



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO
Facoltà di Medicina e Chirurgia

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA
DELLE MALATTIE DEL FEGATO
XXII CICLO
SSD/MED09
(Coordinatore: *Prof. Giuseppe Montalto*)

***Titolo:* Trapianto di fegato per epatocarcinoma (HCC): integrazione di criteri clinici e radiologici con indicatori biologici per l'identificazione di pazienti ad alto rischio di progressione di malattia, drop-out dalla lista e ricorrenza post-trapianto. Elaborazione di modelli prognostici per l'ottimizzazione dei criteri di allocazione degli organi nei pazienti con HCC candidati al trapianto.**

Dottorando:

Dott. Ioannis Petridis

Tutor:

Ch.mo Prof. Giuseppe Montalto

Ch.mo Prof. Giovanni Vizzini

ANNO ACCADEMICO 2008/2010

Introduzione

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è una delle 5 cause più frequenti di tumore nel mondo, con una frequenza che è in continuo incremento nei paesi occidentali (1). Il trapianto di fegato (LTx) rappresenta oggi il migliore trattamento per i pazienti con HCC su cirrosi epatica (2) grazie alla sua capacità di rimuovere contemporaneamente sia l'intero tumore sia il sottostante fegato cirrotico, che rappresenta una vera e propria condizione pre-cancerosa.

Le prime esperienze sul trapianto di fegato per HCC in giro per il mondo mostrarono risultati decisamente deludenti. Le prime serie di Starzl, negli Stati Uniti, mostrarono sopravvivenze non superiori al 40%, con elevati tassi di recidiva nel post trapianto (3,4). Calne, in Inghilterra, ottenne solo un 6% di sopravvivenza oltre i 5 anni nei 50 pazienti sottoposti a trapianto per HCC (5). In Germania, allo stesso modo, Pichlmayr presentò il 20.4% di sopravvivenza a 5 anni su 52 pazienti trapiantati per tumore epatico (6). Nel primo report dello European Liver Transplant Registry (ELTR) l'HCC mostrò i peggiori risultati tra le varie cause di trapianto, con il 30.8% di sopravvivenza a 2 anni (7).

Tali dati hanno spinto molti centri a non trapiantare più i pazienti neoplastici, o a selezionarli in base all'estensione della loro patologia. Tuttavia, non esisteva un criterio di selezione per l'HCC universalmente riconosciuto.

Nel 1996, Mazzaferro et al. proposero i cosiddetti criteri di Milano (Milan Criteria, MC), che si basano sui parametri morfologici del tumore (lesione singola di dimensioni ≤ 5 cm o fino a 3 lesioni ciascuna con dimensioni ≤ 3 cm, in assenza di metastasi a distanza e di

infiltrazione macrovascolare) (2). Il loro studio condotto su 48 pazienti affetti da HCC non resecabili su cirrosi, sottoposti a trapianto epatico da donatore cadavere, ha evidenziato una mortalità totale del 17%. La recidiva tumorale si osservò solo nell'8%. I 35 pazienti che rientravano entro i MC mostrarono sopravvivenze globali e libere da malattia a quattro anni rispettivamente dell'85% e del 92%, mentre i 13 pazienti oltre i criteri (27% del totale), mostrarono sopravvivenze rispettivamente del 50% e del 59%. Grazie a questi risultati incoraggianti, numerosi centri incominciarono ad adottare i criteri di Milano per selezionare i candidati al trapianto, e ad oggi essi, dopo essere stati validati in tutto il mondo, vengono utilizzati da numerosissimi centri trapiantologici, fornendo tassi di recidiva di HCC che si attestano attorno al 10% e sopravvivenze globali a cinque anni del 70-90%, valori sovrapponibili a quelli per trapianto di fegato per patologie non tumorali (8,9). Oggi, inoltre, i criteri di Milano sono stati adottati come strumento per determinare la priorità al trapianto nel sistema di allocazione di organi statunitense, l'UNOS (Union Network Organ Sharing) (10), ed inseriti all'interno di sistemi di stadiazione o logaritmi terapeutici come il TNM (Tumor Node Metastasis) (11) ed il Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) (12).

Tuttavia l'utilizzo dei criteri di Milano non può eliminare completamente il rischio di ricorrenza dell'HCC (13), mentre il numero crescente dei pazienti cirrotici con HCC che necessitano di un trapianto, ha spinto molti centri ad espandere i classici criteri di Milano, alcuni con risultati accettabili (14).

Inoltre, nonostante i risultati eccellenti, i criteri di Milano presentavano anche un importante problema di base: essi determinano una selezione molto severa dei pazienti,

escludendo molti di essi dalla possibilità di usufruire di una terapia potenzialmente curativa come il trapianto epatico.

In un'analisi effettuata nel triennio 1996-1998 sulla popolazione statunitense, El-Serag et al. mostrarono come solo il 12% dei pazienti con HCC venissero trattati con intento curativo (trapianto o resezione), con sopravvivenze a tre anni superiori al 50%, mentre tutti gli altri erano destinati a trattamenti palliativi o a nessun trattamento, con sopravvivenze a tre anni inferiori al 10% (15). Oltre al suddetto rischio di non essere ritenuti idonei per il trapianto, anche i pazienti inseriti in lista d'attesa nei centri che adottano la politica di allocazione d'organo basata sui MC corrono il rischio di non poter usufruire di questa terapia: questo perché, durante l'attesa per il trapianto, il tumore può aumentare di dimensioni e superare i criteri, e quindi il paziente viene escluso dalla lista (drop-out).

Nel 1999 Llovet et al., del gruppo di Barcellona, evidenziarono questo problema (16): nel loro lavoro essi compararono 77 pazienti sottoposti a resezione epatica con 87 pazienti trapiantati tra il 1989 ed il 1997, mostrando sopravvivenze intention-to-treat a 5 anni rispettivamente del 51% e del 69%. Valutando tuttavia i fattori di rischio nei pazienti resecati, gli autori osservarono come pazienti ben selezionati per la chirurgia resettiva (bassi livelli di bilirubina, assenza di ipertensione portale) presentassero una sopravvivenza a 5 anni del 74%. Valutando poi le sopravvivenze a 2 anni dei due gruppi di trapiantati nel periodo 1989-1995 (no MC, 0 drop-out in lista) e nel periodo 1996-1997 (utilizzo dei MC, 8 drop-out in lista), le sopravvivenze risultarono essere l'84% ed il 54% rispettivamente ($p < 0.003$). Quindi, paradossalmente, i pazienti trapiantati con i MC mostrarono sopravvivenze intent-to-treat peggiori dei pazienti resecati! Il motivo di

questo apparente paradosso sono chiaramente da ricercare nella carenza di organi da trapiantare e quindi nei lunghi tempi di attesa che i pazienti hanno in lista, fatto che determina il loro drop-out.

Per risolvere tale problema, si percorrono oggi tre diverse strategie: 1) l'utilizzo di donatori viventi o di donatori cadaverici non-standard (ad esempio a cuore non battente, cosiddetti "non-heart beating donors"); 2) l'uso di terapie che facciano da ponte al trapianto (bridge therapy), come la resezione epatica o terapie locoregionali (Termoablazione e la Chermioembolizzazione, terapie che quando il paziente supera i MC, vengono dette di downstaging, perché riportano il paziente entro i criteri di trapiantabilità); 3) allargamento dei criteri con utilizzo di politiche meno conservative.

Il razionale di questo ultimo punto è da ricercare nel fatto che i criteri di Milano siano stati concepiti per prevedere buoni risultati nei pazienti che soddisfano i criteri stessi, ma non per predire prognosi sfavorevoli nei pazienti che li superano (17). In altri termini, esiste una quota di pazienti fuori dai classici criteri di Milano che potrebbe comunque ottenere risultati accettabili in termini di sopravvivenza dopo trapianto di fegato tramite l'utilizzo di politiche più liberali.

I primi a proporre criteri allargati furono Yao et al., dell'Università della California, San Francisco (UCSF) (18). I criteri UCSF si basano anch'essi unicamente su parametri morfologici (lesione singola ≤ 6.5 cm, o al massimo 3 noduli con il maggiore ≤ 4.5 cm ed il diametro tumorale totale ≤ 8 cm, in assenza di metastasi e di invasione macrovascolare). Nel loro lavoro, Yao e coll. analizzarono retrospettivamente 70 pazienti sottoposti a trapianto di fegato per HCC in un periodo di 12 anni. I pazienti che rispettavano i nuovi criteri (60 pazienti, 86%) presentarono sopravvivenze globali ad 1 e

5 anni pari al 90% ed al 75.2%, rispettivamente, mentre i pazienti fuori dai criteri UCSF (10 pazienti, 14%) mostrarono il 50% di sopravvivenza ad 1 anno ($p < 0.0005$). Tali risultati suggerirono come un modesto incremento dei criteri non determinasse un'importante decremento nelle sopravvivenze.

Tuttavia, varie critiche vennero mosse a questo lavoro, prima delle quali fu quello di aver valutato lo staging tumorale in base ai dati anatomico-patologici e non a quelli radiologici. Nel 2007 Yao pubblicò un nuovo lavoro nel quale confermava la validità del suo modello anche se applicato a parametri pre-operatori (19). Tuttavia, i criteri UCSF non vengono ancora riconosciuti universalmente da tutti i centri: in vari studi europei e statunitensi sono emersi alcuni limiti relativi a questi criteri (20,21). Ad esempio, in un ampio studio multicentrico condotto su 479 pazienti candidati a trapianto epatico per HCC in Francia dal 1985 al 1998, Decaens e coll. valutarono il ruolo dei criteri UCSF sia in base alle caratteristiche tumorali pre-trapianto che a quelle anatomico-patologiche post-trapianto. In base ai risultati ottenuti, i pazienti oltre i criteri di Milano ma entro i criteri UCSF (cioè quelli che effettivamente hanno beneficiato dell'allargamento dei criteri) risultarono essere solo il 10% in base ai dati radiologici, e l'8% in accordo con l'analisi dei fegati espuntati. Inoltre, valutando le sopravvivenze "intent-to-treat" in base ai dati pre-trapianto, i pazienti oltre i MC ma entro i criteri UCSF presentarono sopravvivenze a 5 anni pari al $45.6 \pm 7.8\%$, contro il $60.1 \pm 3.0\%$ dei pazienti entro i MC, evidenziando quindi sopravvivenze inferiori al 50% (22).

Partendo dai risultati ancora decisamente discordanti relativi ai criteri UCSF, vari Autori hanno proposto nuovi criteri, con l'intento di aumentare l'effettiva quota di pazienti trapiantabili. Molti di questi criteri si basano unicamente su una combinazione di dati

morfologici, come i MC ed i criteri UCSF (dimensione tumorale, numero di lesioni, volume tumorale) (come i criteri di Kyoto, i criteri di Valencia etc) (23,24,25).

Oltre agli aspetti morfologici, anche gli elementi di tipo bio-molecolare, come l'invasione vascolare, l'alfafetoproteina (a-FP) ed il grading tumorale, ricoprono un ruolo molto importante come indici di aggressività biologica dell'HCC e come parametri predittivi di recidiva tumorale e di selezione dei pazienti per il trapianto. L'invasione microvascolare in molti studi è risultata essere il più importante fattore di rischio per recidiva tumorale (26,27), con un rischio di ricomparsa di HCC dopo trapianto aumentato fino a 15 volte (28). Inoltre, nonostante dopo l'introduzione dei MC il numero e le dimensioni dei tumori si siano ridotti, i tassi di invasione microvascolare sono rimasti stabili (21-24%) (29). Già nel 2000 Marsh, del gruppo di Pittsburgh, propose di modificare il TNM dell'HCC non solo in funzione delle dimensioni e della distribuzione, ma anche della presenza di invasione microvascolare (30). Purtroppo il limite di questo parametro è che esso viene diagnosticato solo all'esame anatomopatologico e che quindi non può essere determinato preoperatoriamente; di conseguenza, il suo impiego nei criteri di selezione al trapianto non è praticabile. L'a-FP rappresenta uno dei migliori parametri predittivi di invasione microvascolare utilizzati e ne rappresenta dunque un surrogato (31). In un ampio studio condotto comparando 15.906 pazienti trapiantati per HCC tra il 1997 ed il 2002 con 19.404 pazienti sottoposti a trapianto tra il 2002 ed il 2007 negli Stati Uniti (dati UNOS), l'a-FP sierica > 455 ng/mL risultò essere, assieme al MELD score > 20, il più importante carattere predittivo di mortalità dopo trapianto, con un rischio aumentato di 2.15 volte di decesso nei pazienti con questi valori (32). L'AFP si correla inoltre con il grado di aggressività dell'HCC (33), ed il dosaggio dell'a-FP mRNA è stato proposto come

marker di disseminazione ematica dell'HCC, mostrando una correlazione evidente con l'invasione vascolare e con la scarsa differenziazione tumorale (34,35). Per questo motivo, alcuni autori hanno incorporato l'a-FP all'interno dei loro criteri di selezione come per esempio nei criteri di Seoul (36).

Il grading tumorale rappresenta un altro parametro di estrema importanza: Kirimlioglu et al. (37) hanno evidenziato come, nonostante le piccole dimensioni, fino al 15% degli HCC sviluppasse aggressività biologica dopo LT. Klintmalm, analizzando 422 pazienti sottoposti a LT, mostrò come, in tumori ben differenziati, le dimensioni tumorali e l'invasione vascolare non peggiorassero le sopravvivenze o i tassi di recidiva, mentre il grading risultò essere l'unico fattore prognostico ad emergere dall'analisi statistica (38).

Nel 2004, Cillo e coll., del gruppo di Padova, presentarono uno studio nel quale venne messo in evidenza che parametri come il TNM ed i MC fossero meno abili nel predire la sopravvivenza nei pazienti ed i tassi di recidiva dell'HCC rispetto al grading tumorale: 33 pazienti con HCC diagnosticati preoperatoriamente con grading bene o moderatamente differenziato vennero comparati con 15 pazienti con diagnosi incidentale di HCC. Nonostante il 38% dei pazienti fosse fuori dai MC, a 5 anni la sopravvivenza globale fu del 75%, mentre quella libera malattia fu del 92%, con sole 3 recidive (6%) (39). Nel 2008, Zheng e coll., del gruppo di Hangzhou, proposero un nuovo modello, nel quale combinarono aspetti morfologici, AFP e grading: diametro tumorale totale ≤ 8 cm o, se > 8 cm, grading bene o moderatamente differenziato + AFP ≤ 400 ng/ml (40).

In seguito, il gruppo di Mazzaferro messe insieme tutti questi criteri e costruì un sistema che ha nominato "metropolitana", di cui il costo del biglietto (che ha chiamato Metroticket) rappresentava il rischio di recidiva dell'HCC ed aumentava con

l'allontanarsi dai MC. In altre parole, più lungo il viaggio dai limiti convenzionali e maggiore il prezzo da pagare del biglietto (41). Questo spinse verso la creazione di un progetto che, avviatosi nel 2006, portò alla raccolta multicentrica di dati riguardanti pazienti fuori dai MC: il risultato di questo lavoro fu la nascita dei criteri up-to-seven.

Nel 2009 Mazzaferro e coll. presentarono i risultati di questo studio riguardante 1112 pazienti trapiantati in 36 centri per HCC oltre i MC. La sopravvivenza dell'intera popolazione a 5 anni fu del 53.6%: tuttavia, in una popolazione selezionata di 283 pazienti che superavano i MC ma che però, in assenza di invasione microvascolare, rispettavano i cosiddetti criteri up-to-seven (HCC con sette come somma del diametro del tumore più grande + il numero delle lesioni), la sopravvivenza globale a 5 anni risultò pari al 71.2%, risultato sovrapponibile a quello ottenibile con pazienti entro i MC (42).

Tuttavia occorre ricordare che il parametro prognostico fondamentale dell'invasione microvascolare, può essere ottenuto solo a trapianto effettuato e quindi i cosiddetti criteri up-to-seven sembrano essere piuttosto illusivi e ben poco pratici (43).

Scopo dello studio

Con il presente studio, abbiamo voluto analizzare l'outcome sia in termini di ricorrenza del tumore che di sopravvivenza, di tutti i casi di trapianto di fegato in pazienti con HCC eseguiti nel nostro centro nonchè di studiare tutti i fattori di rischio potenzialmente correlati alla ricorrenza di HCC nel post-trapianto.

Materiali e metodi

Nel periodo tra Luglio 1999 e Dicembre 2010 un totale di 565 trapianti di fegato in pazienti adulti sono stati eseguiti, di cui 475 da donatore cadavere (CLTx) e 90 da donatore vivente (LRLTx). Di questi 565, 247 pazienti sono stati sottoposti a trapianto di fegato per HCC e cioè il 43.7% (215 da CKTx e 32 da donatore vivente).

318 sono stati i trapianti per altre cause (cirrosi epatica HCV, HBV, alcol, cirrosi biliare primitiva, epatite fulminante da farmaci, miste e altri) di cui 260 da CLTx e 58 da LRLTx.

Tutti i dati sono stati elaborati in maniera prospettica e retrospettiva utilizzando il nostro database elettronico.

La diagnosi di HCC è stata formulata nel periodo prima dell'immissione in lista per LTx seguendo i criteri della società Americana per lo studio del fegato (American Association for the study of the Liver Diseases, AASLD) (44,45). Più precisamente, noduli con diametro superiore a 2 cm venivano considerati come noduli di HCC solamente dopo una tecnica di immagine tra TC, RM o ecografia e con dimostrazione di un pattern ipervascolare in fase arteriosa con wash-out in fase venosa. Per i noduli con un diametro compreso tra 1 e 2 cm sono state utilizzate 2 metodiche di imaging con la dimostrazione di un pattern ipervascolare in fase arteriosa con wash-out in fase venosa. Per i noduli con diametro inferiore a 1 cm è stata eseguita biopsia e qualora la biopsia non fosse stata diagnostica o non eseguibile, si è deciso di proseguire con il follow-up radiologico.

A tutti i pazienti è stato assegnato un MELD score (<http://www.mayoclinic.org/meldmayomodel.6.html>). Questo score è stato inoltre applicato a tutti i pazienti anche a coloro che sono stati trapiantati prima del 2002, anno in cui è stato ufficialmente applicato il MELD score nel nostro programma trapianti.

Dal momento dell'inserimento in lista fino al giorno del trapianto, 183 pazienti sono stati sottoposti a procedure di trattamento locoregionale (TACE, TAE, RFTA) da sole o in combinazione. La decisione sul tipo di trattamento veniva presa su ogni singolo paziente solamente dopo una valutazione multidisciplinare ed a seconda dello staging, della localizzazione del tumore e della funzionalità epatica residua.

Tutti i pazienti dello studio al momento del loro inserimento in lista hanno avuto la diagnosi radiologica di HCC rispettando i criteri di Milano. 12 pazienti con criteri di HCC inizialmente fuori Milano sono stati inseriti in lista solamente dopo essere stati

trattati riuscendo ad ottenere un down-staging dell'HCC rientrando così nei criteri di Milano e dopo aver mantenuto i criteri per almeno 6 mesi.

Dal momento dell'inserimento in lista fino al momento del trapianto tutti i pazienti sono stati sottoposti a controlli clinico-laboratoristici ogni tre mesi (con esami ematochimici e dosaggio di a-FP) e strumentali ogni 6 mesi tramite TC addominale con m.d.c. e/o RM con m.d.c. epatospecifico.

Dopo il trapianto tutti i pazienti sono stati controllati utilizzando un protocollo di follow-up che prevedeva il dosaggio di a-FP, Rx torace e TC addome con m.d.c. e/o RM con m.d.c. epatospecifico ogni 6 mesi.

In caso di accertata o sospetta ricorrenza di HCC intraepatico e/o extraepatico altre indagini venivano eseguite come: RM epatica, TC torace, scintigrafia ossea, biopsia ecoguidata o Tomografia ad emissione di positroni (PET).

Analisi statistica

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati i test chi-square ed il test di Fisher. Inoltre, il metodo di Kaplan-Meier è stato usato per l'analisi dei fattori prognostici per la sopravvivenza, mentre per la differenze tra i vari gruppi è stata utilizzato il test long-rank. Come periodo di sopravvivenza totale viene considerato il periodo che intercorre dal momento del trapianto fino all'ultima visita di follow-up o fino al decesso. Come sopravvivenza priva di tumore è stato considerato il periodo che va dal giorno del trapianto fino al giorno della diagnosi della ricorrenza del tumore. Tutte le variabili che hanno raggiunto una significatività statistica nell'analisi univariata sono state poi inserite nell'analisi multivariata. Valori di p inferiore a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il sistema informatico SPSS.

Risultati

Le caratteristiche della popolazione dei pazienti vengono riportati nella Tabella 1.

205 erano maschi (83%) e 42 erano femmine (17%). L'età media era di 59 anni (range di età: 18-68). Nella maggior parte dei casi la cirrosi era secondaria ad infezione cronica da HCV (65%) con un MELD score clinico medio di 17.

183 persone (74%) sono state sottoposte a procedure di trattamento locoregionale (chemioembolizzazione, embolizzazione, radiofrequenza) mentre erano in lista di attesa (60% TACE, 35 % TAE, 5% RF).

Il 77.3% dei pazienti aveva una diagnosi radiologica di HCC all'interno dei criteri di Milano nel momento dell'isnimento in lista mentre all'esame istologico su fegato nativo tale percentuale scendeva al 73.28% dei pazienti.

Inoltre, sempre a livello istologico, il 30% dei pazienti presentava un tumore moderatamente differenziato. Invasione microvascolare è stata riscontrata nel 38% dei casi mentre l'invasione macrovascolare è stato riscontrata solamente in 4 casi.

Nel periodo dopo il trapianto il 96% dei pazienti hanno iniziato un regime di terapia immunosopresiva che si basava sull'utilizzo di un inibitore delle calcineurine (Tacrolimus). Solamente in pochi casi è stato reso necessario modificare la terapia immunosopressiva utilizzando Ciclosporina in 8 pazienti od un inibitore delle rapamicina-kinasi (m-TOR Everolimus) in monoterapia. Le cause responsabili per la modifica della terapia immunosopressiva erano la comparsa di effetti collaterali come insufficienza renale, complicanze neurologiche o l'intolleranza verso il Tacrolimus.

Nel 18% dei casi è stato utilizzato un secondo farmaco immunosoppressivo in associazione, il mofetil micofenolato.

Il range terapeutico da mantenere nel primo mese dopo il trapianto era compreso tra 8-12 mcg/l, dal secondo al terzo tra 8-10 mcg/l e nei mesi successivi era tra 3-8 mcg/l.

Il tempo medio di follow-up era di 50 mesi (range 1-128). La percentuale di mortalità di tutti i trapiantati (565 pazienti) era del 21.2% (120 casi), mentre nel gruppo dei trapiantati per non-HCC la mortalità era del 25% (71 pazienti nel gruppo CLTx e 9 nel gruppo LRLTx).

Per quanto riguarda il gruppo dei pazienti trapiantati per HCC, sono stati registrati 40 decessi (15.8%).

La recidiva di HCC era la causa della morte in 26 pazienti (65%). Altre cause erano la ricorrenza HCV 4 casi, le infezioni sistemiche con insufficienza multiorgano (MOF) in 6 casi, 2 casi di infezioni generalizzate da HHV-8 in ed infine 2 casi di ictus.

La percentuale di sopravvivenza nei pazienti trapiantati per HCC era di 81% e di 79% a 3 e a 5 anni rispettivamente (Grafico 1).

1 paziente ha avuto la recidiva di HCC entro i primi 3 mesi, 10 pazienti hanno avuto la recidiva di HCC entro 1 anno dal trapianto, 11 pazienti entro 24 mesi mentre 4 pazienti entro 3 anni (Grafico 2).

In 5 casi (19%) la ricorrenza si è verificata a livello epatico, in 5 (19%) a livello surrenalico, in 4 casi (14.8%) a livello polmonare, in 3 casi (11%) a livello linfonodale e 2 livelli osseo mentre in 7 casi il coinvolgimento era a carico di più apparati. Tutti i pazienti sono stati successivamente sottoposti a trattamento chemioterapico con utilizzo di diversi protocolli terapeutici. Alcuni di loro sono stati trattati con Sorafenib.

La loro sopravvivenza media era di 80 e 70 % a 3 e 5 anni rispettivamente.

Successivamente sono stati analizzati tutti i dati presi dal nostro data base in modo tale da poter individuare eventuali fattori prognostici di ricorrenza di malattia. Sono stati analizzati fattori come il sesso, età, livello plasmatico di a-FP (è stato utilizzato come cut-off il valore di 100 ng/mL), infezioni virali, la presenza di criteri di Milano al momento del trapianto, trattamenti locoregionali pre-OLTx, la presenza di criteri di Milano sul fegato nativo, la presenza di invasione angiolinfatica microvascolare e macrovascolare nonché il tipo di immunosoppressione.

All'analisi univariata (Tabella 2), livelli elevati di a-FP, trattamenti prima del trapianto, l'assenza dei criteri di Milano all'istologia sul fegato nativo e l'invasione microvascolare erano tutti fattori predittivi di ricorrenza di HCC nel post trapianto. All'analisi multivariata (Tabella 3), elevati livelli di a-FP, trattamenti prima del trapianto e l'invasione microvascolare erano fattori predittivi di ricorrenza.

Tutti questi fattori sono stati presi ed analizzati in modo tale da scoprire quali di questi erano correlati ad alto rischio di recidiva ad un anno dal trapianto. Abbiamo visto che solamente i valori di a-FP elevati insieme con i trattamenti prima del trapianto erano correlati con alto rischio di recidiva a 1 anno.

La sopravvivenza dei pazienti trapiantati per cause non HCC a 3 ed a 5 anni era di 90 e 83% rispettivamente (Grafico 1).

Per quanto riguarda i pazienti che inizialmente erano fuori dai criteri di Milano e quindi sono stati trattati con procedure di trattamento locoregionale (procedure di downstaging) abbiamo visto che la sopravvivenza a 3 ed a 5 anni era di 95% e 95% rispettivamente nel gruppo di pazienti che all'istologia sul fegato nativo al momento del trapianto, dato

questo statisticamente significativo rispetto ad una sopravvivenza del 70% e 60% rispettivamente a 3 e 5 anni del gruppo che al momento del trapianto non aveva i criteri istologici dei criteri di Milano.

Se andiamo ad analizzare i dati sulla sopravvivenza nel gruppo dei pazienti con HCC con i criteri di Milano nel pretrapianto e che sono stati sottoposti a trattamenti locoregionali e confrontarli con il gruppo dei pazienti con HCC con i criteri di Milano ma senza trattamenti locoregionale prima del trapianto, vediamo che non c'è una differenza statisticamente significativa.

Discussione

L'impatto che alcuni fattori di rischio possano avere sulla ricorrenza di HCC, come i criteri Milano radiologici, l'istologia sul fegato nativo, i livelli di a-FP nel pretrapianto, l'invasione microvascolare è ancora un argomento in fase di studio. Alcuni lavori hanno già dimostrato il ruolo prognostico negativo del tipo di immunosoppressione e dell'istologia del fegato nativo al momento del trapianto (42, 46).

Con il presente studio abbiamo confermato il dato già noto di discrepanza tra la radiologia e l'istologia nella stadiazione del HCC e nella definizione dei criteri di Milano, dove nella maggior parte dei casi di discrepanza si è verificato una sottostadiazione del HCC.

Il miglioramento delle tecniche radiologiche che si verificato negli ultimi anni ha aiutato a ridurre sempre di più tale livello di discrepanza, anche se sarà sempre difficile azzerare tale differenza.

L'analisi multivariata ha evidenziato come fattori di rischio di recidiva di HCC nel post trapianto livelli elevati di a-FP, la presenza di trattamenti locoregionali nel pretrapianto, l'assenza dei criteri istologici dei criteri di Milano all'istologia, e la presenza di invasione microvascolare.

L'analisi multivariata eseguita prendendo in considerazione tutti i fattori precedentemente descritti, ha confermato il ruolo prognostico negativo dell'a-FP, della presenza dell'invasione microvascolare e dei criteri istologici ma non ha confermato

l'ipotesi che i trattamenti locoregionali nel pretrapianto possono influenzare negativamente sulla recidiva di HCC.

Bisogna specificare che i vari trattamenti locoregionali sono stati sempre effettuati allo scopo di limitare la progressione dell HCC e quindi aumentare la probabilita' di essere trapiantati mentre si è in lista. Questo è stato applicato sia nel gruppo dei pazienti che necessitavano di procedure di "down-staging" sia nei pazienti con HCC con i criteri di Milano ma con rischio di progressione e quindi di fuoriuscita dalla lista di attesa.

Quello che abbiamo osservato era che i trattamenti locoregionali, la dove vengono applicati, non sono correlati con una ridotto rischio di recidiva di HCC. Questo puo' essere in parte spiegato dall'aumentata invasivita' della neoplasia che si verifica nei casi in cui si determina una grossa necrosi tumorale come per esempio nei casi di HCC multifocale, come è stato dimostrato anche da altri lavori.

Le percentuali di sopravvivenza per HCC nel nostro centro sono simili a quelli degli altri centri nazionali ed internazionali ed a quelli che vengono riportati in letteratura. Per tale motivo la politica del nostro centro è quella di sottoporre comunque a trattamenti locoregionali tutti i pazienti che sono in lista di attesa per trapianto di fegato, senza dimenticare che i tempi di attesa per un trapianto di fegato possano essere per molti pazienti di molti mesi rischiando anche di fuoriuscire per progressione di malattia.

Per quando riguarda il tipo di immunoppressione nel post-trapianto, non è ancora chiaro quale tipo e quale schema di terapia possa avere un ruolo prognostico negativo o possa avere addirittura un ruolo protettivo come è stato proposto da alcuni autori. Nel nostro

lavoro i dati non sono conclusivi in quanto solamente una piccola percentuale di pazienti ha effettuato terapia con inibitori m-TOR (Sirolimus). È verosimile però che l'uso di Sirolimus possa avere un ruolo protettivo nei confronti della ricorrenza dell'HCC, soprattutto in quei casi in cui c'è alto rischio di recidiva.

Conclusioni

Con il presente lavoro abbiamo valutato i dati basati sull'esperienza di almeno 10 anni di trapianti per epatocarcinoma eseguiti nel nostro centro. Sono stati valutati diversi fattori di rischio come le dimensioni dell'HCC, l'istologia sul fegato nativo, il tipo di immunosoppressione, i trattamenti prima del trapianto e l'invasione microvascolare. Abbiamo mostrato come le percentuali di sopravvivenza sono assolutamente simili a quelli dei pazienti trapiantati per cause diverse da quelle dell'HCC.

Sembra che le caratteristiche biologiche del tumore come l'invasione microvascolare ed i livelli plasmatici di a-FP sono i fattori più rilevanti e sono quelli che sono correlati ad un alto rischio di recidiva nel post-trapianto.

Infine, non è ancora molto chiaro quale è il vero ruolo dei vari trattamenti di tipo locoregionali eseguiti nel pretrapianto ed il tipo di immunosoppressione nel post-trapianto e quale possa essere il loro ruolo nei confronti del rischio di recidiva. Ci sono alcune prime evidenze che mostrano un ruolo protettivo nei confronti degli m-TOR che però necessitano di ulteriori studi.

Dall'altra parte sembra che i trattamenti locoregionali nel periodo prima del trapianto siano correlati con un rischio di recidiva di HCC superiore se confrontati con quella delle persone trattate.

Inoltre, fattori come valori plasmatici di a-FP e come l'invasione microvascolare sono fattori prognostici negativi per la recidiva di HCC nel post-trapianto.

Per quando riguarda il livello dell' a-FP, anche se non ci chiare evidenze sul suo valore di cut-off, noi abbiamo utilizzato come valore cut-off il limite di 100 ng/mL.

TABELLA 1. Caratteristiche demografiche, cliniche e anatomopatologiche dei pazienti sottoposti a trapianto di fegato per tumore epatico nel periodo 1999-2010

Variabili	
Tipo di trapianto	OLTx 215 (87%) LRLTx 32 (13%)
Sesso	Maschi n=205 (83%) Femmine n=42 (17%)
Età media	59 (18-68 anni)
Infezione da virus	HCV + (n=160) HCV - (n=87)
MELD score clinico medio	17 (12-36)
Pazienti sottoposti a trattamenti locoregionali (TACE/TAE/RFTA)	183 (74%)
a-FP nel pretrapianto (ng/mL)	28 (6-6000)
MC prima di LTx	191 (77.3%)
MC all'istologia	181 (73.28%)
Invasione microvascolare	94 (38%)
Invasione macrovascolare	4 (1.6%)
Uso di m-TOR inibitori	3 (1.2%)

TABELLA 2. Analisi univariata di tutte le variabili correlate alla recidiva di HCC nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato

Variabili		Sopravvivenza a 3 anni	Sopravvivenza a 5 anni	p
Sesso	Maschi n=205	85%	80%	ns
	Femmine n=42	83%	81%	
Eta'	>60 anni (n=104)	88%	84%	ns
	<60 anni (n=143)	87%	82%	
a-FP	>50 ng/mL (n=56)	75%	70%	< 0.001
	<50 ng/mL (n=191)	92%	90%	
Infezioni virali	HCV + (n=160)	89%	80%	ns
	HCV - (n=87)	96%	92%	
Down-staging	Si (n=12)	82%	74%	ns
	No (n=235)	88%	85%	
Trattamenti prima del LT	Si (n=183)	84%	81%	0.05
	No (n=64)	95%	91%	
MC prima di LTx	Si (n=191)	91%	89%	ns
	No (n=56)	80%	76%	
MC all'istologia	Si (n=181)	94%	90%	<0.001
	No (n=66)	80%	76%	
Invasione microvascolare	Si (n=94)	74%	70%	<0.001
	No (n=153)	95%	92%	
Invasione macrovascolare	Si (n=4)	50%	50%	ns
	No (n=243)	88%	86%	
Imunosoppressione m-TOR	Si (n=3)	90%	86%	ns
	No (n=244)	86%	84%	

TABELLA 3. Analisi multivariata di tutte le variabili correlate alla recidiva di HCC nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato

Parametri	<i>p</i>
Invasione microvascolare	0.001
Trattamenti preLTx	0.05
MC all'istologia	0.5
a-FP	0.005

GRAFICO 1. Curve di sopravvivenza LTx per HCC

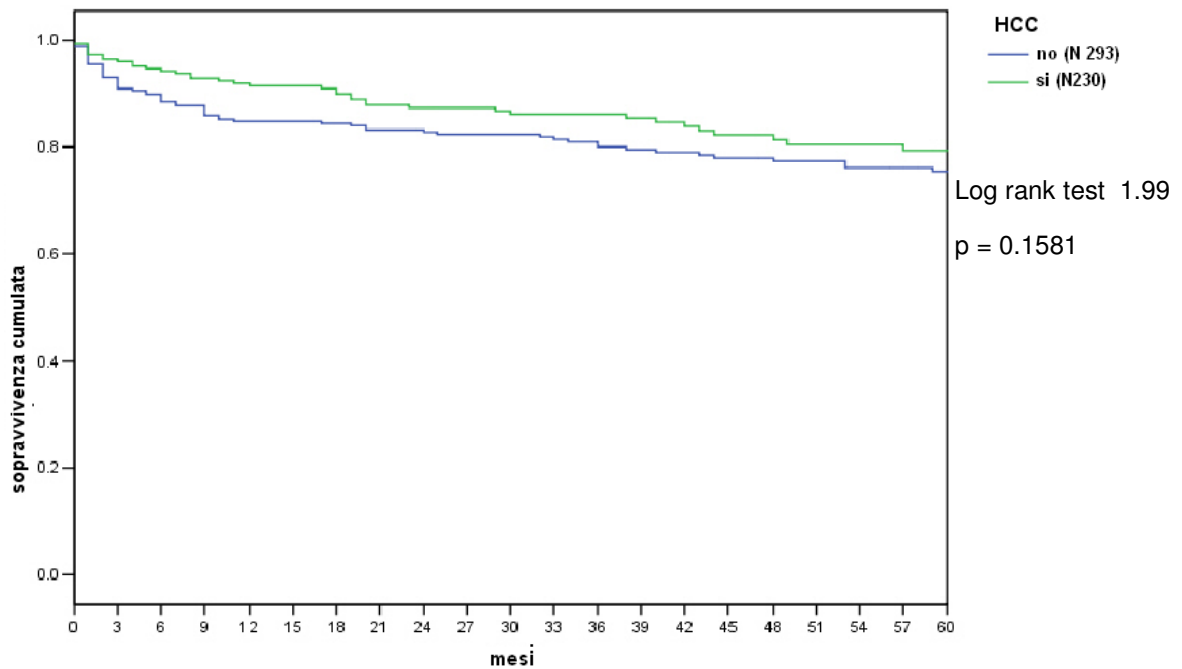


GRAFICO 2. Recidiva di HCC e tempo di ricorrenza

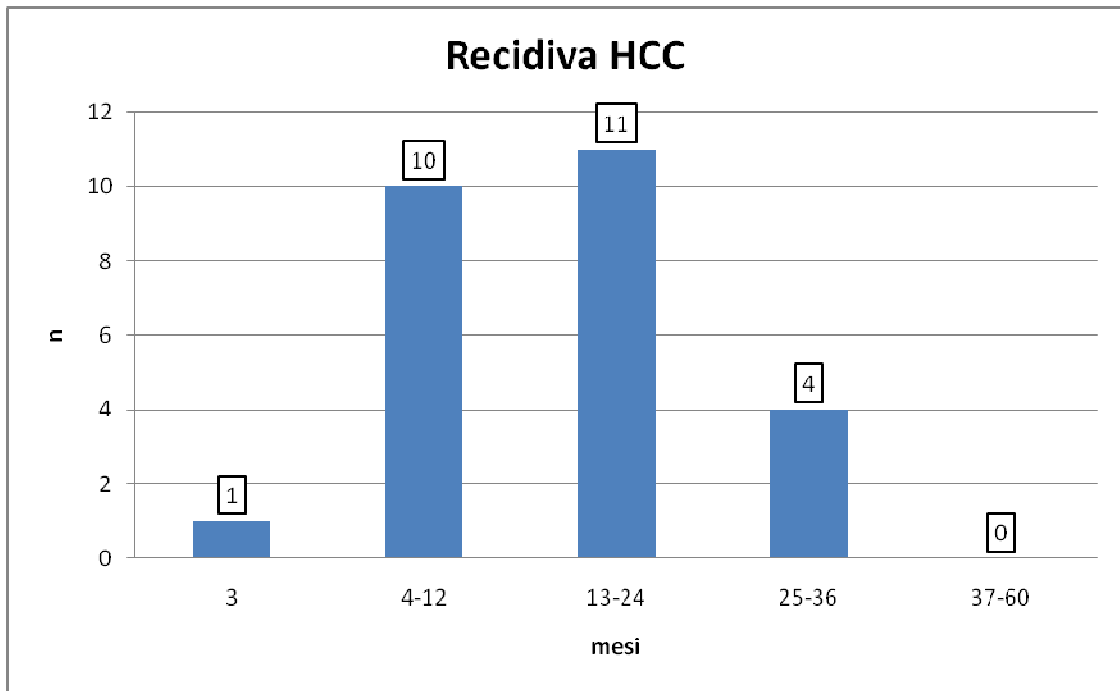


GRAFICO 3.

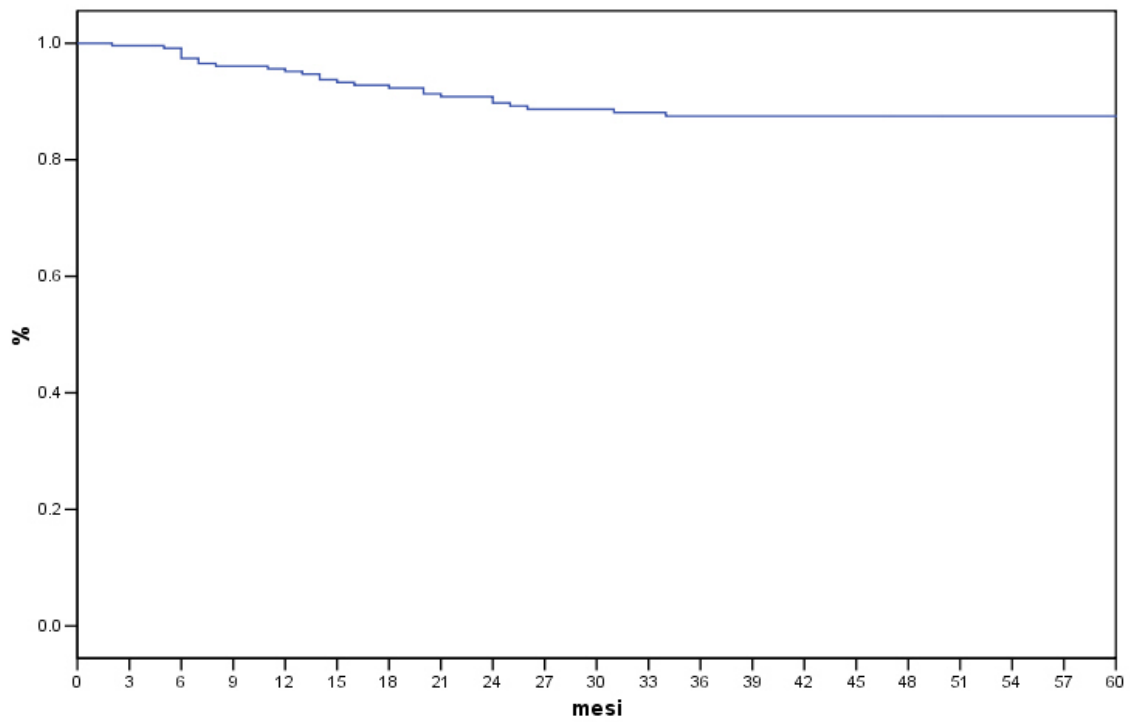
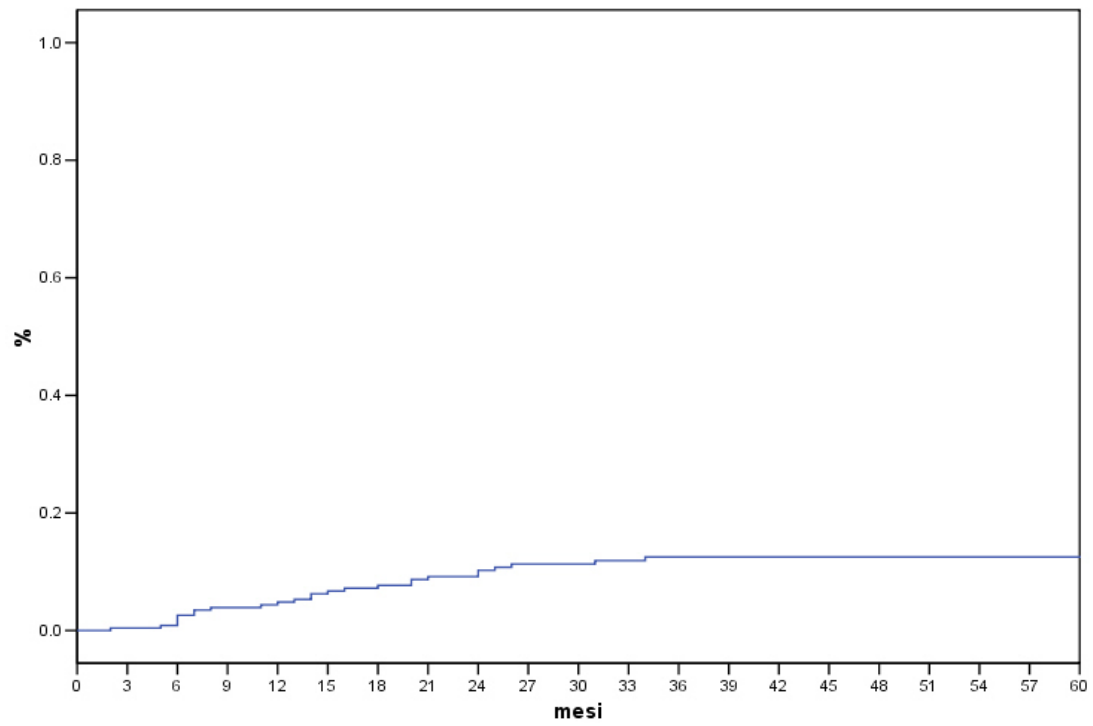


GRAFICO 4. Rischio di ricorrenza di HCC dopo LTx.



BIBLIOGRAFIA

1. H. B. El-Serag, J. A. Davilla, N. J. Petersen, and K. A. M Glynn, “The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update”, *Annals of Internal Medicine*, vol. 139, no. 10, pp. 817-823, 2003
2. V. Mazzaferro, E. Regalia, R. Doci et al., “Liver Transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis”, *New England Journal of Medicine*, vol. 334, no. 11, pp. 693-699, 1996.
3. Iwatsuki S, Gordon RD, Shaw BW Jr, Starzl TE. (1985). *Role of liver transplantation in cancer therapy.. Ann Surg* **202**: 401-407.
4. Starzl TE, et al. (1990). *Liver transplantation in the treatment of primary liver cancer.. Hepatogastroenterology* **37**: 188-93.
5. O’Grady JG, Polson RJ, Rolles K, Calne RY, et al. (1988). *Liver transplantation for malignant disease: results in 93 consecutive patients.. Ann Surg* **207**: 373-379.
6. Ringe B, Wittekind C, Bechstein WO, Bunzendahl H, et al. (1989). *The role of liver transplantation in hepatobiliary malignancy: a retrospective analysis of 95 patients with particular regard to tumor stage and recurrence.. Ann Surg* **209**: 88-98.
7. Bismuth H, Castaing D, Ericzon BG, Otte JB, et al. (1987). *Hepatic transplantation in Europe. First Report of the European Liver Transplant Registry.. Lancet.* **19**: 674-676.
8. Jonas S, Bechstein WO, Steinmuller T, Herrmann M, et al. (2001). *Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis.. Hepatology* **33**: 1080-1086.
9. Rossi M, Merli M, Lai Q, Gentili F, et al. (2007). *Outcome after liver transplantation in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma.. Transplantation Proceedings* **39**: 1895-1897.

10. Yoo HY, Patt CH, Geschwind JF, et al. (2003). *The outcome of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States between 1988 and 2001: 5-year survival has improved significantly with time.. J Clin Oncol* **2**: 4265-4267.
11. Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. (2002). *AJCC. Cancer staging handbook. TNM liver classification.. American Joint Committee (AJCC) on cancer staging manual. 6th edn. New York: Springer-Verlag.: 131-144.*
12. Llovet JM, Brú C, Bruix J. (1999). *Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification.. Semin Liver Dis* **19**: 329-338.
13. M. E. Schwartz, F. D'Amico, A. Vitale, S. Emre, U. Cillo, "Liver Transplantation for hepatocellular carcinoma: are the Milan criteria still valid?", *European Journal of Surgical Oncology*, vol. 34, no. 3, pp. 256-262, 2008
14. F. Y. Yao, L. Ferrel, N. M. Bass et al., "Liver Transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival", *Hepatology*, vol 33, no 6, pp. 1394-1403, 2001
15. El-Serag HB. (2004). *Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. =. Gastroenterology* **127**: S27-34.
16. Llovet JM, Fuster J, Bruix J. (1999). *Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. Hepatology* **30**: 1434-1440.
17. Mazzaferro V. (2007). *Results of Liver Transplantation: With or Without Milan Criteria?. Liver Transplantation* **13**: S44-S47.
18. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, et al. (2001). *Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival.. Hepatology* **33**: 1394-1403.
19. Yao FY, Xiao L, Bass NM, Kerlan R, et al. (2007). *Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: validation of the UCSF-expanded criteria based on preoperative imaging.. Am J Transplant* **7**: 2587-2596.
20. Leung JY, Zhu AX, Gordon FD, Pratt DS, Mithoefer A, et al. (2004). *Liver transplantation outcomes for early-stage hepatocellular carcinoma: results of a multicenter study.. Liver Transpl* **10**: 1343-54.

21. Fernández JA, Robles R, Marin C, Sánchez-Bueno F, et al. (2003). *Can we expand the indications for liver transplantation among hepatocellular carcinoma patients with increased tumor size?*. *Transplant Proc* **35**: 1818-20.
22. Decaens T, Roudot-Thoraval F, Hadni-Bresson S, Meyer C, et al. (2006). *Impact of UCSF criteria according to pre- and post-OLT tumor features: analysis of 479 patients listed for HCC with a short waiting time.*. *Liver Transpl* **12**: 1761-1769.
23. Takada Y, Ito T, Ueda M, et al. (2007). *Living donor liver transplantation for patients with HCC exceeding the Milan criteria: a proposal of expanded criteria.*. *Dig Dis* **25**: 299-302.
24. Ito T, Takada Y, Ueda M, et al. (2007). *Expansion of selection criteria for patients with hepatocellular carcinoma in living donor liver transplantation.*. *Liver Transpl* **13**: 1637-1644.
25. Silva M, Moya A, Berenguer M, et al. (2008). *Expanded criteria for liver transplantation in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma.*. *Liver Transpl* **14**: 1449-1460..
26. Zou WL, Zang YJ, Chen XG and Shen ZY. (2008). *Risk factors for fatal recurrence of hepatocellular carcinoma and their role in selecting candidates for liver transplantation.*. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **7**: 145-151.
27. Lai Q, Merli M, Ginanni Corradini G, Mennini G, et al. (2009). *Predictive Factors of Recurrence of Hepatocellular Carcinoma After Liver Transplantation: A Multivariate Analysis.*. *Transpl Proc* **41**: 1306-1309.
28. Durand F, Belghiti J. (2003). *Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: should we push the limits?*. *Liver Transpl* **9**: 697-699.
29. Onaca N, Davis GL, Jennings LW, Goldstein RM, et al. (2009). *Improved results of transplantation for hepatocellular carcinoma: a report from the international registry of hepatic tumors in liver transplantation.*. *Liver Transpl* **15**: 574-580.
30. Marsh JW, Dvorchik I, Bonham CA, Iwatsuki S. (2000). *Is the pathologic TNM staging system for patients with hepatoma predictive of outcome?*. *Cancer* **88**: 538-543.

31. Shah SA, Tan JC, McGilvray ID, Cattral MS, et al. (2006). *Accuracy of staging as a predictor for recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma..* Transplantation **81**: 1633-1639.
32. Ioannou GN, Perkins JD, and Carithers RL. (2008). *Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: impact of the MELD allocation system and predictors of survival..* Gastroenterology **134**: 1342-1351.
33. Yang SH, Suh KS, Lee HW, Cho EH, et al. (2007). *A revised scoring system utilizing serum alphafetoprotein levels to expand candidates for living donor transplantation in hepatocellular carcinoma..* Surgery **141**: 598-609.
34. Cillo U, Navaglia F, Vitale A, Molari A, et al. (2004). *Clinical significance of alpha-fetoprotein mRNA in blood of patients with hepatocellular carcinoma..* Clin Chim Acta **347**: 129-138.
35. Cillo U, Vitale A, Navaglia F, Basso D, et al. = (2005). *Role of blood AFP mRNA and tumor grade in the preoperative prognostic evaluation of patients with hepatocellular carcinoma..* World J Gastroenterol **11**.
36. Kwon CH, Kim DJ, Han YS, et al. (2007). *HCC in living donor liver transplantation: can we expand the Milan criteria?* Dig Dis **25**: 313-319.
37. Kirimlioglu H, Dvorchick I, Ruppert K, et al. (2001). *Hepatocellular carcinomas in native livers from patients with orthotopic liver transplantation: biologic and therapeutic implications..* Hepatology **34**: 502-510.
38. Klintmalm GB. (1998). *Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a registry report of the impact of the tumor characteristics on outcome..* Ann Surg **228**: 479-490.
39. Cillo U, Vitale A, Bassanello M et al. (2004). *Liver transplantation for the treatment of moderately or well-differentiated hepatocellular carcinoma..* Ann Surg **239**: 150-159.
40. Zheng SS, Xu X, Wu J, et al. (2008). *Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Hangzhou experiences..* Transplantation **85**: 1726-1732.
41. Mazzaferro V. (2007). *Results of Liver Transplantation: With or Without Milan Criteria?* Liver Transplantation **13**: S44-S47.

42. Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, et al. (2009). *Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis*. *The Lancet Oncol* **10**: 35-43.
43. Sotiropoulos GC, Molmenti EP, Lang H. = (2009). *Milan criteria, up-to-seven criteria, and the illusion of a rescue package for patients with liver cancer*. *Lancet Oncol* **10**: 207-208.
44. Bruix J., Sherman M., J. M. Llovet et al., "Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-EASL conference", *Journal of Hepatology*, vol. 35, no 3, pp. 421-430, 2001
45. Bruix J., Sherman M., "Management of hepatocellular carcinoma", *Hepatology*, vol 42, p 1208-1236, 2005
46. Vivarelli M., Dazzi A., Zanello M., et al., "Effect of different immunosuppressive schedules on recurrence-free survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma", *Transplantation*, vol. 89, no. 2, p. 227-231, 2010.