



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO**

*Dottorato di ricerca in Oncologia e Chirurgia Sperimentali*  
*Dipartimento di Medicina di Precisione in Area Medica, Chirurgica e Critica*  
*(Me.Pre.C.C.)*

**ANALISI DI BIOMARCATORI IMMUNOMETABOLICI**

**PREDITTIVI DI RISPOSTA E DI TOSSICITA’**

**AL TRATTAMENTO IMMUNOTERAPICO**

**NEI PAZIENTI CON EPATOCARCINOMA**

Tesi di dottorato:

Dott.ssa Marta Peri

Tutor:

Prof.ssa Viviana Bazan

Co-tutor

Prof. Giuseppe Badalamenti

Prof. Antonio Galvano

Il Coordinatore:

Prof. Antonio Russo

ANNO 2025 – CICLO XXXVII

*A coloro che, con mio grande onore, si affidano a me*

*“Initium est timor Domini”*

## INDICE

|                                                                                   |         |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------|
| ABSTRACT                                                                          | Pag. 5  |
| CAPITOLO I RAZIONALE DELLO STUDIO (10PAG)                                         |         |
| 1.1 Background                                                                    | Pag. 7  |
| 1.2 Obiettivi dello studio                                                        | Pag. 12 |
| CAPITOLO II PAZIENTI E METODI                                                     |         |
| 2.1 Selezione dei pazienti                                                        | Pag. 13 |
| 2.2 Metodi                                                                        | Pag. 13 |
| 2.2.1 Disegno dello studio                                                        | Pag. 13 |
| 2.2.2 Raccolta delle variabili cliniche e laboratoristiche                        | Pag. 14 |
| 2.2.3 Determinazione dei livelli circolanti di citochine in più<br>determinazioni | Pag. 14 |
| 2.2.4 Determinazione radiologica basale della composizione<br>corporea            | Pag. 15 |
| 2.2.5 Valutazione degli outcomes clinici e delle tossicità                        | Pag. 16 |
| 2.3 Analisi statistica                                                            | Pag. 16 |
| CAPITOLO III RISULTATI                                                            |         |
| 3.1 Caratteristiche dei pazienti e risposta al trattamento                        | Pag. 18 |
| 3.2 Analisi delle variabili cliniche e laboratoristiche                           | Pag. 19 |

|                                                                        |         |
|------------------------------------------------------------------------|---------|
| 3.3 Analisi dei livelli circolanti di citochine                        | Pag. 20 |
| 3.4 Analisi dei dati radiologici al basale della composizione corporea | Pag. 22 |
| 3.5 Analisi dei dati relativi alla tossicità immunorelata              | Pag. 22 |
| CAPITOLO IV                                                            |         |
| 4.1 Discussione                                                        | Pag. 23 |
| 4.2 Prospettive future                                                 | Pag. 29 |
| CAPITOLO V                                                             |         |
| 5.1 Tabelle e Figure                                                   | Pag. 30 |
| BIBLIOGRAFIA                                                           | Pag. 39 |

## ABSTRACT

La ricerca di biomarcatori immunometabolici predittivi di risposta e di tossicità nell'ambito del trattamento dei pazienti con epatocarcinoma (HCC) è materia di notevole interesse scientifico alla luce della recente introduzione dell'immunoterapia in questo contesto clinico.

Lo studio, di spiccato carattere esplorativo; ha arruolato 20 pazienti con un follow-up mediano è di 20 mesi ed ha valutato in maniera prospettica plurimi biomarcatori immunometabolici, includendo l'analisi quantitativa di citochine, chemochine e fattori di crescita sierici in più determinazioni e la valutazione radiologica basale della composizione corporea correlandoli con il beneficio clinico al trattamento.

Nello specifico la MCP1 (monocyte chemoattractant protein-1), una chemochina con noto ruolo in tutti gli stadi di sviluppo di HCC, ha dimostrato con netta significatività statistica una maggiore concentrazione sierica e una maggiore MIF nei pazienti in assenza di beneficio clinico all'immunoterapia dimostrandosi un fattore predittivo indipendente anche all'analisi multivariata.

Nonostante la valutazione radiologica della composizione corporea abbia potenzialmente un maggior ruolo, rispetto al solo BMI, di determinazione del reale stato di obesità con riconosciuto impatto prognostico in pazienti con HCC, sia lo stato di sarcopenia che di obesità muscolare non hanno mostrato una chiara correlazione con la risposta al trattamento immunoterapico.

Tra le variabili cliniche, un ridotto PS ECOG e lo stato di sovrappeso hanno significativamente impattato nella risposta al trattamento e nella prognosi, con maggiore beneficio nei pazienti con PS ECOG e BMI $\geq$ 25, con conferma anche all'analisi multivariata. È stato inoltre dimostrato un vantaggio in sopravvivenza globale nei pazienti con eziologia alcol-relata ed epatopatia post- NASH.

I dati di sopravvivenza dei pazienti arruolati (mOS=15 mesi e mPFS=8,5 mesi) si sono dimostrati sovrapponibili ai dati di letteratura, con decesso correlato al tumore nel 35% dei casi, a scompenso epatico nel 20% e ad eventi vascolari nel 20%.

Degno di nota è la correlazione statisticamente significativa della concentrazione basale espressa come MIF della IL-10 e TNFalfa e la insorgenza di eventi avversi immunorelati, con minore concentrazione di tali citochine nei pazienti con tossicità

Questa analisi preliminare merita una valutazione su più ampia casistica e pone le basi per ricerche future sul rapporto tra assetto metabolico-nutrizionale e stato infiammatorio del paziente con epatocarcinoma in trattamento con immunoterapia.

In particolare, sottolinea l'interesse verso il pathway mediato da MCP-1/CCL2, possibile nodo cruciale per implementare l'efficacia della immunoterapia nell'HCC mediante la riprogrammazione le TAMs all'interno del microambiente tumorale.

# **CAPITOLO I**

## **RAZIONALE DELLO STUDIO**

### **1.1 Background**

Il sistema immunitario è composto da diverse varietà di cellule e mediatori che interagiscono mediante un complesso network al fine di instaurare meccanismi di riconoscimento e di difesa verso agenti riconosciuti come dannosi. Un mediatore noto è la citochina, una proteina secreta o legata alla membrana cellulare che regola i processi di crescita, la differenziazione e la attivazione delle cellule del sistema immune. La produzione delle citochine è sollecitata in risposta ad un agente stimolante, inclusa una infezione, infiammazione o una patologia oncologica.

I tumori primitivi epatici rappresentano la quarta causa di morte per cancro nel mondo in entrambi i sessi, e l'epatocarcinoma (HCC) è uno dei più frequenti tra essi (75-80%) [1].

Oltre il 70% dei casi di tumori primitivi del fegato è riconducibile a fattori di rischio noti, quali l'infezione da virus dell'epatite C (HCV) e da virus dell'epatite B (HBV). Nelle aree del Nord Italia circa un terzo dei tumori del fegato è, peraltro, attribuibile all'abuso di bevande alcoliche. Negli ultimi anni si è osservato un aumento dell'età alla diagnosi e un progressivo incremento dei casi "non virali", ovvero ad eziologia metabolica (obesità, diabete, ecc.) o ad eziologia mista (metabolica ed etilica). Questo cambiamento epidemiologico è, in parte, dovuto all'effetto della vaccinazione anti- HBV – in Italia obbligatoria da più di 30 anni – e alle terapie antivirali per l'HCV e, in parte, allo stile di vita (alimentazione eccessiva e ricca in grassi, sedentarietà) proprio dei paesi occidentali [2].

Le varie eziologie, insieme alle frequenti comorbidità legate ad un sottostante quadro di cirrosi, contribuiscono all'eterogeneità biologica di tale patologia che è spesso riscontrata in fase avanzata di malattia nonostante la indicazione a programmi di sorveglianza con controlli semestrali in soggetti a rischio (principalmente pazienti cirrotici, affetti da epatite cronica da virus B o da virus C con fibrosi avanzata e pazienti con steatosi epatica associata a disfunzione metabolica [MASLD] e fibrosi avanzata).

La prognosi e le opzioni terapeutiche nei pazienti con diagnosi di epatocarcinoma sono determinate dalla valutazione di più fattori: lo stadio tumorale, il grado tumorale, i sintomi legati all'estensione di malattia, la presenza di componenti istologiche miste di colangiocarcinoma, elevati valori di alfafetoproteina, rapida crescita tumorale, le comorbidità e la funzionalità epatica (Child-Pugh, MELD score, ALBI score, grado di ipertensione portale), considerando che lo scompenso di fegato nel paziente cirrotico contribuisce ad un elevato tasso di mortalità [3], indipendentemente dal tumore. Per tale motivo, la gestione del paziente con epatocarcinoma è necessariamente di competenza multidisciplinare con specialisti dedicati alla patologia in modo peculiare.

Negli stadi avanzati di malattia, o in pazienti non suscettibili a terapie locoregionali, i pazienti con buona funzionalità epatica (Child A) possono essere sottoposti a terapia sistemica. Di recente l'immunoterapia ha cambiato la storia naturale di malattia, rivoluzionando lo scenario terapeutico di tali pazienti. Tale trattamento con elevata percentuale di risposte radiologiche complete può fare accedere alla cosiddetta "curative conversion", ossia a ulteriori trattamenti con finalità ablative come il trapianto di fegato, la resezione epatica o la termoablazione.

In Italia la terapia standard di prima linea si basa sull'immunoterapia di associazione (atezolizumab e bevacizumab oppure tremelimumab e durvalumab)

che ha determinato un vantaggio in sopravvivenza rispetto al sorafenib, il primo farmaco inibitore multichinasico [4-5].

In particolare, Imbrave 150 ha mostrato una superiorità del braccio di combinazione con atezolizumab e bevacizumab rispetto al trattamento con sorafenib sia in termini di OS (HR 0,58; IC 95%: 0,42-0,79;  $p < 0,001$ ; OS a 6 mesi 84,4% vs 72,2%; OS a 12 mesi 67,2% vs 54,6%) che di PFS (HR 0,59; IC 95%: 0,47-0,76;  $p < 0,001$ ; PFS a 6 mesi 54,5% vs 37,2%). Anche in termini di risposte obiettive il braccio di combinazione è risultato superiore rispetto a sorafenib sia secondo i RECIST1.1 (27,3% vs 11,9%;  $p < 0,001$ ) che secondo i criteri specifici per epatocarcinoma mRECIST (33,2% vs 13,3%;  $p < 0,001$ ). È importante sottolineare come nel braccio di combinazione siano state osservate anche 18 risposte complete (5,5%) che non sono invece state riportate con sorafenib. Le risposte nel braccio di combinazione sono risultate maggiormente durature con una percentuale di risposte di durata superiore a 6 mesi dell'87,6% contro il 59,1% del braccio con sorafenib. Analogamente, anche in termini di controllo di malattia (risposte obiettive + stabilità di malattia) il braccio di combinazione è risultato superiore con un tasso del 73,6% vs 55,3%. La maggiore attività del braccio di combinazione si è tradotta inoltre in un maggior ritardo nel deterioramento della qualità di vita misurato secondo i questionari EORTC (11,2 mesi vs 3,6 mesi; HR 0,63; IC 95%: 0,46-0,85). I benefici in termini di sopravvivenza sono stati confermati anche dopo un follow-up di 15,6 mesi, infatti, la sopravvivenza globale nel gruppo atezolizumab/bevacizumab è risultata di 19,2 mesi rispetto ai 13,4 mesi del gruppo di controllo ( $p$  descrittivo  $< 0,001$ ).

La terapia di associazione ha prolungato anche la sopravvivenza libera da progressione mediana rispetto alla terapia di controllo (rispettivamente 6,8 e 4,3 mesi;  $p$  descrittiva  $< 0,001$ ).

Al fine di ottenere ulteriori dati sul profilo di sicurezza ed efficacia del trattamento combinato nei pazienti con HCC avanzato, è stato avviato uno studio prospettico, multicentrico, di fase IIIb, a braccio singolo con atezolizumab in combinazione a bevacizumab [Atezolizumab + bevacizumab in METastatic HCC Italian Safety TriAl (studio AMETHISTA)] in una popolazione occidentale (italiana) di pazienti affetti da HCC non resecabile. Alla data di cut-off, con tempo di osservazione mediano di 13.4 mesi [intervallo interquartile 8.3-15.5 mesi; media (DS) 12.1 (5.1) mesi], sono stati segnalati in totale 60 eventi emorragici di qualsiasi grado in 46 pazienti (30.9%), la maggior parte dei quali di basso grado, con principale interessamento del tratto respiratorio (12.8% dei pazienti; di questi, solo 1 con emottisi di grado 3) ed il tratto gastrointestinale (12.1% dei pazienti; di questi, 13 con eventi di grado  $\geq 3$ ).

Si sono verificati 21 eventi di sanguinamento/emorragia di grado 3-5 in 17 pazienti (11.4%). Eventi di sanguinamento/emorragia G3-G4 sono stati segnalati in 14 pazienti (9.4%), e 3 eventi di sanguinamento/emorragia G5 (2.0%; un caso di shock emorragico a seguito di due eventi di sanguinamento gastrointestinale, un caso di emorragia dell'intestino tenue e uno di emorragia del tratto gastrointestinale superiore), due dei quali sono stati correlati al bevacizumab.

Tra gli endpoint secondari, l'OS mediana è stata di 18.2 mesi (95% CI 15.4 mesi a non valutabile). La PFS mediana è stata di 8.5 mesi (95% CI 7.5-11.2 mesi). Il tempo alla progressione (TTP) mediano è stato di 10.8 mesi (95% CI 8.2-15.7 mesi). La sopravvivenza post-progressione (PPS) è stata di 9.1 mesi in 73 pazienti (95% CI 7.3-13.8 mesi).

Nel complesso, 41 pazienti (27.0%) hanno riportato una risposta al trattamento e 84 pazienti (55.3%) hanno mostrato stabilità di malattia. Il controllo della malattia è stato raggiunto in 125 pazienti (82.2%).

Anche la immunoterapia in monoterapia ha dimostrato vantaggio in pazienti pretrattati con farmaci inibitori multichinasici [8-9].

Dati preclinici inoltre dimostrano che ci sono due profili molecolari di epatocarcinoma, proliferativo e non proliferativo, con differente grado di aggressività e caratteristiche immunologiche relative alla tipologia di infiltrato linfocitario e la iperpressione di citochine presenti nel microambiente tumorale. Il sottotipo proliferativo mostra una peggiore prognosi e una maggiore infiltrato linfocitario con caratteristiche di immuno-refrattarietà- “T-cell exhaustion signature” (ad esempio immunosoppressione mediata da TGFbeta). Gli epatocarcinoma non proliferativi invece presentano un fenotipo “infiammato” associato ad iperespressione della via di segnale legata all’ interleuchina 6 (IL-6)-janus kinase (JAK) con conseguente attivazione del pathway STAT [10]. L’infiammazione ha un ruolo cruciale nel processo di carcinogenesi, come evidenziato dalla progressiva attivazione di pathway pro-infiammatori nello studio dei pattern immunologici dei pazienti sani ad alto rischio, nei pazienti con diagnosi di fibrosi/cirrosi epatica e nei pazienti, infine, con conclamato epatocarcinoma [11]. La presenza di uno stato sistemico pro-infiammatorio, valutato mediante marcatori generici di infiammazione sistemica o il profilo sierico delle citochine, ha inoltre dimostrato un ruolo prognostico negativo con dati preliminari e contrastanti che mostrano una correlazione con il beneficio clinico al trattamento immunoterapico e alla tossicità da tale trattamento [12], in un contesto di assenza di affidabili marcatori predittivi di risposta.

L’assetto nutrizionale è un ulteriore ambito di ricerca strettamente correlato all’eziologia non virale di epatocarcinoma e al rimodellamento del microambiente tumorale di tipo immunosoppressivo legato all’obesità [13]. Recenti dati hanno valutato come le valutazioni quantitative della composizione corporea di tessuto

muscolare e/o tessuto adiposo mediante TC al basale predica la prognosi nei pazienti con diagnosi di epatocarcinoma [14]. È stato inoltre osservato come uno stato di sovrappeso, valutato mediante BMI, incida anche nello sviluppo di tossicità immunorelate [15]. Nonostante l'obesità sia un noto fattore di rischio per insorgenza di patologie oncologiche, è stata osservata in alcune casistiche una migliore risposta ai trattamenti immunoterapici. Tale fenomeno, definito come "obesity paradox" [16], potrebbe essere correlato ad uno stato infiammatorio sistemico cronico correlato all'obesità con modulazione degli stessi meccanismi su cui agisce l'immunoterapia oppure dovuto al confronto con una popolazione caratterizzata da cachessia neoplastica, noto fattore prognostico negativo.

Alla luce di tale premessa, è utile ricercare biomarcatori predittivi di risposta che valutino lo stato immunometabolico sistemico del paziente al basale e in corso di trattamento di immunoterapia con metodi miniminvasivi e riproducibili nel tempo.

## **1.2 Obiettivi dello studio**

Lo studio ha spiccato carattere esploratorio al fine di fornire un razionale per futuri studi con maggiore numerosità campionaria.

Potrebbe essere utile chiarire se è stato effettuato un calcolo a priori della numerosità campionaria o, in alternativa, sottolineare esplicitamente il carattere esploratorio dello studio. L'obiettivo generale del progetto di ricerca è di indagare in maniera prospettica il ruolo dei biomarcatori immunometabolici nei pazienti con diagnosi di epatocarcinoma (HCC) avanzato al fine di valutarne il loro ruolo nei pazienti con differente risposta clinica al trattamento con immunoterapia.

In seconda analisi, è stato valutato il ruolo predittivo di tali biomarcatori per lo sviluppo di tossicità immuno-mediate.

## **CAPITOLO II**

### **PAZIENTI E METODI**

#### **2.1 Selezione dei pazienti**

Il criterio di inclusione dello studio è la diagnosi di epatocarcinoma avanzato non suscettibile di trattamenti locoregionali candidati a trattamento sistemico con immunoterapia (combinazione di atezolizumab con bevacizumab, nivolumab in monoterapia oppure pembrolizumab in monoterapia).

I criteri di esclusione sono la presenza di patologie concomitanti infiammatorie sistemiche acute o croniche e l'utilizzo di corticosteroidi o altri trattamenti immunosoppressivi come terapia concomitante.

#### **2.2 Metodi**

##### **2.2.1 Disegno dello studio**

Lo studio ha valutato in maniera prospettica i principali biomarcatori immunometabolici, includendo l'analisi quantitativa di citochine, chemochine e fattori di crescita sierici in più determinazioni e la valutazione radiologica basale della composizione corporea (grado di obesità e/o sarcopenia) correlandoli con il beneficio clinico al trattamento (CB).

Ulteriori variabili clinico laboratoristiche raccolte al basale sono sesso, età, stadio, istotipo, ECOG Performance Score (PS), alfa-fetoproteina (AFP) sierica in più determinazioni, body mass index (BMI), comorbidità (in particolare la sindrome metabolica, diabete e la ipercolesterolemia), NLR, PLR, LDH, PCR (mg/L) e il prognostic nutritional index (PNI).

### **2.2.2 Raccolta delle variabili cliniche e laboratoristiche**

Il paziente è stato classificato come sovrappeso/obeso sulla base di BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> in accordo con WHO BMI classification.

Il NLR e il PLR sono indici di infiammazione sistemica che consistono nel rapporto tra numero di neutrofili o piastrine per il numero di linfociti a livello ematico, rispettivamente.

Il PNI è uno score che integra lo stato infiammatorio e nutrizionale del paziente ed è calcolato secondo la seguente formula:  $10 \times \text{albumina}(\text{gr/dl}) + [0.005 \times \text{conta linfocitaria assoluta (per mm}^3\text{)}]$ .

### **2.2.3 Determinazione dei livelli circolanti di citochine in più determinazioni**

I campioni ematici sono raccolti al basale (P0) e a successivi timepoints (dopo un mese (P1), in occasione della migliore risposta radiologica o a progressione (P2)), centrifugati e conservati a -80°C.

Le concentrazioni delle citochine sono state determinate mediante analisi Luminex (Bio-Plex®, Bio-Rad), basata su una curva standard costruita a partire da concentrazioni note di ciascun analita e adattata mediante regressione logistica a cinque parametri (5-PL). Ogni run analitico includeva un controllo positivo, utilizzato per verificare la corretta performance del sistema, e un campione bianco (blank) per la determinazione del rumore di fondo.

Il principio del metodo Luminex si fonda sull'impiego di microsfere fluorescenti (beads) internamente colorate con rapporti specifici di due fluorocromi, tali da generare una "firma spettrale" univoca per ciascun analita. Ogni popolazione di microsfere è rivestita con anticorpi catturanti specifici. Dopo incubazione con i

campioni, gli analiti sierici si legano agli anticorpi di cattura e vengono successivamente riconosciuti da un anticorpo secondario biotinilato, rivelato tramite streptavidina coniugata a ficoeritrina (PE).

La lettura è effettuata tramite un sistema di citometria a flusso dedicato, capace di distinguere simultaneamente: la popolazione di microsfere, consentendo l'identificazione dell'analita, l'intensità della fluorescenza del reporter, che rappresenta il segnale quantitativo.

La valutazione quantitativa è espressa come concentrazione in pg/ml, ottenuta mediante interpolazione su curve di calibrazione generate con standard noti, oppure come intensità media di fluorescenza (MFI), che rispetto alla concentrazione sierica, consente di ottenere una misura dell'entità di fluorescenza degli specifici analiti senza la interferenza dell'intensità di sottofondo.

Le citochine sono state considerate rilevabili quando la concentrazione interpolata rientrava nel range di quantificazione della curva standard (LLOQ–ULOQ) e il segnale di fluorescenza media (MFI) risultava superiore di almeno due deviazioni standard rispetto al valore medio del bianco. Nei campioni analizzati in duplicato, è stato considerato accettabile un coefficiente di variazione (CV%)  $\leq 20\%$ .

#### **2.2.4 Determinazione radiologica basale della composizione corporea**

L'imaging morfologico eseguito al basale è la TC con mezzo di contrasto iodato valutata da un radiologo con 8 anni di esperienza nell'ambito della patologia epato-biliare. Le caratteristiche delle lesioni epatiche sono state esaminate mediante Liver Imaging Reporting and Data System (LI-RADS) v2018, raccogliendo tali dati: numero di lesioni, aspetto morfologico, misurazione della lesione di maggiore dimensione, presenza di invasione macrovascolare della vena porta, caratteristiche

dell'enhancement, segni di diffusione di malattia in sede extraepatica, presenza di ascite o segni di ipertensione portale.

La valutazione quantitativa dello stato di sarcopenia e di obesità viscerale è stata effettuata mediante Horos software, misurando tale misurazione a livello della seconda vertebra lombare, correggendo con l'altezza al quadrato ( $m^2$ ). La sarcopenia è definita dal SMI (skeletal muscle index) sulla base di cutoff predefiniti dalla letteratura ( $52.4 \text{ cm}^2/m^2$  per gli uomini e  $38.5 \text{ cm}^2/m^2$  per le donne). L'obesità viscerale è invece definita come VFI (visceral fat index) mediante cutoff predefiniti dalla letteratura:  $163.8 \text{ cm}^2$  per gli uomini e  $80.1 \text{ cm}^2$  per le donne.

### **2.2.5 Valutazione degli outcomes clinici e delle tossicità**

La risposta al trattamento oncologico è valutata in ambito multidisciplinare con l'ausilio di radiologi dedicati alla patologia epato-biliare, tenendo in considerazione i criteri RECIST 1.1 e mRECIST. DCR è definito come somma dei casi con completa (CR) o parziale risposta (PR) radiologica includendo anche i casi con stabilità di malattia (SD).

I pazienti con beneficio clinico (CB) sono definiti dalla presenza di una malattia con CR, PR o SD e PFS  $\geq 6$  mesi.

La OS è definita come tempo dall'inizio del trattamento alla morte, mentre la PFS è definita come tempo dall'inizio del trattamento e la progressione clinico/radiologica. Il grado di tossicità immuno-relata è definito secondo le attuali linee guida aiom 2023 sulla "gestione della tossicità da immunoterapia".

## **2.3 Analisi statistica**

Il confronto tra le variabili ottenute è valutato mediante test di fischer per le variabili categoriche in considerazione della numerosità campionaria, e mediante t-test per

le variabili non categoriche in quanto distribuite normalmente.

Per le variabili continuative viene riportata la media e la relativa deviazione standard, mentre per le variabili categoriche la frequenza e il relativo valore in percentuale.

La sopravvivenza libera da progressione (PFS) e la sopravvivenza globale (OS) sono correlate alle variabili in studio mediante curve di Kaplan-Meier.

Viene effettuata la correlazione mediante modello di regressione logistica tra variabili ottenute e la risposta al trattamento oncologico (CB) e/o insorgenza di eventi avversi, con significatività definita come p value  $\leq 0.05$ . Ultima data di follow up è 22 luglio 2025.

Il progetto di ricerca ha ricevuto approvazione da parte del Comitato etico 1 in data 15/02/2022 (verbale 02/2022).

## CAPITOLO III

### RISULTATI

#### **3.1 Caratteristiche dei pazienti e risposta al trattamento**

Sono stati arruolati num. 20 pazienti, sulla base dei criteri di inclusione stabiliti, con relativa raccolta dei dati dalla cartella clinica e dei campioni biologici ematici disponibili al basale (n= 18) e in successivi timepoints: dopo un mese (n=11), in occasione della migliore risposta radiologica (n=7) e a progressione (n=1). I restanti campioni biologici non sono stati raccolti per alterata conservazione del campione o per perdita al follow-up del paziente (decesso/trasferimento presso altro centro oncologico).

Il follow-up mediano è di 20 mesi.

Per le caratteristiche della popolazione in esame vedi Tabella 1.

La popolazione in esame è rappresentata da una maggioranza di pazienti di sesso maschile (80%), con età media di 66.2 anni (8.8) con bilanciata distribuzione di Performance status (PS 0 nel 50% e PS 1 nel 50%) e di pazienti in sovrappeso/obesi secondo BMI (55%). Solo due pazienti hanno un BMI indicativo per sottopeso. La maggioranza ha indici di buona funzionalità epatica (Child-Pugh score A nel 95% dei casi) e con estensione di malattia classificata come BCLC stadio C nel 90%. Un pregresso trattamento locoregionale per l'epatocarcinoma è stato ricevuto nel 50% (n=10) dei casi.

L'eziologia dell'epatocarcinoma è di tipo virale nella maggioranza dei casi (70%), comprendendo pazienti con infezione cronica di HBV, HCV e genesi mista alcol-HCV relata, mentre i restanti casi presentano una eziologia non virale (epatopatia cronica alcolica, post-NASH o di tipo ignoto).

Il trattamento con immunoterapia ricevuto è rappresentato nel 75% (n=15) dalla combinazione con atezolizumab e bevacizumab in prima linea. I restanti casi hanno ricevuto pembrolizumab (15%; n=3) o nivolumab in monoterapia (10%; n=2), dopo progressione ad almeno una linea di trattamento con inibitori multichinasici, tra cui sorafenib (n=5, 100%), cabozantinib (n=3; 60%), lenvatinib (n=1; 20%) e regorafenib (n=1; 20%).

Un solo paziente è affetto da sindrome metabolica (incluso diabete e ipercolesterolemia), mentre un altro paziente ha in anamnesi la diagnosi di diabete mellito.

La risposta radiologica al trattamento (DCR) registrata è stata valutata dopo discussione multidisciplinare nella totalità dei casi, ed è stata del 65% (45% RP, 20% SD), con una PFS mediana di 8.5 mesi (IQR 3.3-28) e una sopravvivenza mediana di 15 mesi (IQR 4-30.8 mesi). La causa di morte è correlata al tumore nel 35% dei casi, a scompenso epatico nel 20% e ad eventi vascolari (nello specifico emoperitoneo, ictus emorragico, infarto del miocardio) nel 20% (tutti in trattamento concomitante con bevacizumab, un farmaco antiangiogenetico). In occasione dell'ultimo follow-up, 4 (20%) pazienti sono vivi. A progressione, 3 pazienti sono stati sottoposti a ulteriori trattamenti oncologici. Un caso ha partecipato ad un protocollo sperimentale di II linea con atezolizumab e lenvatinib. Ulteriori terapie somministrate a progressione sono capecitabina, sorafenib e cabozantinib.

### **3.2 Analisi delle variabili cliniche e laboratoristiche**

I valori di alfa-fetoproteina al basale sono rilevati nel 95% (n=19) dei casi con una mediana di 2919.9 (6889.2). La rilevazione ad un mese è stata possibile in 8 casi, in occasione della migliore risposta in 9 casi e a progressione di malattia in tre casi. Nei casi con almeno tre determinazioni di alfa-fetoproteina (n=7) è presente un

andamento concorde con il beneficio clinico al trattamento nella totalità dei casi, (Figura 2).

Tra le variabili cliniche, un ridotto PS ECOG e lo stato di sovrappeso hanno significativamente impattato nella risposta al trattamento e nella prognosi, con maggiore beneficio nei pazienti con PS ECOG e BMI $\geq$ 25 (Tabella 1 e Figura 7). In analisi multivariata l'elevato BMI si conferma come fattore predittivo di risposta al trattamento immunoterapico indipendente (HR 0,769; CI 0,546-0,993; p=0,001) (Tabella 2).

È stato inoltre dimostrato un vantaggio in sopravvivenza globale nei pazienti con eziologia alcol-relata ed epatopatia post- NASH (Figura 8).

La determinazione dei marcatori sierici di infiammazione sistemica è stata rilevata nell'85% (n=17) dei casi, con valore medio di NLR al basale di 3.2 (1.6), PLR 124.5 (67.6) e PNI 47.4 (10.1). Il valore di LDH è stato determinato in un solo paziente, mentre il valore di PCR in 4 casi (mediana 11.98).

Non è stata dimostrata una differenza significativa tra tali marcatori di infiammazione sistemica al basale e il beneficio clinico al trattamento con immunoterapia.

### **3.3 Analisi dei livelli circolanti di citochine**

Sulla base dei dati di letteratura è stato ritenuto utile dosare, mediante saggio Luminex, i livelli sierici delle seguenti citochine e fattori di crescita: G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, MCP-1 (MCAF), MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , HGF, IP-10 and VEGF (Figura 1).

Le citochine che sono state rilevate in concentrazione significativa sono IP-10, HGF, IL8, IL10, TNFalfa e MCP1, motivo per cui sono state selezionate per

l'analisi descrittiva e statistica (Figura 3). Nello specifico la MCP1 (monocyte chemoattractant protein-1), una chemochina con noto ruolo in tutti gli stadi di sviluppo di HCC, ha dimostrato con netta significatività statistica una maggiore concentrazione sierica e una maggiore MIF nei pazienti in assenza di beneficio clinico al trattamento con immunoterapia.

In analisi multivariata l'analisi quantitativa basale di MCP1 si conferma come fattore predittivo di risposta al trattamento immunoterapico indipendente sia per la concentrazione sierica espressa in pg/ml (HR 0,007; CI 0,002-0,013;  $p=0,007$ ) che per la MIF (HR 10,781; CI 0,072-21,489;  $p=0,049$ ) (Figura 4, 5; Tabella 2).

È stato osservato inoltre una tendenza di maggiore concentrazione/MIF media delle restanti citochine infiammatorie valutate singolarmente a livello sierico nei pazienti con peggiore prognosi, senza raggiungere una significatività statistica.

È stato individuato un cut-off mediante curva ROC per la variabile continuativa di MCP1 espressa in concentrazione e come MIF di 0.015 pg/ml e 15.19 rispettivamente. Sia la valutazione quantitativa di MCP1 definita come variabile dicotomica al basale (alto o basso), che la valutazione longitudinale (riduzione di almeno il 50% o meno a 1 mese dall'inizio del trattamento immunoterapico) non ha dimostrato una correlazione statistica con la PFS e la OS.

Non è stata dimostrata una differenza significativa tra la concentrazione sierica o la MFI tra le tre determinazioni temporali (P0, P1 e P2) nella popolazione generale e tra i responders/non responders.

### **3.4 Analisi dei dati radiologici al basale della composizione corporea**

La valutazione radiologica basale della composizione corporea ha evidenziato nel 35% dei casi una condizione di sarcopenia (definita da ridotto SMI) e nel 30% di obesità viscerale (definita da elevato VFI), con maggiore frequenza di entrambe le condizioni nei pazienti con beneficio clinico al trattamento in assenza di una chiara significatività statistica, anche dopo valutazione di tali variabili come continuative. La condizione di sarcopenia e di obesità viscerale si verifica in maniera mutualmente esclusiva (Figura 9).

### **3.5 Analisi dei dati relativi alla tossicità immunorelata**

Il riscontro di tossicità di grado  $\geq 2$  si verifica nel 45% dei casi, con maggiore prevalenza delle tossicità immunomediate che comprendono l'ipotiroidismo (10%), diarrea (10%), xerostomia (10%), polineuropatia (10%), iperlipasemia (5%) e artralgia (5%).

Degno di nota è la correlazione statisticamente significativa della concentrazione basale espressa come MIF della IL-10 e TNFalfa e la insorgenza di eventi avversi immunorelati, con minore concentrazione di tali citochine nei pazienti con tossicità (Figura 6).

## CAPITOLO IV

### 4.1 Discussione

L'update della letteratura effettuato conferma l'interesse scientifico per lo studio dei biomarcatori immunometabolici nei pazienti con diagnosi di epatocarcinoma [17] giustificato anche dalla recente introduzione della immunoterapia come standard fin dalla prima linea di trattamento sistemico, con notevole variabilità di risposta clinica interpersonale.

Gli studi registrativi non hanno riscontrato affidabili biomarcatori predittivi di risposta al trattamento con immunoterapia in un contesto di malattia con estrema variabilità di comportamento biologico e in pazienti con comorbidità che impattano notevolmente sulla prognosi. Attualmente i noti fattori prognostici sono lo stadio radiologico, il grado tumorale, il carico sintomatico del paziente (comorbidità, performance status, sintomi legati all'estensione locale di malattia) e soprattutto la severità della sottostante cirrosi epatica, se presente.

Nonostante la variabilità clinica dei pazienti con diagnosi di HCC avanzato e la ridotta numerosità campionaria, nell'ambito del progetto di ricerca è stata raccolta una casistica ben bilanciata in quanto a performance status e il BMI ed entrambi fattori clinici, nello specifico il ridotto PS e lo stato di sovrappeso hanno dimostrato una associazione con il beneficio clinico in accordo ai dati presenti in letteratura.

I dati di sopravvivenza dei pazienti arruolati (mOS=15 mesi e mPFS=8,5 mesi) si sono dimostrati sovrapponibili allo studio real-life AMETHISTA (mOS=18,2 mesi e mPFS=8,5 mesi). Spicca la percentuale di eventi avversi vascolari G5 (fatali) del 15% (n=3) (versus 2% dello studio AMETHISTA). Nello specifico due eventi di ictus emorragico sono avvenuti in pazienti con età di 71 e 79 anni in risposta parziale dopo 6 mesi dall'inizio del trattamento con atezolizumab e bevacizumab,

con in anamnesi diabete mellito di tipo II e valutazione cardiologica preliminare a inizio trattamento, comprensiva di ecocardio, permissiva.

Il terzo caso descritto è un paziente deceduto per IMA, con anamnesi di ipertensione arteriosa e pregresso TIA, sottoposto ad una somministrazione di atezolizumab e bevacizumab. Un ulteriore decesso è covid-correlato.

La elevata percentuale di decessi non correlata a tumore, in particolare gli eventi vascolari acuti avvenuti nei primi 6 mesi di trattamento, potrebbero avere inficiato i risultati dello studio. Nello studio AMETHISTA sono segnalati 14 (9%) casi di eventi fatali durante il trattamento (TEAE), 11 dei quali correlati non correlati al trattamento in studio (malattia da covid, colangite infettiva, polmonite, sepsi, ascite, emorragia gastrointestinale alta, insufficienza renale, bradicardia, causa non spiegata). Non sono specificati in termini numerici i casi di morte per insufficienza epatica, che nella nostra casistica rappresentano il 20% della totalità dei pazienti.

Eventi avversi immunomediati descritti nel nostro studio  $\geq$ G2 sono 45%, mentre lo studio Imbrave150 riporta eventi avversi immunorelati nel 22 % (qualsiasi grado) e lo studio AMETHISTA riporta eventi correlati a atezolizumab di qualsiasi grado nel 58% e G3 nel 18%.

La presenza di comorbidità che incidono sulla sopravvivenza e l'effetto di ulteriori linee di trattamento sono limiti nella scelta della sopravvivenza globale (OS) come endpoint di efficacia del trattamento oncologico nei pazienti con diagnosi di HCC.

La ricerca di endpoint surrogati è attuale materia di dibattito, in quanto ulteriori endpoints correlati alla risposta radiologica (PFS/TTP/OOR) sono dipendenti da metodologie in fase di standardizzazione (RECIST 1.1/mRECIST/iRECIST).

Inoltre, non tutte le progressioni radiologiche hanno lo stesso significato clinico (nuove lesioni intra/extraepatiche, invasione vascolare, crescita di nodulo preesistente). Degno di nota inoltre è la possibilità, secondo i criteri del protocollo

Imbrave 150 e Amethysta, di proseguire il trattamento con immunoterapia di combinazione fino a perdita del beneficio clinico. Per tale motivo in questo studio è stato reputato cruciale confrontare le variabili ottenute con il beneficio clinico ottenuto, definito secondo i criteri di un analogo studio [12].

L'andamento dei valori di AFP, nei pazienti che esprimono tale marcatore sierico al basale, si è dimostrata attendibile strumento di monitoraggio della risposta ai trattamenti in maniera concorde alla valutazione radiologica. In questo studio sono inoltre confermati tali dati, con andamento dei valori di alfa-fetoproteina con la risposta ai trattamenti oncologici.

In disaccordo con la presente analisi, alcuni dati di letteratura suggeriscono che l'eziologia non-virale sia più resistente ai regimi di trattamento immunoterapico, motivata dalla presenza di un differente microambiente tumorale. Tuttavia, tale informazione non deriva da studi con adeguata stratificazione dei pazienti e la prognosi dei pazienti è correlata allo stato di funzione epatica e anche al trattamento della sottostante epatopatia di base (l'uso della terapia antivirale nei pazienti con epatite cronica HCV-relata ha cambiato la storia naturale di malattia). È possibile che l'elevata mortalità correlata a scompenso epatico del nostro studio, in pazienti con HCC ad eziologia virale, abbia influito nella valutazione del tasso di risposta all'immunoterapia e sulla prognosi dei pazienti con eziologia virale.

Tali valutazioni speculative non comportano ad oggi un cambiamento dell'approccio terapeutico che ad oggi non dipende dall'eziologia dell'epatocarcinoma.

È di recente acquisizione una differenza significativa nei vari stadi evolutivi dell'HCC dei livelli sierici circolanti di citochine e chemochine, dimostrando specifici profili molecolari tra pazienti con fegato sano, cirrosi e cirrosi associata a HCC [17,18]. È stato inoltre dimostrato che il profilo delle citochine sieriche ha

anche un ruolo predittivo sulla sopravvivenza nei pazienti con diagnosi di HCC in stadio avanzato [19-21].

L'analisi quantitativa di MCP1 (monocyte chemoattractant protein-1), una chemochina con noto ruolo in tutti gli stadi di sviluppo di HCC, ha dimostrato con netta significatività statistica per la prima volta in letteratura un maggiore concentrazione sierica e una maggiore MIF nei pazienti in assenza di beneficio clinico al trattamento con immunoterapia in vivo.

MCP-1 e CCL2 sono lo stesso fattore; sono due nomi per la stessa piccola citochina appartenente alla famiglia delle chemochine CC, fondamentale nel reclutare cellule immunitarie, in particolare macrofagi M2 rieducando in senso "immunosoppressivo" i Tumor-associated macrophages (TAMs), la tipologia di leucociti predominanti a livello dell'HCC. Un modello murino ha dimostrato che il pathway mediato da MCP-1/CCL2 è un possibile snodo terapeutico per implementare l'efficacia della immunoterapia nell'HCC mediante la riprogrammazione le TAMs all'interno del microambiente tumorale. Utilizzando un'antagonista del recettore di CCL2, RS102895, è stato possibile interrompere l'immunosoppressivo crosstalk tra cellule tumorali SLFN11<sup>low</sup> e la popolazione macrofagica, con conseguente downregolazione dell'espressione di PDL-1. È stato inoltre investigato nel modello murino di HCC l'utilizzo di RS102895, di un anticorpo anti PD-1 o della loro combinazione, dimostrando che la doppietta ha maggior efficacia antitumorale rispetto alla monoterapia. Dopo tale terapia, all'indagine IHC inoltre è presente un maggior infiltrato di linfociti CD8 T e minore di macrofagi M2 conducendo ad una conversione in "tumore caldo" con relativa maggiore risposta all'immunoterapia [22].

È stato dimostrato inoltre che MCP-1 è upregolata nei pazienti con HCC e, insieme all'alfa-fetoproteina sierica, può predire lo stadio tumorale in maniera più sensibile rispetto al solo valore di alfa-fetoproteina [23].

Una minore responsività ai trattamenti correlata ad uno stato pro-infiammatorio sistemico è dimostrata da elevati valori di IL6 sierici in pazienti HCC non-responders in un analogo studio pubblicato [12].

La mancata dimostrazione di correlazione tra i livelli di MCP-1 ed endpoint di comune utilizzo nell'ambito oncologico, come la OS e la PFS, potrebbe essere correlata all'assenza di cutoff standardizzati, a fattori confondenti che influenzano la sopravvivenza (comorbidità, morti non correlate al tumore) e ridotta numerosità campionaria.

Nonostante in letteratura sia descritto un ruolo predittivo dei marcatori di stato infiammatorio sistemico (NLR, PLR) in tutte le patologie oncologiche, compresi i pazienti con diagnosi di HCC [24], questo studio non ha dimostrato una correlazione tra questi fattori al basale e la risposta alla immunoterapia negli HCC. In merito all'impatto dell'assetto metabolico, differenti studi dimostrano che l'obesità contribuisce allo sviluppo di un ambiente immunosoppressivo con modifiche anche a livello del microambiente tumorale [25]. Questo studio ha mostrato nettamente che lo stato di sovrappeso è un fattore predittivo e prognostico positivo di tipo indipendente.

Il dato di maggiore risposta ad agenti anti PD-1 nei pazienti sovrappeso potrebbe essere spiegato da studi che associano una elevata espressione di PDL1 sui linfociti T mediata dalla leptina, ulteriore fattore associato ad uno stato di immunodepressione, nei pazienti sovrappeso con diagnosi di HCC [25]. Gli effetti dell'obesità sulla modulazione del microambiente tumorale in vivo nel modello umano sono anche dimostrati dall'associazione con lo sviluppo di maggiori

tossicità immunomediate in altre patologie oncologiche [27-28], a loro volta correlate con una maggiore risposta all'immunoterapia [29]. La valutazione radiologica della composizione corporea ha potenzialmente un maggior ruolo, rispetto al solo BMI, di determinazione del reale stato di obesità con riconosciuto impatto prognostico in pazienti con HCC [14]. Tuttavia, sia lo stato di sarcopenia che di obesità muscolare non hanno mostrato una chiara correlazione con la risposta al trattamento immunoterapico.

Il dato relativo all'associazione tra ridotti livelli sierici circolanti di IL10 e TNF alfa al basale e l'insorgenza di tossicità immunorelate è contrastante e non supportato dai dati di letteratura.

La mancata correlazione tra ulteriori marcatori immunometabolici e la risposta al trattamento potrebbe essere correlata alla ridotta numerosità campionaria, tuttavia il forte razionale alla base di tale studio merita ulteriori approfondimenti su vasta scala, con confronto diretto tra biomarcatori sierici e del microambiente tumorale, in particolare in merito allo studio delle chemochine che possano riprogrammare le TAMs e quindi la immunoresponsività delle cellule di HCC.

Ulteriore limite dello studio è l'inclusione di pazienti pretrattati nel 25% dei casi, determinando una maggiore eterogeneità della popolazione in esame e alterando la attendibilità dei parametri relativi alla sopravvivenza globale.

## 4.2 Prospettive future

Lo studio dei rapporti tra metabolismo, composizione corporea, assetto immunitario ed epatocarcinoma è di notevole interesse scientifico alla luce della recente introduzione della immunoterapia nello scenario terapeutico di tale patologia, la quale ne ha cambiato la storia naturale di malattia.

La estesa variabilità clinica di tale popolazione e la differente risposta ai trattamenti immunoterapici impone uno sforzo, in particolare da parte della ricerca indipendente e accademica, per studiare il paziente neoplastico da molteplici prospettive nello stesso momento, cioè dal punto di vista metabolico, nutrizionale e oncologico al fine di individuare biomarcatori predittivi attendibili e affidabili sia di risposta al trattamento che di tossicità.

Questo studio inoltre pone le basi per approfondire il pathway mediato da MCP-1/CCL2, possibile nodo cruciale per implementare l'efficacia della immunoterapia nell'HCC mediante la riprogrammazione le TAMs all'interno del microambiente tumorale.

## CAPITOLO IV

### TABELLE E FIGURE

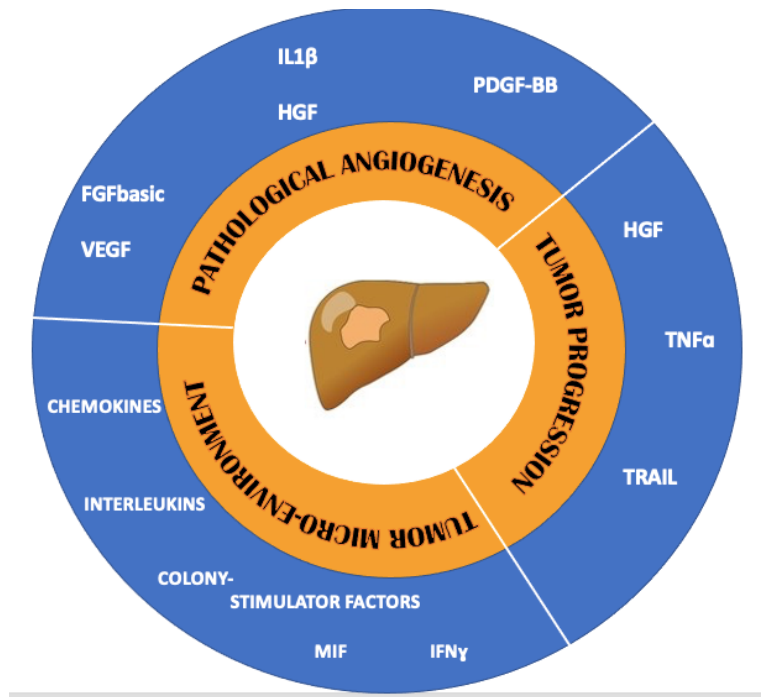


Figura 1. Ruolo delle citochine nei processi di angiogenesi, infiammazione e oncogenesi correlati all'epatocarcinoma

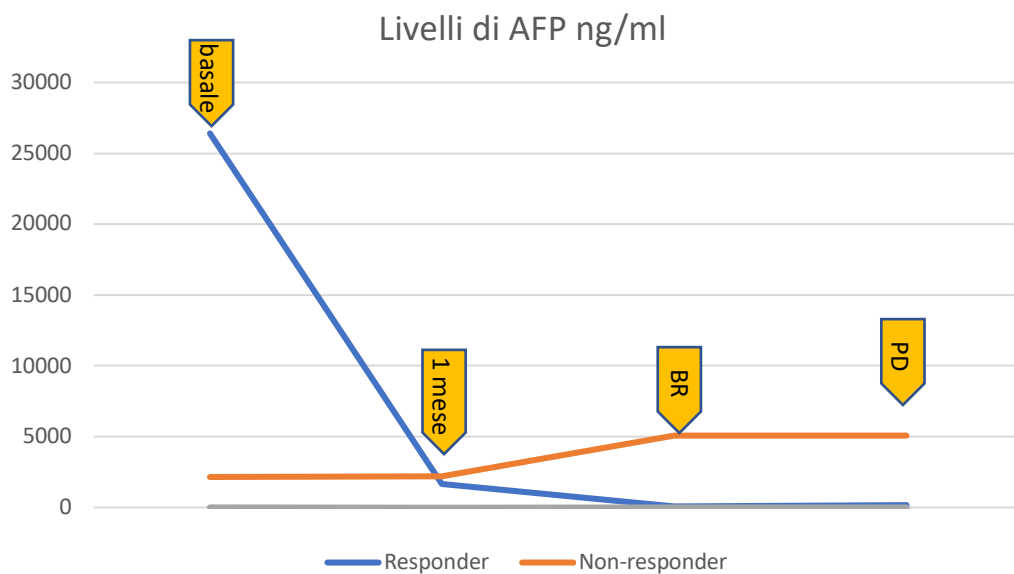


Figura 2. Andamento nel tempo dei valori di alfa-fetoproteina (AFP) in correlazione con la risposta al trattamento in due differenti pazienti

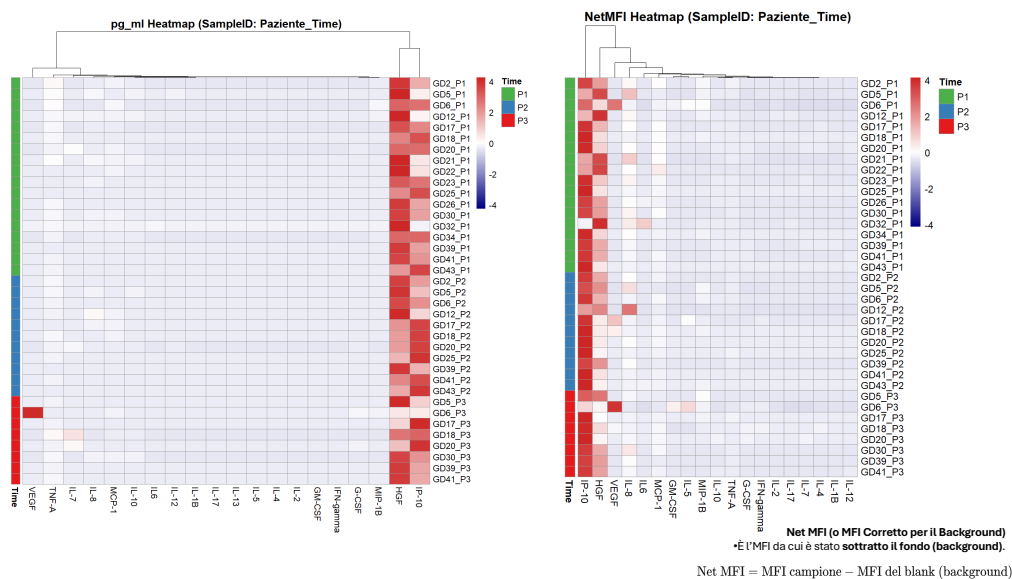


Figura 3. Analisi delle concentrazioni delle citochine G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, MCP-1 (MCAF), MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , HGF, IP-10 and VEGF che sono state determinate mediante analisi Luminex (Bio-Plex®, Bio-Rad)

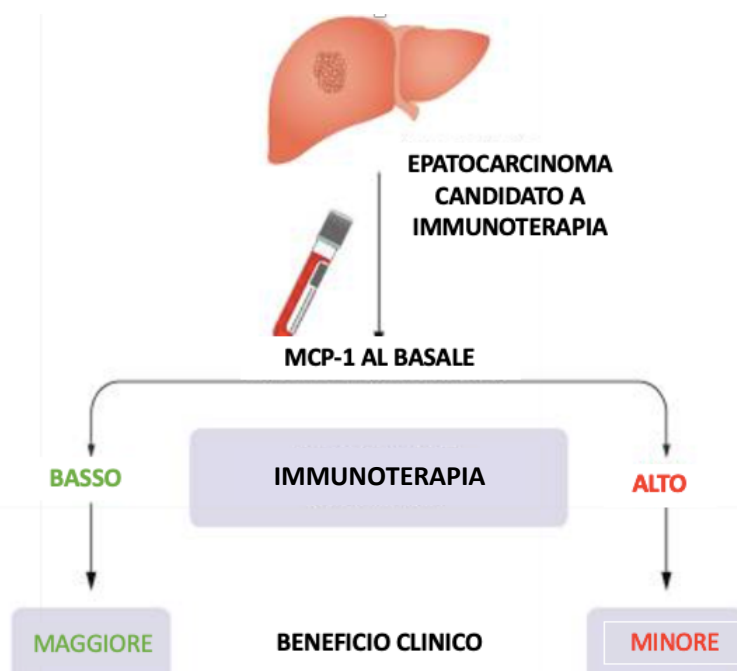


Figura 4. Correlazione tra MCP-1 sierico basale e beneficio clinico a immunoterapia

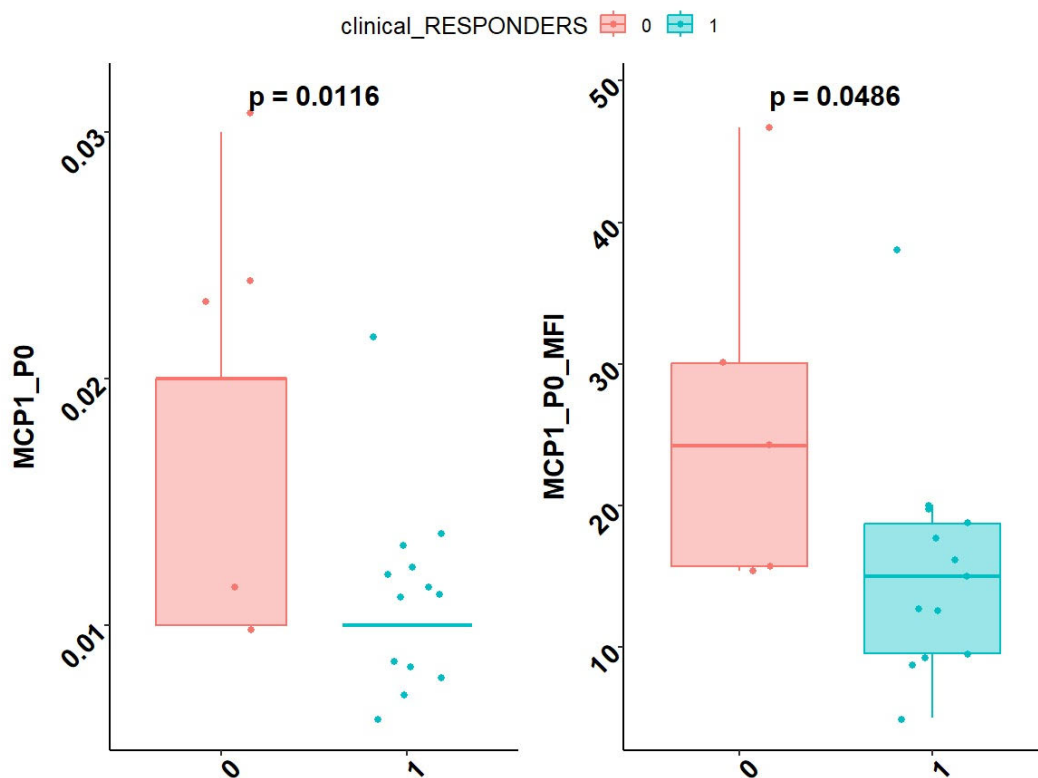


Figura 5. Correlazione tra analisi quantitativa di MCP-1 a livello sierico (espresso come concentrazione pg/ml oppure come MFI) e la risposta al trattamento con immunoterapia (beneficio clinico= presenza di una malattia con CR, PR o SD e PFS  $\geq 6$  mesi)

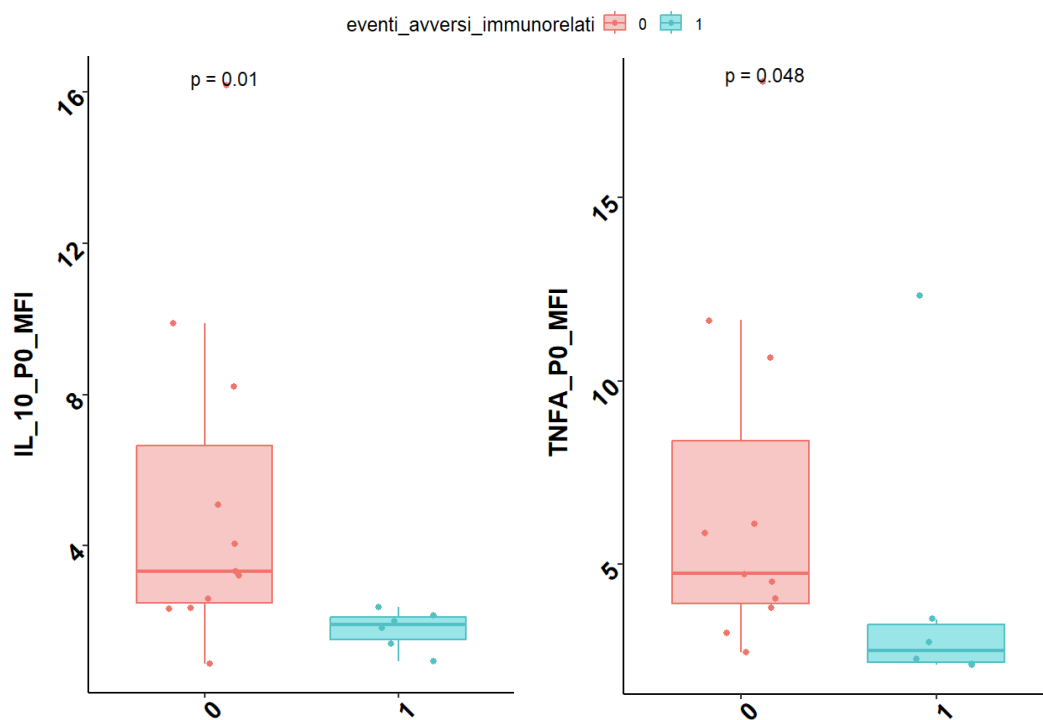


Figura 6. Correlazione tra analisi quantitativa di IL-10 e TNF alfa a livello sierico basale (espressi come MFI) e la insorgenza di tossicità al trattamento con immunoterapia

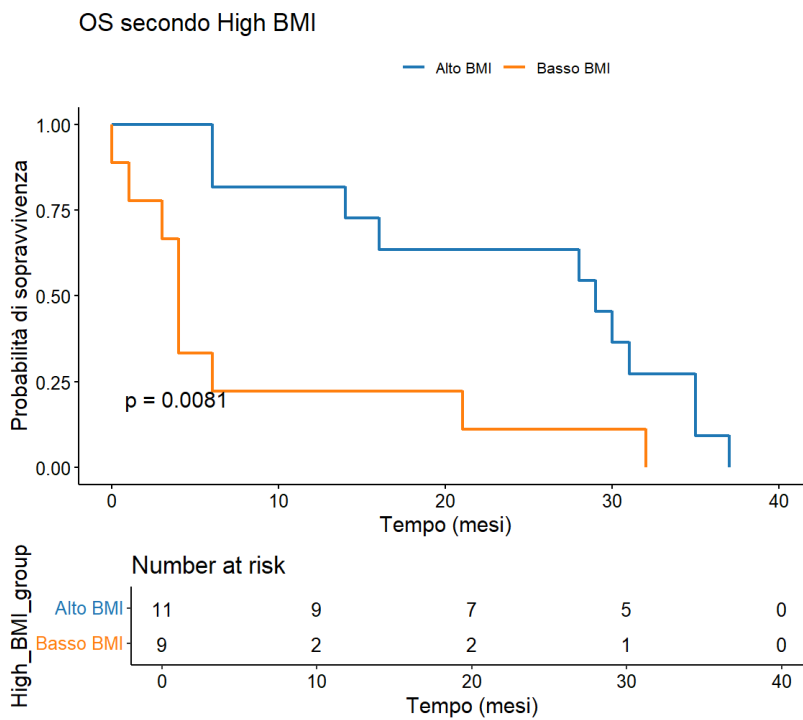
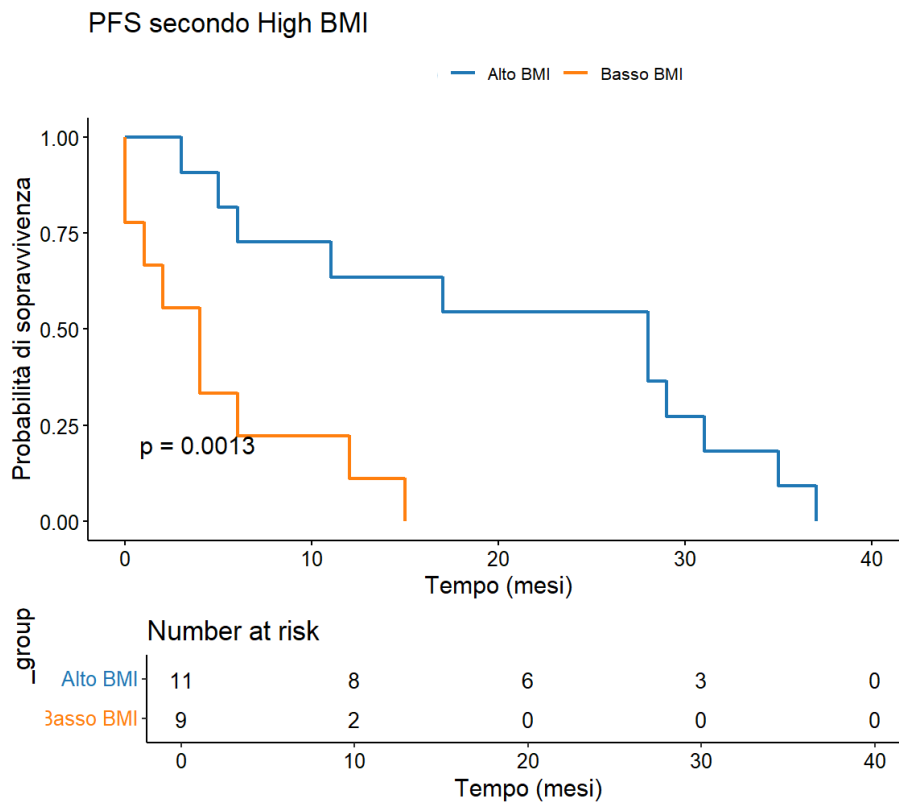


Figura 7. Curva di Kaplan-Meier per PFS e OS in riferimento al BMI secondo cutoff di  $\geq 25$ .

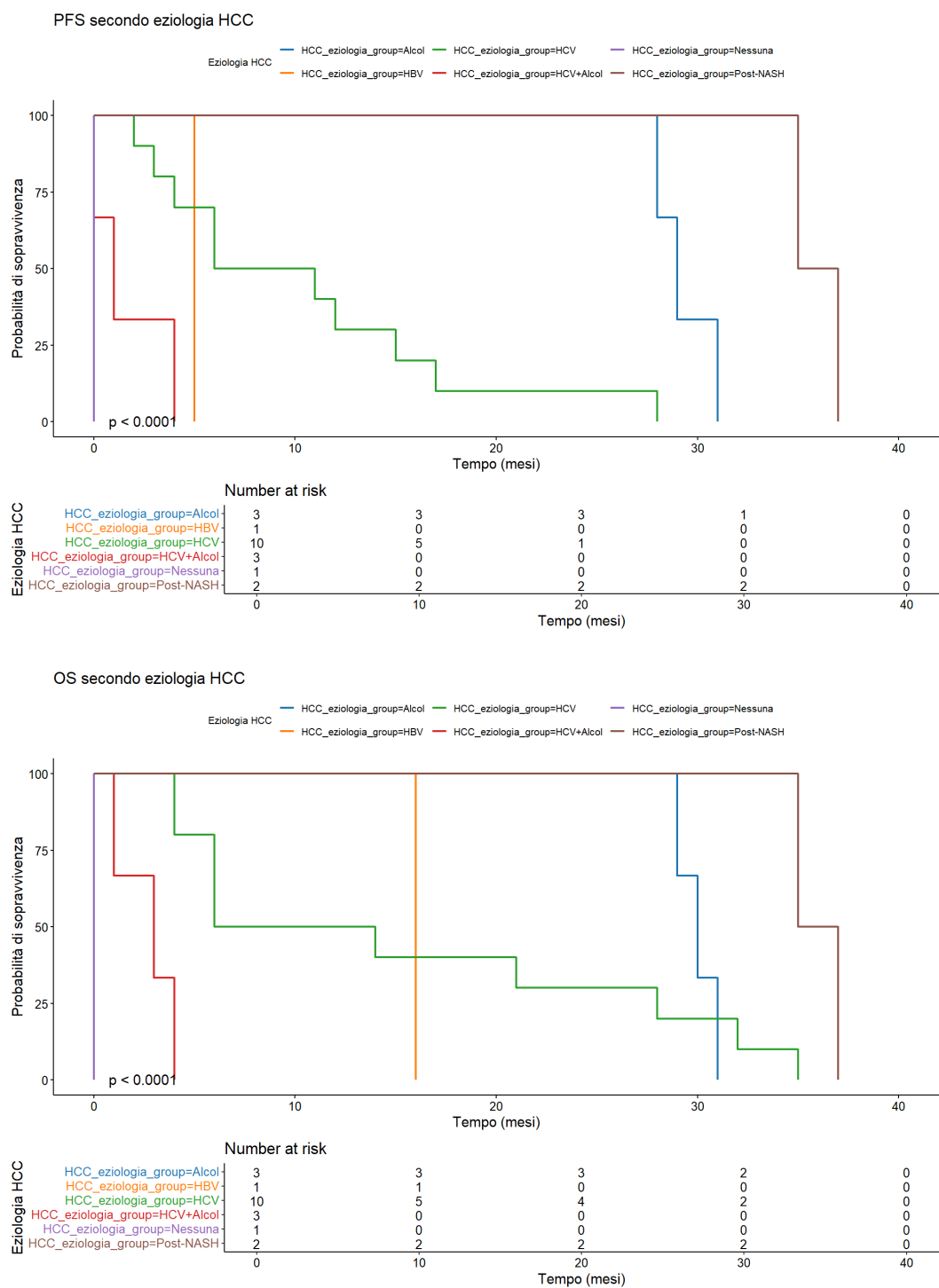


Figura 8. Curva di Kaplan-Meier per PFS e OS in riferimento alla eziologia di HCC

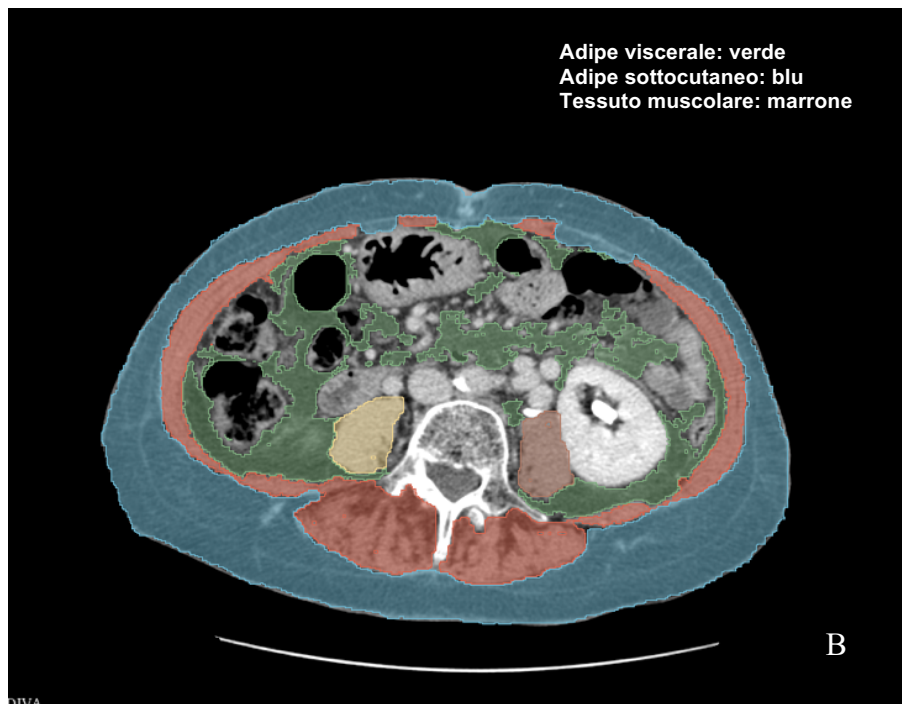
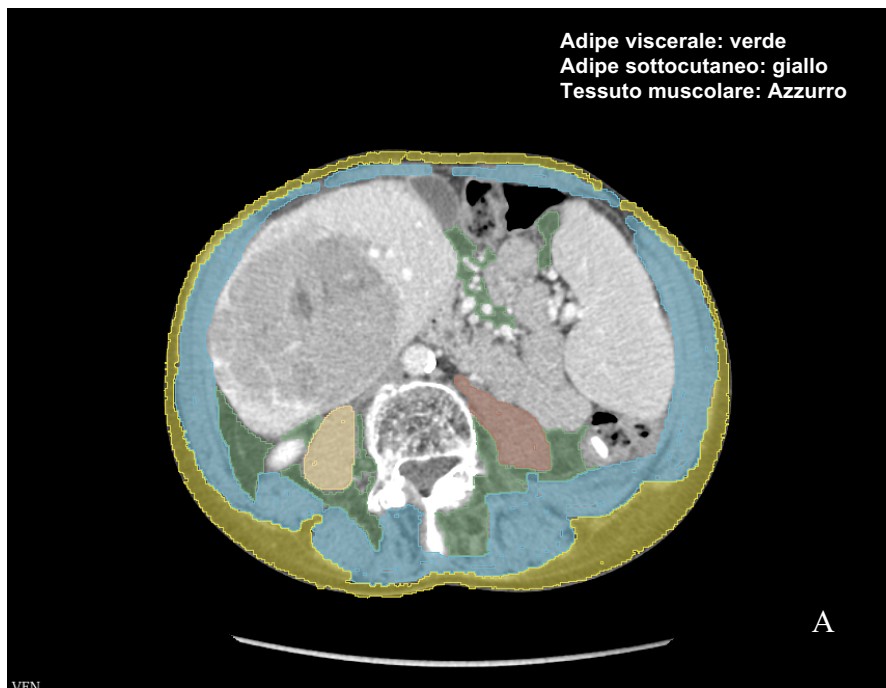


Figura 9. Esempi di immagini della determinazione radiologica basale della composizione corporea.

In A, paziente uomo con SMI  $103 \text{ cm}^2/\text{m}^2$  e VFI  $35,6 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ .

In B, paziente donna con SMI  $149,8 \text{ cm}^2/\text{m}^2$  e VFI  $274,7 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ .

| Variabili                   | Totali (n=20)   | Beneficio clinico (n=13) | Non-beneficio clinico (n=7) | P value                                       |
|-----------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------|
| Sesso maschile              | 16 (80%)        | 11 (68%)                 | 5 (32%)                     | 0.44                                          |
| Età                         | 66.2 (8.8)      | 67.0 (9.5)               | 64.7 (7.9)                  | 0.59                                          |
| BCLC stadio C               | 18 (90%)        | 11 (61%)                 | 7 (39%)                     | 0.41                                          |
| Eziologia di HCC            |                 |                          |                             |                                               |
| Sconosciuta                 | 1 (5%)          | 0 (0%)                   | 1 (100%)                    | 0.056                                         |
| Epatite C                   | 10 (50%)        | 7 (70%)                  | 3 (30%)                     |                                               |
| Epatite B                   | 1 (5%)          | 1 (100%)                 | 0 (0%)                      |                                               |
| Alcol                       | 3 (15%)         | 3 (100%)                 | 0 (0%)                      |                                               |
| Post-nash                   | 2 (10%)         | 2 (100%)                 | 0 (0%)                      |                                               |
| Alcol+Epatite C             | 3 (15%)         | 0 (0%)                   | 3 (100%)                    |                                               |
| Virale                      | 14 (70%)        | 8 (57%)                  | 6 (43%)                     | 0.28                                          |
| PS 0 ECOG                   | 10 (50%)        | 9 (90%)                  | 1 (10%)                     | <b>0.029</b><br>HR(CI): 0.3 (0.046-0.57)      |
| Body max index (BMI)        | 24.7 (4.8)      | 25.8 (4.2)               | 22.6 (5.6)                  | 0.17                                          |
| Sovrappeso                  | 11 (55%)        | 10 (91%)                 | 1 (9%)                      | <b>0.012</b><br>HR(CI): 0.77 (0.53-1.01)      |
| Child score                 |                 |                          |                             |                                               |
| A5                          | 11 (55%)        | 9 (82%)                  | 2 (18%)                     | 0.134                                         |
| A6                          | 8 (40%)         | 4 (50%)                  | 4 (50%)                     |                                               |
| B7                          | 1 (5%)          | 0 (0%)                   | 1 (100%)                    |                                               |
| Alfa-fetoproteina basale    | 2919.9 (6889.2) | 3595.1 (8515.5)          | 1762.3 (2639.9)             | 0.59                                          |
| Albumina                    | 3.9 (0.7)       | 3.8 (0.5)                | 4.1 (1.0)                   | 0.42                                          |
| NLR                         | 3.2 (1.6)       | 2.9 (1.7)                | 3.7 (1.4)                   | 0.32                                          |
| PLR                         | 124.5 (67.6)    | 111.6 (60.2)             | 148.3 (79.4)                | 0.29                                          |
| PNI                         | 47.4 (10.1)     | 46.7 (10.1)              | 48.6 (10.9)                 | 0.72                                          |
| HGF pg/ml                   | 1.2 (1.0)       | 1.1 (0.9)                | 1.5 (1.2)                   | 0.46                                          |
| IL-8 pg/ml                  | 0.02 (0.02)     | 0.02 (0.03)              | 0.02 (0.01)                 | 0.88                                          |
| IL-10 pg/ml                 | 0.01 (0.01)     | 0.01 (0.01)              | 0.01 (0.01)                 | 0.60                                          |
| IP-10 pg/ml                 | 0.5 (0.3)       | 0.4 (0.3)                | 0.6 (0.3)                   | 0.29                                          |
| MCP-1 pg/ml                 | 0.01 (0.01)     | 0.01 (0.003)             | 0.02 (0.01)                 | <b>0.012</b><br>HR(CI): 0.01 (0.008-0.014)    |
| TNF alfa pg/ml              | 0.05 (0.05)     | 0.05 (0.05)              | 0.06 (0.03)                 | 0.52                                          |
| HGF MIF                     | 188.5 (143.3)   | 163.5 (126.4)            | 253.6 (178.9)               | 0.24                                          |
| IL-8 MIF                    | 42.7 (39.8)     | 39.4 (45.7)              | 51.4 (18.2)                 | 0.58                                          |
| IL-10 MIF                   | 4.0 (4.0)       | 3.9 (4.5)                | 4.5 (2.4)                   | 0.77                                          |
| IP-10 MIF                   | 330.8 (237.3)   | 291.3 (236.4)            | 433.5 (231.3)               | 0.27                                          |
| MCP-1 MIF                   | 18.6 (10.6)     | 15.6 (8.2)               | 26.4 (12.9)                 | <b>0.049</b><br>HR(CI): 15.6 (9.9-21.3)       |
| TNF alfa MIF                | 5.9 (4.5)       | 5.3 (4.8)                | 7.5 (3.8)                   | 0.39                                          |
| Sarcopenia                  | 7 (35%)         | 5 (71%)                  | 2 (29%)                     | 0.53                                          |
| Obesità viscerale           | 6 (30%)         | 4 (67%)                  | 2 (33%)                     | 0.66                                          |
| Skeletal muscle index (SMI) | 82,6 (43.8)     | 79.8 (42.0)              | 87.9 (49.8)                 | 0.70                                          |
| Visceral fat index (VFI)    | 109.9 (76.8)    | 106.9 (75.6)             | 115.5 (84.9)                | 0.82                                          |
| PFS                         | 8.5 (3.3-28)    | 20 (11.7)                | 2 (1.7)                     | <b>&lt;0.0001</b><br>HR(CI): 20 (14.4-25.6)   |
| OS                          | 15 (4-30.8)     | 24.6 (10.9)              | 3.1 (2.0)                   | <b>&lt;0.0001</b><br>HR(CI): 24.6 (19.4-29.8) |

Tabella 1. Caratteristiche della popolazione generale associata ad analisi univariata tra variabili ottenute e la risposta al trattamento oncologico (beneficio clinico= presenza di una malattia con CR, PR o SD e PFS  $\geq 6$  mesi)

| Variabile dipendente | HR     | Significatività<br>(p value) | Intervallo di confidenza 95% |                  |
|----------------------|--------|------------------------------|------------------------------|------------------|
|                      |        |                              | Limite inferiore             | Limite superiore |
| Eziologia di HCC     | 0,4    | 0,642                        | 1,057                        | 2,943            |
| PS ECOG              | 0,492  | 0,065                        | 0,035                        | 1,019            |
| Sovrappeso           | 0,769  | <b>0,001</b>                 | 0,546                        | 0,993            |
| MCP-1 pg/ml basale   | 0,007  | <b>0,012</b>                 | 0,002                        | 0,013            |
| MCP-1 MIF basale     | 10,781 | <b>0,049</b>                 | 0,072                        | 21,489           |
| PFS (mesi)           | 20     | <b>0,004</b>                 | 14,024                       | 25,976           |
| OS (mesi)            | 24,615 | <b>&lt;0,001</b>             | 19,056                       | 30,174           |

Tabella 2. Analisi multivariata tra variabili ottenute e la risposta al trattamento oncologico (beneficio clinico= presenza di una malattia con CR, PR o SD e PFS  $\geq 6$  mesi)

## BIBLIOGRAFIA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2020 Jul;70(4):313. doi: 10.3322/caac.21609. PMID: 30207593.
2. AIOM-AIRTUM. I numeri del cancro in Italia; 2024.
3. Cabibbo G, Petta S, Barbara M, Attardo S, Bucci L, Farinati F, Giannini EG, Negrini G, Ciccarese F, Rapaccini GL, Di Marco M, Caturelli E, Zoli M, Borzio F, Sacco R, Virdone R, Marra F, Mega A, Morisco F, Benvegnù L, Gasbarrini A, Svegliati-Baroni G, Foschi FG, Olivani A, Masotto A, Nardone G, Colecchia A, Persico M, Craxì A, Trevisani F, Cammà C; Italian Liver Cancer (ITA.LI.CA) group. Hepatic decompensation is the major driver of death in HCV-infected cirrhotic patients with successfully treated early hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2017 Jul;67(1):65-71. doi: 10.1016/j.jhep.2017.01.033. Epub 2017 Feb 10. PMID: 28192185.
4. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim TY, Kudo M, Breder V, Merle P, Kaseb AO, Li D, Verret W, Xu DZ, Hernandez S, Liu J, Huang C, Mulla S, Wang Y, Lim HY, Zhu AX, Cheng AL; IMbrave150 Investigators. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2020 May 14;382(20):1894-1905. doi: 10.1056/NEJMoa1915745. PMID: 32402160.
5. Abou-Alfa GK, Lau G, Kudo M, Chan SL, Kelley RK, Furuse J, Sukeepaisarnjaroen W, Kang YK, Van Dao T, De Toni EN, Rimassa L, Breder V, Vasilyev A, Heurgué A, Tam VC, Mody K, Thungappa SC, Ostapenko Y, Yau T,

Azevedo S, Varela M, Cheng AL, Qin S, Galle PR, Ali S, Marcovitz M, Makowsky M, He P, Kurland JF, Negro A, Sangro B. Tremelimumab plus Durvalumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *NEJM Evid.* 2022 Aug;1(8):EVIDoa2100070. doi: 10.1056/EVIDoa2100070. Epub 2022 Jun 6. PMID: 38319892.

6. Cheng AL, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim TY, Lim HY, Kudo M, Breder V, Merle P, Kaseb AO, Li D, Verret W, Ma N, Nicholas A, Wang Y, Li L, Zhu AX, Finn RS. Updated efficacy and safety data from IMbrave150: Atezolizumab plus bevacizumab vs. sorafenib for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2022 Apr;76(4):862-873

7. Piscaglia F, Masi G, Martinelli E, Cabibbo G, Di Maio M, Gasbarrini A, Iavarone M, Antonuzzo L, Mazzaferro V, Ballestrero A, Garufi C, Bergamo F, Celsa C, Marino D, Tovoli F, Ponziani FR, Pressiani T, Astolfi C, Gazzoli GC, Ciardiello F, Daniele B, Rimassa L. Atezolizumab plus bevacizumab as first-line treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: interim analysis results from the phase IIIb AMETHISTA trial. *ESMO Open.* 2025 Feb;10(2):104110. doi: 10.1016/j.esmoop.2024.104110. Epub 2025 Jan 27. PMID: 39874903; PMCID: PMC11799967.

8. Finn RS, Gu K, Chen X, Merle P, Lee KH, Bouattour M, Cao P, Wang W, Cheng AL, Zhu L, Lim HY, Kudo M, Pan Y, Chang TT, Edeline J, Li W, Yang P, Li C, Li J, Siegel AB, Qin S. Second-line pembrolizumab for advanced HCC: Meta-analysis of the phase III KEYNOTE-240 and KEYNOTE-394 studies. *JHEP Rep.* 2025 Feb 4;7(6):101350. doi: 10.1016/j.jhepr.2025.101350. PMID: 40486134; PMCID: PMC12143813.

9. El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, Crocenzi TS, Kudo M, Hsu C, Kim TY, Choo SP, Trojan J, Welling TH Rd, Meyer T, Kang YK, Yeo W, Chopra A,

- Anderson J, Dela Cruz C, Lang L, Neely J, Tang H, Dastani HB, Melero I. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet*. 2017 Jun 24;389(10088):2492-2502. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31046-2. Epub 2017 Apr 20. PMID: 28434648; PMCID: PMC7539326.
10. Sia D, Jiao Y, Martinez-Quetglas I, Kuchuk O, Villacorta-Martin C, Castro de Moura M, Putra J, Camprecios G, Bassaganyas L, Akers N, Losic B, Waxman S, Thung SN, Mazzaferro V, Esteller M, Friedman SL, Schwartz M, Villanueva A, Llovet JM. Identification of an Immune-specific Class of Hepatocellular Carcinoma, Based on Molecular Features. *Gastroenterology*. 2017 Sep;153(3):812-826. doi: 10.1053/j.gastro.2017.06.007. Epub 2017 Jun 15. PMID: 28624577; PMCID: PMC12166766.
  11. Chen HJ, Hu MH, Xu FG, Xu HJ, She JJ, Xia HP. Understanding the inflammation-cancer transformation in the development of primary liver cancer. *Hepatoma Res*. 2018;4:29. <http://dx.doi.org/10.20517/2394-5079.2018.18>
  12. Yang H, Kang B, Ha Y, Lee SH, Kim I, Kim H, Lee WS, Kim G, Jung S, Rha SY, Gaillard VE, Cheon J, Kim C, Chon HJ. High serum IL-6 correlates with reduced clinical benefit of atezolizumab and bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *JHEP Rep*. 2023 Jan 16;5(4):100672. doi: 10.1016/j.jhepr.2023.100672. PMID: 36866388; PMCID: PMC9972403.
  13. Yang J, He J, Feng Y, Xiang M. Obesity contributes to hepatocellular carcinoma development via immunosuppressive microenvironment remodeling. *Front Immunol*. 2023 May 17;14:1166440. doi: 10.3389/fimmu.2023.1166440. PMID: 37266440; PMCID: PMC10231659.
  14. Xiong B, Fu B, Wu Y, Gao F, Hou C. Body composition predicts prognosis of hepatocellular carcinoma patients undergoing immune checkpoint inhibitors. *J*

Cancer Res Clin Oncol. 2023 Oct;149(13):11607-11617. doi: 10.1007/s00432-023-05051-z. Epub 2023 Jul 4. PMID: 37400572; PMCID: PMC11797616.

15. Cortellini A, Bersanelli M, Santini D, Buti S, Tiseo M, Cannita K, Perrone F, Giusti R, De Tursi M, Zoratto F, Marconcini R, Russano M, Zeppola T, Anesi C, Filetti M, Marchetti P, Botticelli A, Gelibter A, De Galitiis F, Vitale MG, Rastelli F, Tudini M, Silva RR, Atzori F, Chiari R, Ricciuti B, De Giglio A, Migliorino MR, Mallardo D, Vanella V, Mosillo C, Bracarda S, Rinaldi S, Berardi R, Natoli C, Ficorella C, Porzio G, Ascierto PA. Another side of the association between body mass index (BMI) and clinical outcomes of cancer patients receiving programmed cell death protein-1 (PD-1)/ Programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) checkpoint inhibitors: A multicentre analysis of immune-related adverse events. *Eur J Cancer*. 2020 Mar;128:17-26. doi: 10.1016/j.ejca.2019.12.031. Epub 2020 Mar 5. PMID: 32109847.

16. Yoo SK, Chowell D, Valero C, Morris LGT, Chan TA. Outcomes Among Patients With or Without Obesity and With Cancer Following Treatment With Immune Checkpoint Blockade. *JAMA Netw Open*. 2022 Feb 1;5(2):e220448. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.0448. PMID: 35226089; PMCID: PMC8886536.

17. Estevez J, Chen VL, Podlaha O, Li B, Le A, Vutien P, Chang ET, Rosenberg-Hasson Y, Jiang Z, Pflanz S, Ge D, Gaggar A, Nguyen MH. Differential Serum Cytokine Profiles in Patients with Chronic Hepatitis B, C, and Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep*. 2017 Sep 19;7(1):11867. doi: 10.1038/s41598-017-11975-7. PMID: 28928388; PMCID: PMC5605527.

18. Owusu Sekyere S, Port K, Deterding K, Cornberg M, Wedemeyer H. Inflammatory patterns in plasma associate with hepatocellular carcinoma development in cured hepatitis C cirrhotic patients. *United European Gastroenterol*

- J. 2021 May;9(4):486-496. doi: 10.1177/2050640620976991. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33349201; PMCID: PMC8259286.
19. Hayashi T, Yamashita T, Terashima T, Suda T, Okada H, Asahina Y, Hayashi T, Hara Y, Nio K, Sunagozaka H, Takatori H, Arai K, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Serum cytokine profiles predict survival benefits in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*. 2017 Dec 19;17(1):870. doi: 10.1186/s12885-017-3889-x. PMID: 29258450; PMCID: PMC5738185.
20. Gelu-Simeon M, Samuel D. Role of cytokine levels in assessment of prognosis and post-treatment outcome in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int*. 2013 Jul;7(3):788-91. doi: 10.1007/s12072-013-9441-4. Epub 2013 Sep 10. PMID: 26201913.
21. Cha H, Lee EJ, Seong J. Multi-analyte analysis of cytokines that predict outcomes in patients with hepatocellular carcinoma treated with radiotherapy. *World J Gastroenterol*. 2017 Mar 21;23(11):2077-2085. doi: 10.3748/wjg.v23.i11.2077. PMID: 28373775; PMCID: PMC5360650.
22. Zhou C, Weng J, Liu C, Liu S, Hu Z, Xie X, Gao D, Zhou Q, Sun J, Xu R, Li H, Shen Y, Yi Y, Shi Y, Sheng X, Dong Q, Hung MC, Ren N. Disruption of SLFN11 Deficiency-Induced CCL2 Signaling and Macrophage M2 Polarization Potentiates Anti-PD-1 Therapy Efficacy in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2023 Jun;164(7):1261-1278. doi: 10.1053/j.gastro.2023.02.005. Epub 2023 Feb 28. PMID: 36863689
23. Wang WW, Ang SF, Kumar R, Heah C, Utama A, Tania NP, Li H, Tan SH, Poo D, Choo SP, Chow WC, Tan CK, Toh HC. Identification of serum monocyte chemoattractant protein-1 and prolactin as potential tumor markers in

- hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2013 Jul 18;8(7):e68904. doi: 10.1371/journal.pone.0068904. PMID: 23874805; PMCID: PMC3715515.
24. Muhammed A, Fulgenzi CAM, Dharmapuri S, Pinter M, Balcar L, Scheiner B, Marron TU, Jun T, Saeed A, Hildebrand H, Muzaffar M, Navaid M, Naqash AR, Gampa A, Ozbek U, Lin JY, Perone Y, Vincenzi B, Silletta M, Pillai A, Wang Y, Khan U, Huang YH, Bettinger D, Abugabal YI, Kaseb A, Pressiani T, Personeni N, Rimassa L, Nishida N, Di Tommaso L, Kudo M, Vogel A, Mauri FA, Cortellini A, Sharma R, D'Alessio A, Ang C, Pinato DJ. The Systemic Inflammatory Response Identifies Patients with Adverse Clinical Outcome from Immunotherapy in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 31;14(1):186. doi: 10.3390/cancers14010186. PMID: 35008350; PMCID: PMC8750517.
25. Yang J, He J, Feng Y, Xiang M. Obesity contributes to hepatocellular carcinoma development via immunosuppressive microenvironment remodeling. *Front Immunol*. 2023 May 17;14:1166440. doi: 10.3389/fimmu.2023.1166440. PMID: 37266440; PMCID: PMC10231659.
26. Wang Z, Aguilar EG, Luna JI, Dunai C, Khuat LT, Le CT, Mirsoian A, Minnar CM, Stoffel KM, Sturgill IR, Grossenbacher SK, Withers SS, Rebhun RB, Hartigan-O'Connor DJ, Méndez-Lagares G, Tarantal AF, Isseroff RR, Griffith TS, Schalper KA, Merleev A, Saha A, Maverakis E, Kelly K, Aljumaily R, Ibrahimi S, Mukherjee S, Machiorlatti M, Vesely SK, Longo DL, Blazar BR, Canter RJ, Murphy WJ, Monjazeb AM. Paradoxical effects of obesity on T cell function during tumor progression and PD-1 checkpoint blockade. *Nat Med*. 2019 Jan;25(1):141-151. doi: 10.1038/s41591-018-0221-5. Epub 2018 Nov 12. PMID: 30420753; PMCID: PMC6324991.
27. McQuade JL, Hammers H, Furberg H, Engert A, André T, Blumenschein G Jr, Tannir N, Baron A, Larkin J, El-Khoueiry A, Carbone DP, Thomas JM,

Hennicken D, Coffey M, Motzer RJ. Association of Body Mass Index With the Safety Profile of Nivolumab With or Without Ipilimumab. *JAMA Oncol.* 2023 Jan 1;9(1):102-111. doi: 10.1001/jamaoncol.2022.5409. PMID: 36480191; PMCID: PMC9857666.

28. Eun Y, Kim IY, Sun JM, Lee J, Cha HS, Koh EM, Kim H, Lee J. Risk factors for immune-related adverse events associated with anti-PD-1 pembrolizumab. *Sci Rep.* 2019 Oct 1;9(1):14039. doi: 10.1038/s41598-019-50574-6. PMID: 31575933; PMCID: PMC6773778.

29. Rogado J, Romero-Laorden N, Sanchez-Torres JM, Ramos-Levi AM, Pacheco-Barcia V, Ballesteros AI, Arranz R, Lorenzo A, Gullon P, Garrido A, Serra López-Matencio JM, Donnay O, Adrados M, Costas P, Aspa J, Alfranca A, Mondejar R, Colomer R. Effect of excess weight and immune-related adverse events on the efficacy of cancer immunotherapy with anti-PD-1 antibodies. *Oncoimmunology.* 2020 Apr 16;9(1):1751548. doi: 10.1080/2162402X.2020.1751548. PMID: 32363123; PMCID: PMC7185216.

## **Ringraziamenti**

L'Università di Palermo mi ha consentito in questi anni di entrare in contatto con professionisti innamorati della professione scientifica e della propria città, per le quali spendono la loro intera vita, lavorativa e affettiva. Da loro ho appreso l'importanza della costanza nel perseguire i propri obiettivi e dello spirito di amicizia tra colleghi, che consentono di superare qualsiasi difficoltà strutturale e organizzativa.

Il mio percorso di Dottorato è stato arricchito da esperienze di ricerca e cliniche variegate. La mia attività di ricerca è stata sostenuta dalla Prof.ssa Viviana Bazan, del Prof. Giuseppe Badalamenti e dal Prof. Antonio Galvano. Di grande stimolo scientifico è stato lo scambio con la Professoressa Lorena Incorvaia, il Prof. Cirino Botta, il Dott. Ciro Celsa, il Dott. Roberto Cannella e della Dott.ssa Anna Maria Corsale.

Degni di nota lo svolgimento dell'assistenza presso la UO di Oncologia medica del Policlinico "Paolo Giaccone" diretta dal Prof. Antonio Russo, la partecipazione alle riunioni multidisciplinari tra i membri del progetto PSN Rete Sicilia per la gestione clinica dei tumori primitivi del fegato sotto la supervisione del Prof. Vito Di Marco, lo svolgimento dell'assistenza la frequenza dell'UO della Terapia del dolore e cure di supporto del Dipartimento Oncologico della Clinica La Maddalena diretta dal Prof. Sebastiano Mercadante e lo svolgimento della mia attuale attività assistenziale presso l'UOC Oncologia medica ARNAS Civico Di Cristina Benfratelli, diretta dal Dott. Livio Blasi.

Ritengo che il paziente con diagnosi oncologica possa avere la possibilità a Palermo di soddisfare le sue necessità grazie al supporto delle strutture sopracitate che rappresentano luoghi di eccellenza dove numerosi professionisti, medici e paramedici, si spendono ogni giorno con dedizione.

Il mio desiderio, mosso dalla mia esperienza, è di vedere convogliare tutte queste professionalità in un medesimo percorso di eccellenza, per facilitare la collaborazione tra tutti i servizi che la città di Palermo già dispone.

Fiera del percorso finora svolto, spero che il mio contributo possa essere di stimolo per nuovi specialisti nel settore, di conforto per i pazienti e di gioia per la mia famiglia che mi supporta con grande sacrificio.

Come è impossibile scegliere se si ama più un figlio rispetto un altro, così ogni uomo e donna non dovrebbe scegliere se spendersi di più per la propria famiglia o per la propria professione.

Ogni affetto vissuto e ogni impegno assunto è parte di sé, in eguale misura.

Senza paura e con coraggio, invito a portare avanti con generosità tutti i progetti di vita, consapevole che la vita consumata per Amore, non si divide ma si moltiplica.