicity following orthotopic liver transplantation. A comparison between cyclosporine and FK 506. *Transplantation* 1994; 58: 170-178.
- Preston DS, Stern RS. Non-melanoma cancers of the skin. *N Engl J Med* 1992; 327: 1649 – 1662.
- Rajkumar, S.V., Kyle, Plevak, M.F. Helicobacter pylori infection and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *British journal of Haematology* 2002;119, 706 – 708.
- Rajkumar, S.V., Kyle, R.A., Therneau, T.M., et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005, 106, 812 – 817.
- Rajkumar, S.V., Leong, T., Roche, P.C., et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research* 2000,6, 3111-3116.
- Rajkumar, S.V., Mesa, R.A., Fonseca, R., et al (2002a). Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma , and primary amyloidosis. *Clinical Cancer Research* 2002 ,8, 2210-2216.
- Rasmussen, T., Kuehl, M., Lodahl, M., et al. Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood* 2005,105,317-323.
- Reams BD, McAdams HP, Howel DN, et al. Posttransplant lymphoproliferative disorder: Incidence, presentation , and response to treatment in lung transplant recipient. *Chest* 2003;124:1242-1249.
- Regamey N, Hess V, Passweg J, et al. Infection with human herpesvirus 8 and transplant-associated gammopathy. *ransplantation* 2004; 77: 1551:1554

- Rene A, Emir H. Liver transplantation: the current situation. *Seminars in liver disease*, 2009; 29; 3-18.
- Reyes J, Green M, Bueno J et al. Epstein Barr virus associated posttransplant lymphoproliferative disease after intestinal transplantation. *Transplant Proc* 1996;28:2768-2769.
- Rommelspacher et al. Long-term changes of markers of alcoholism after orthotopic liver transplantation (OLT). *Transplantation* 1996; 62:1451-1455
- Roodman, III, G.D. (2002) Biology of myeloma bone disease. In: *Hematology 2002: American Society of Hematology Education Program Book* (ed. by V.C. Broudy, J.L. Abkowitz & J.M. Vose), pp.227-232. The American Society of Haematology, Washington, DC.
- Ropper A.H, Gorson K.C. Neuropathies associated with paraproteinemia. *New England Journal of Medicine* 1998, 338; 1601-1607
- Saigal S, Norris S, Srinivasan P, et al. Successful outcome of orthotopic liver transplantation in patients with preexisting malignant states. *Liver Transpl* 2001; 7:11-5.
- Sanders PW, Booker BB, Bishop JB, et al. Mechanisms of intranephronal proteinaceous cast formation by low molecular weight proteins . *J Clin Invest* 1990; 85: 570-576.
- Sanders PW, Booker BB. Pathobiology of cast nephropathy from human Bence Jones proteins. *J Clin Invest* 1992; 89: 630-639.
- Santostefano M, Zanchelli F, Zaccaria A, et al. The ultrastructural basis of renal pathology in monoclonal gammopathies. *J Nephrol* 2005; 18: 659-675.
- Sengul S, Zwizinski C, Simon EE, et al. Endocytosis of light chains induced cytokines through activation of NF-kappaB in human proximal tubule cells. *Kidney Int* 2002; 62: 1977-1988.
- Shpilberg O, Wilson J, Witheside TL, et al. Pretransplant immunological profile and risk factor analysis of post-transplant lymphoproliferative disease development: The results of a

- nested matched case-control study. The University of Pittsburg PTLD Study Group. *Leuk Lymphoma* 1999; 36: 109-121.
- Shouval et al. Hepatitis B immune globulin to prevent hepatitis B virus graft reinfection following liver transplantation: a concise review. *Hepatology* 2000; 32:1189-1195.
 - Starzl TE, Nalesnik MA, et al. Reversibility of lymphomas and lymphoproliferative lesions developing under cyclosporin-steroid therapy. *Lancet* 1984; 1:583-587.
 - Sterneck M, Zaneh KM, Groteluschen R et al. Clinical use of C2 monitoring in long term liver transplant recipients. *Transplant proc* 2002; 34: 3304-3306.
 - Svoboda J, Kotloff R, Tsai DE. Management of patients with post-transplantation lymphoproliferative disorder: the role of rituximab. *Transpl Int* 2006;19:259.
 - Takahashi, T., Shivapurkar, N., Reddy, J., et al. DNA methylation profiles of lymphoid and hematopoietic malignancies. *Clin Cancer Res* 2004, 10, 2928-2935.
 - Tan-Shalaby J, Tempero M. Malignancies after liver transplantation: A comparative review. *Semin Liver Dis* 1995;15:156.164.
 - Thorley-Lawson DA, Gross A. Persistence of Epstein Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 2004; 350:1328-1337.
 - Vacca, A., Ribatti, D., Roncali, L., et al. Bone Marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 1994, 87, 503-508.
 - Valero JM, Rubio E, Moreno JM, et al. De novo malignancies in liver transplantation. *Transplant Proc* 2003; 35:709-11.
 - Vallejo G, Alonso O, Abradelo M, et al. Upper aerodigestive tract and lung tumors after liver transplantation. *Transplant Proc* 2003; 35:1900-1.
 - Vallejo GH, Romero CJ, de Vicente JC. Incidence and risk factors for cancer after liver transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005.

- Van de Poel MHW, Coebergh JWW, Hillen HFP. Malignant transformation of monoclonal gammopathy of undetermined significance among out-patients of community hospital of Southeastern Netherland. *Br J Haematol* 1995; 91:1231- 125.
- Velidedeoglu E, Desai CNM, Campos L et al. Predictors of late kidney dysfunction post liver transplantation. *Transplant Proc* 2002; 34:3315-3316.
- Wassberg C, Thorn M, Yuen J, Ringborg U, et al.. Second primary cancers in patients with squamous cell carcinoma of the skin: A population-based study in Sweden. *Int J Cancer* 1999;80:511 – 515.
- Wiesner R.H., Demetris A.J., Belle S.H. et al. Acute hepatic allograft rejection: Incidence, risk factors, and impact on outcome. *Hepatology* 1998; 28: 683-645.
- Wilkinson A, Pham PT. Kidney dysfunction in the recipients of liver transplant. *Liver Transplantation* 2005; 11: S47-S51.
- Xavier X, Jordi G, Menendez S, et al. Risk factors for development of de novo neoplasia after liver transplantation. *Liver Transplantation*,2001: pp 971-975.
- Ying WZ, Sanders PW. Mapping the binding domain of immunoglobulin light chain for Tomm-Horsfall protein. *Am J Pathol* 2001; 158: 1859-1866.
- Younger D.S, Rowland L.P, Latov N, et al. Motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis:relation of high CSF protein content to paraproteinemia and clinical syndromes.*Neurology* 1990, 40, 595-599
- Yu MW, Yang SH, Chiu YH, et al. A p53 polymorphism as a modulator of hepatocellular carcinoma risk in relation to chronic liver disease, familial tendency and cigarette smoking in hepatitis B carriers. *Hepatology* 1999;29:697-702.
- Zein NN, Perez RG, Wiesner RH. Hepatitis C virus infection and lymphoproliferative disorders after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 31: 808 – 809.

