

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA INTERNA E PATOLOGIE SISTEMICHE

Direttore: prof. C.E. Fiore

DOTTORATO DI RICERCA IN:

NUOVI SISTEMI DI VALUTAZIONE E STUDIO DELLE COMPLICANZE EMODINAMICHE
E METABOLICHE DELLE EPATOPATIE CRONICHE – XXIII CICLO

DOTT. SALVATORE FRANCESCO VADALÀ

RUOLO DEI POLIMORFISMI GENETICI DEL IL-28B NELLE COMPLICANZE
BILIARI POST-TRAPIANTO DI FEGATO NELL'ADULTO

Tesi di Dottorato

Tutor: Chiar.mo prof. Pierluigi Toniutto
Coordinatore: Chiar.mo prof. Gaetano Bertino

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

INDICE	2
INDICE ICONOGRAFICO	4
PREMESSA	5
CAPITOLO 1	6
PRINCIPALI INDICAZIONI E CONTROINDICAZIONI AL TRAPIANTO DI FEGATO NELL'ADULTO	6
1.1 Introduzione	6
1.2 Indicazioni consolidate al trapianto epatico	6
1.3 Indicazioni controverse al trapianto epatico	14
1.4 Controindicazioni assolute	17
1.5 Controindicazioni relative	17
1.6 Requisiti minimi per l'immissione in lista di trapianto di fegato nell'adulto	18
CAPITOLO 2	21
LE COMPLICANZE BILIARI POST-TRAPIANTO EPATICO	21
2.1 Introduzione	21
2.2 Considerazioni anatomiche e tecniche	21
2.3 Diagnosi	23
2.4 Prevalenza, timing e management delle complicanze biliari	24
2.5 Prevenzione delle complicanze biliari	30
CAPITOLO 3	31
POLIMORFISMI GENETICI DELLA INTERLEUKINA 28B (IL-28B), HCV E TRAPIANTO EPATICO	31
3.1 Introduzione	31
3.2 Fattori predisponenti la risposta alla terapia HCV (virus ed ospite correlati)	32
3.3 I polimorfismi genetici del IL-28B e la famiglia dell'INF- λ	33
3.4 Ruolo dei polimorfismi genetici del IL-28B nell'infezione HCV genotipo 1	35
3.5 Ruolo dei polimorfismi genetici del IL-28B in altri ambiti clinici: HCV genotipi non 1, infezione HIV, trapianto epatico	40
CAPITOLO 4	44
PROGETTO DI STUDIO	44

4.1 Scopo dello studio	44
4.2 Materiali e metodi	44
4.3 Risultati	46
CONCLUSIONI	51
BIBLIOGRAFIA	55

INDICE ICONOGRAFICO

Figura 1	7
Figura 2	8
Figura 3	9
Figura 4	10
Figura 5	10
Figura 6	23
Figura 7	24
Figura 8	25
Figura 9	28
Figura 10	35
Figura 11	36
Figura 12	37
Figura 13	39
Figura 14	50

PREMESSA

Il trapianto di fegato costituisce l'unica terapia valida per molte epatopatie terminali, per l'insufficienza epatica acuta e per alcune malattie metaboliche o congenite, dell'adulto o di interesse pediatrico, che implicano un coinvolgimento del fegato. Per questi motivi il ricorso al trapianto di fegato è divenuto progressivamente crescente negli ultimi anni, prevalentemente nelle aree geografiche dove le malattie epatiche in fase terminale rappresentano un importante problema di sanità pubblica e la mortalità per cause epatiche, seppure in lenta riduzione, è ancora molto rilevante.

Per quanto riguarda l'Italia, nel nostro Paese il trapianto di fegato è ormai da diversi anni una procedura consolidata, con più di 20 Centri Trapianti, un numero di trapianti superiore ai 1000/anno e risultati in alcuni casi superiori alla media europea (sopravvivenza media a un anno oltre l'82% per l'organo e oltre l'87% per il graft).

Malgrado l'aumento del numero di trapianti di fegato, la numerosità dei pazienti in attesa di trapianto è cresciuto parallelamente con un tempo di attesa medio per un trapianto di fegato di circa 1.8 anni ed un tasso di mortalità tra i pazienti in lista di oltre il 7%. Per questi motivi negli ultimi anni numerosi sforzi si sono indirizzati ad implementare ulteriormente il "sistema trapianto", attraverso l'incremento delle donazioni (anche con i cosiddetti donatori marginali o a rischio), la maggiore fruibilità del trapianto e lo sviluppo di tecniche chirurgiche atte a massimizzare la massa epatocitaria disponibile (con il cosiddetto split liver si possono trapiantare i due emifegati su due riceventi)¹.

Al fine di non vanificare gli sforzi atti ad incrementare il numero di organi disponibili, occorre porre estrema attenzione nell'individuare i giusti candidati al trapianto di fegato e, successivamente, compiere qualsiasi sforzo per far sì che la complessa procedura abbia esito favorevole.

A tal proposito i momenti cruciali per un buon trapianto epatico risultano essere, innanzitutto, la corretta valutazione delle indicazioni e delle controindicazioni; dopo l'intervento, invece, una precoce individuazione delle complicanze, al fine di un loro trattamento tempestivo che comporti maggiori margini di risoluzione.

Tra le complicanze del trapianto di fegato, le principali risultano essere quelle biliari, da molti ormai definite il "tallone d'Achille" del trapianto epatico. Anche se queste sono ritenute in gran parte correlate alla tecnica chirurgica, poco si sa se vi siano dei fattori predisponenti il loro sviluppo. L'individuazione di tali fattori sarebbe di estrema utilità al fine di identificare i pazienti potenzialmente "a rischio" di complicanze biliari e, idealmente, poterle prevenire.

CAPITOLO 1

PRINCIPALI INDICAZIONI E CONTROINDICAZIONI AL TRAPIANTO DI FEGATO NELL'ADULTO

1.1 Introduzione

Le indicazioni al trapianto di fegato per malattia epatica terminale possono essere suddivise in 2 grandi categorie a seconda del grado di consenso e di evidenza:

1. *indicazioni consolidate*, ampiamente validate dalla comunità scientifica;
2. *indicazioni controverse o marginali*, ove ancora non vi sono evidenze scientifiche chiare di efficacia e non vi è consenso definitivo.

Anche le controindicazioni, in base al grado di evidenza e raccomandazione, possono essere suddivise in 2 classi:

1. *controindicazioni assolute*;
2. *controindicazioni relative*.

1.2 Indicazioni consolidate al trapianto epatico

Le indicazioni consolidate al trapianto di fegato per malattia epatica terminale sono²⁻³ (Figura 1):

A) Malattie non neoplastiche

1. Malattie colestatiche ed autoimmuni
2. Cirrosi Alcolica
3. Cirrosi HBV e HDV correlata
4. Cirrosi HCV correlata
5. Indicazioni consolidate meno frequenti
 - Cirrosi criptogenetica
 - Malattia di Wilson
 - Cirrosi da emocromatosi genetica
 - Deficit di alfa1-antitripsina
 - Amiloidosi da transtiretina
 - Malattia di Budd-Chiari
 - Malattia policistica

B) Malattie neoplastiche

6. Carcinoma epatocellulare su cirrosi

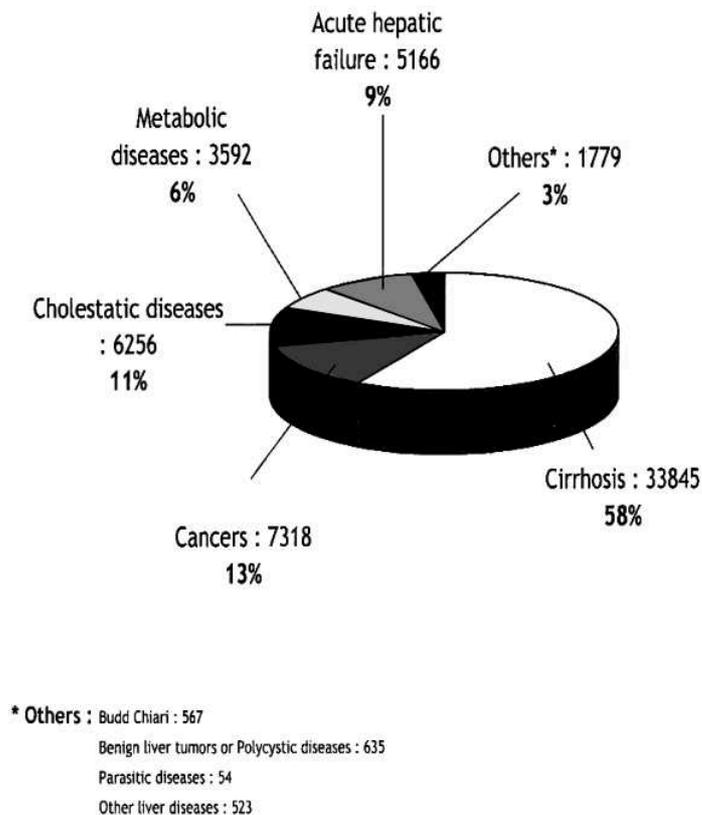


Figura 1 - Indicazioni al trapianto di fegato nell'adulto per malattia epatica terminale in relazione all'eziologia, su un campione di 61.718 pazienti trapiantati in Europa dal 1968 al 2005. Il numero accanto a ciascuna diagnosi rappresenta l'apporto percentuale per quella indicazione. C= cirrosi, E=epatite, HCC= carcinoma epatocellulare, CSP=colangite sclerosante primitiva, CBP= cirrosi biliare primitiva

A) Malattie non neoplastiche

1. Malattie colestatiche ed autoimmuni

Il trapianto di fegato rappresenta la terapia di elezione nei pazienti con malattia colestatica cronica su base autoimmune in stadio terminale, che non risponde più alla terapia medica convenzionale.

Ciò accade in circa il 10% della popolazione di pazienti affetti da tale patologia, che comprende sia le epatiti autoimmuni che le sindromi da "overlap", sempre più frequentemente diagnosticate nella pratica clinica, oltre alla cirrosi biliare primitiva (CBP), ed alla colangite sclerosante primitiva (CSP), già considerate consolidate indicazioni a trapianto di fegato.

Nei pazienti con *CSP*, la frequente coesistenza di malattia infiammatoria del colon non rappresenta una controindicazione al trapianto, purché venga attuato un preciso programma di follow-up endoscopico.

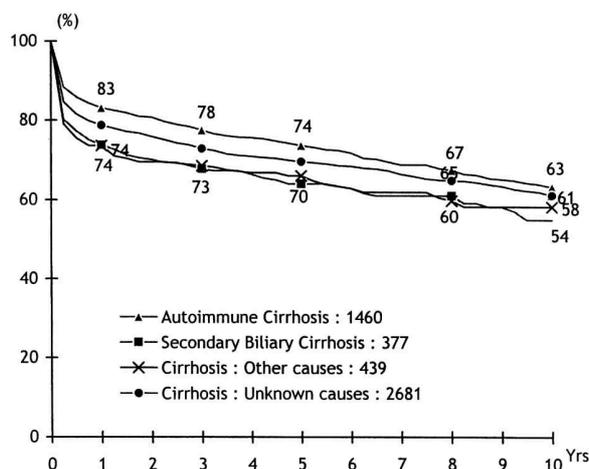


Figura 2 - Sopravvivenza di pazienti con cirrosi quale prima indicazione al trapianto epatico (periodo 01/88-12/05)

2. Cirrosi alcolica

La cirrosi epatica alcolica è un'indicazione consolidata al trapianto di fegato³⁻⁴.

L'indicazione al trapianto di fegato per questa patologia richiede una accurata valutazione dell'idoneità del ricevente, sia per motivi etici che clinici, data l'alta incidenza di ripresa dell'abuso alcolico dopo l'intervento, segnalata fino al 95% dei casi⁴⁻⁵. La recidiva di epatopatia alcolica rappresenta la causa più frequente di morte (87.5%) dopo trapianto di fegato, mentre le neoplasie maligne, le malattie cardiovascolari e le infezioni, rappresentano il rischio maggiore di mortalità nei pazienti che si mantengono astinenti⁶. La maggior parte dei Centri trapianto internazionali ritiene indispensabile, per l'inserimento in lista d'attesa, almeno sei mesi di documentata astinenza alcolica⁷⁻⁸.

Un capitolo ancora oggetto di controversia nell'ambito delle indicazioni a trapianto epatico in corso di malattia alcolica è rappresentato dalla *epatite acuta alcolica*⁹.

Attualmente, comunque, non appare giustificato estendere l'indicazione al trapianto epatico nei pazienti con cirrosi associata ad epatite acuta alcolica, se non nell'ambito di un protocolli sperimentali, escludendo eventuali comorbidità²⁻⁹.

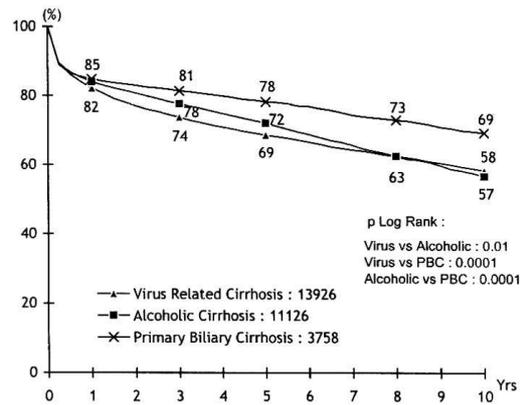


Figura 3 – Sopravvivenza di pazienti con cirrosi quale prima indicazione al trapianto epatico (periodo 01/88-12/05)

3. Cirrosi HBV e HDV correlata

La cirrosi epatica da virus B (sia HBeAg positiva che HBeAg negativa) è un'indicazione consolidata al trapianto di fegato. Secondo i dati riportati dal ELTR³, la sopravvivenza a 5 anni e 10 anni è risultata rispettivamente del 74% e 69%. Questi ottimi risultati sono frutto da un lato, della migliore selezione del paziente candidato a trapianto e dall'altro dalla possibilità di attuare una attiva prevenzione della recidiva di malattia dopo il trapianto, grazie alla disponibilità, oltre che di immunoglobuline (IgG) specifiche per la immunoprofilassi, di nuovi farmaci antivirali (analoghi nucleotidici)¹⁰⁻¹¹⁻¹².

I pazienti con cirrosi HDV correlata seguono gli stessi criteri di selezione e profilassi indicati per l'eziologia HBV¹². In genere questi pazienti hanno bassi livelli di viremia HBV o sono HBV-DNA negativi ed il trattamento con analoghi nucleotidici nel periodo pre-OLTx, al contrario di quanto avviene per l'HBV, non è indicato.

4. Cirrosi HCV correlata

La cirrosi da virus C è l'indicazione più frequente al trapianto di fegato; secondo i dati riportati dal ELTR1, questa rappresenta fino al 63% delle indicazioni al trapianto.

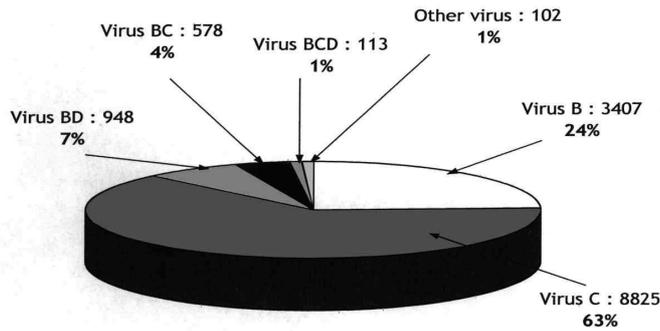


Figura 4 – Indicazioni primarie al trapianto epatico in 13973 pazienti con cirrosi virus correlata (dati ELTR nel periodo 01/98 – 12/05)

L'appropriatezza dell'indicazione è giustificata sia dalla frequente associazione con epatocarcinoma (HCC) che dall'elevato numero di decessi per cirrosi legati a questa eziologia¹³⁻¹⁴. A differenza di quanto accade per l'infezione da HBV, ad oggi non è stata dimostrata in maniera solida una correlazione diretta tra la carica virale di HCV pre-trapianto e la severità della ricorrenza di malattia nel post-trapianto¹⁵, tale da indicare una terapia antivirale pre-trapianto che comporta, tra l'altro, elevati rischi¹⁶⁻¹⁷⁻¹⁸⁻¹⁹.

L'elevata percentuale di recidiva di epatite nel graft e le sue complicanze, influenzano marcatamente la sopravvivenza post-trapianto rispetto alle altre patologie virali e non virali, risultando compresa tra 81% al 1° anno post-trapianto e 52% a 10 anni rispettivamente².

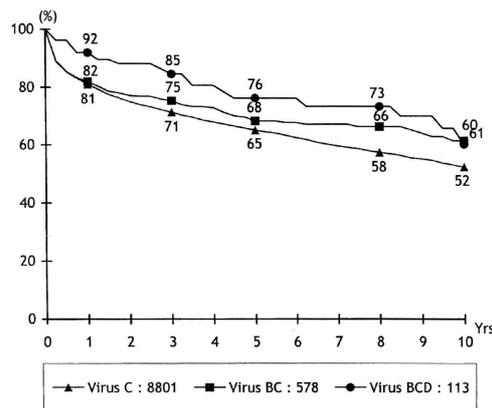


Figura 5 - Curve di sopravvivenza dei pazienti sottoposti a trapianto epatico per cirrosi virale (dati ETRF nel periodo 01/88-12/05)

5. Indicazioni consolidate meno frequenti

Altre patologie, benché meno frequenti, costituiscono una indicazione consolidata al trapianto di fegato in età adulta, con sopravvivenza del paziente e del graft generalmente adeguate².

Cirrosi criptogenetica

La cirrosi criptogenetica rappresenta circa il 10% delle indicazioni al trapianto di fegato nell'adulto. La maggior parte di queste forme è probabilmente riconducibile a cirrosi post-NASH (Non Alcoholic Steato Hepatitis), malattia autoimmune o a problematiche vascolari misconosciute²⁰. La sopravvivenza del paziente e del graft appaiono sovrapponibili a quelle delle altre indicazioni²¹.

Malattia di Wilson

Il trattamento primario della malattia di Wilson è farmacologico e prevede una fase di attacco (penicillamina o trientina), e a seguire una terapia di mantenimento a lungo termine (sali di zinco); i pazienti asintomatici o presintomatici possono essere trattati direttamente con i sali di zinco.

Il trapianto di fegato è indicato in presenza di: (a) cirrosi scompensata non responsiva alla terapia farmacologica (la cui durata non può essere inferiore ad almeno 6-8 settimane); (b) insufficienza epatica fulminante: in questa forma la mortalità è virtualmente del 100% ed il trapianto di fegato rappresenta l'unica opzione terapeutica².

Oltre a migliorare la sopravvivenza, il trapianto di fegato corregge i difetti metabolici della malattia di Wilson. Per contro, non esistono ancora indicazioni al trapianto di fegato nei pazienti con interessamento neurologico: nelle forme severe è improbabile che il trapianto possa determinare una regressione dei sintomi²², benché alcuni autori riportino risultati differenti²³.

Cirrosi da emocromatosi genetica

La terapia dell'emocromatosi consiste nella rimozione dell'eccesso di ferro dall'organismo mediante salassi o agenti chelanti (desferoxamina); l'epatopatia in stadio pre-cirrotico, il diabete e le disfunzioni cardiache sono in genere responsive alla ferrodplezione.

Il trapianto di fegato è indicato nei pazienti con epatopatia in fase terminale; poiché il difetto metabolico risiede nel fegato, il trapianto è considerato curativo.

La sopravvivenza dopo trapianto di fegato per emocromatosi genetica è leggermente inferiore a quella dei pazienti trapiantati per altre epatopatie, soprattutto a causa di sepsi e complicanze cardiache²⁴⁻²⁵, suggerendo la necessità di un attento screening cardiologico nei pazienti candidati all'intervento².

Deficit di alfa1-antitripsina

Il trapianto di fegato è indicato nei pazienti con insufficienza epatica. Il deficit di alfa1-antitripsina rappresenta, insieme all'atresia delle vie biliari, la maggiore indicazione al trapianto di fegato nei neonati e nei bambini²⁶⁻²⁷; il trapianto corregge il difetto metabolico e stabilizza la malattia polmonare. Una malattia polmonare avanzata costituisce una controindicazione al trapianto isolato di fegato.

Amiloidosi da transtiretina

Attualmente il trapianto di fegato, abolendo la produzione di proteina mutata, rappresenta il solo trattamento definitivo per l'amiloidosi da transtiretina. Il trapianto trova indicazione quando il paziente presenta evidenza di malattia; l'indicazione non deve essere posta in base al solo dato genetico di mutazione, essendo variabile la penetranza di malattia. Occorre tuttavia sottolineare che, nonostante il trapianto di fegato appaia razionale ed efficace per i pazienti portatori di mutazione Met30²⁸, il suo ruolo nelle altre varianti è molto meno chiaro²⁹⁻³⁰.

Oltre al tipo di mutazione, un altro fattore che sembra giocare un ruolo chiave nel determinare la prognosi dopo trapianto di questi pazienti è lo stato nutrizionale, che viene in genere espresso mediante il Body Mass Index modificato (mBMI, dato dal BMI moltiplicato per l'albuminemia in g/l): un mBMI inferiore a 600 si associa infatti ad una significativa riduzione della sopravvivenza dopo trapianto³¹.

Le indicazioni e le controindicazioni al trapianto di fegato per amiloidosi da transtiretina non sono allo stato attuale chiaramente definite, soprattutto per i pazienti con varianti non-Met30.

E' infine di importanza fondamentale ricordare che nella maggior parte delle casistiche il trapianto di fegato si è dimostrato in grado di arrestare la progressione di malattia, ma non di migliorare i sintomi; ne consegue che, quando indicato, il trapianto deve essere effettuato precocemente nel decorso di malattia, al fine di migliorare la sopravvivenza e assicurare una accettabile qualità di vita.

Da ricordare la possibilità di utilizzare il fegato del paziente con amiloidosi per trapiantare un ricevente in lista trapianto per epatopatia cronica (trapianto domino); tale procedura dovrebbe essere effettuata solo su riceventi in età avanzata, non essendo ancora definito il rischio di sviluppare amiloidosi de novo.

Malattia di Budd-Chiari

La malattia può esordire con un quadro di epatopatia fulminante, acuta, subacuta o cronica.

Il trattamento, oltre alla gestione delle complicanze, include:

- terapia della causa sottostante;
- terapia anticoagulante per prevenire l'estensione della trombosi venosa;
- rimozione dell'ostruzione al deflusso venoso epatico: terapia trombolitica nelle forme acute; angioplastica nelle forme su base stenotica; shunt porto-sistemico per via transgiugulare (TIPS) o chirurgica.

Il trapianto di fegato trova indicazione in caso di insufficienza epatica fulminante, cirrosi e fallimento dello shunt porto-sistemico. Nel trapianto di fegato per sindrome di Budd-Chiari è di fondamentale importanza considerare due aspetti: (1) prognosi a lungo termine della malattia sottostante, riservando il trapianto solo ai pazienti con malattie a prognosi favorevole; (2) necessità di trattamento anticoagulante a lungo termine per prevenire trombosi arteriose e venose nel post-trapianto; tale trattamento potrebbe non essere indicato nei pazienti con stati trombofilici a genesi epatica in quanto corretti dal trapianto².

Malattia policistica

La malattia policistica del fegato, in assenza di complicanze delle cisti, determina sintomi solo in una bassa percentuale di pazienti ed in genere solo in presenza di massiva epatomegalia.

I pazienti sintomatici possono essere trattati con:

- tecniche chirurgiche conservative (fenestrazione delle cisti e/o resezione epatica), nei pazienti con malattia di tipo I (<10 cisti totali di diametro >10cm) o di tipo II (diffusa alterazione parenchimale con presenza di cisti di medie dimensioni e ampie aree di fegato indenne), secondo la classificazione di Gigot³²;
- trapianto di fegato, nei pazienti con malattia di tipo III (massivo e diffuso sovertimento epatico con cisti di piccole e medie dimensioni, con minime aree di parenchima indenne).

L'indicazione al trapianto di fegato deve essere posta solo in pazienti gravemente sintomatici, con particolare attenzione allo stato nutrizionale; nei casi con associata insufficienza renale cronica, dovrà essere valutata l'opportunità di trapianto combinato fegato-rene².

B) Malattie neoplastiche

6. Epatocarcinoma su cirrosi

L'epatocarcinoma (HCC) rappresenta la quinta neoplasia più frequente al mondo e la terza causa di morte tumorale.

L'80% degli HCC compare su fegato cirrotico. Il trapianto di fegato è attualmente considerato, in pazienti selezionati, il miglior trattamento del HCC su cirrosi in quanto consente il trattamento contemporaneo della cirrosi e della neoplasia.

I criteri minimi per la diagnosi di epatocarcinoma sono quelli definiti dalla conferenza EASL di Barcellona del 2001³³.

I potenziali candidati a trapianto per HCC su cirrosi, non resecabili, debbono avere le seguenti caratteristiche, note come Criteri di Milano:

- presenza di un singolo nodulo di HCC (≤ 5 cm di diametro) oppure fino a tre noduli, ciascuno di diametro non superiore a 3 cm;
- assenza di localizzazioni tumorali extraepatiche (linfonodali o in altre sedi metastatiche);
- assenza di invasione vascolare neoplastica dei principali rami venosi intraepatici (portali, sovraepatici) o extraepatici (vena porta, vena cava) confermata o sospettata alle valutazioni di imaging pre-operatorie.

L'utilizzo di tali criteri comporta una sopravvivenza attesa del paziente a 5 anni pari a circa il 70% con una percentuale di recidiva tumorale inferiore al 25%³⁴.

1.3 Indicazioni controverse al trapianto epatico

Epatocarcinoma primitivo (HCC) "oltre" i criteri di Milano (espansione dei criteri convenzionali)

Nel periodo antecedente al 1996, cioè prima dell'adozione dei "criteri di Milano", la sopravvivenza a 5 anni di pazienti trapiantati per HCC avanzato non era superiore al 50%.

Con il miglioramento delle procedure di trattamento dei pazienti e l'affinamento dell'immunosoppressione post-trapianto, diversi studi hanno suggerito che una modesta espansione dei criteri di Milano permetterebbe risultati apparentemente accettabili in termini di sopravvivenza globale e di sopravvivenza libera da malattia.

In realtà da questi studi si evidenzia come estendendo i criteri d'inclusione basati sul numero e le dimensione dei noduli, la sopravvivenza del paziente e l'intervallo libero da recidiva tumorale diminuiscano progressivamente, pur rimanendo in alcuni casi entro valori accettabili^{34_35_36_37_38_39}.

Centro	Tipo di Studio	CE singolo	CE Multifocale	Sopravvivenza 5 aa
Milano, 1996 ⁴⁷	Prospettico	≤ 5 cm	≤ 3 noduli, ciascuno \leq cm	75% a 4 aa
San Francisco, 2001 ⁴⁸	Retrospettivo	$\leq 6,5$ cm	≤ 3 noduli, \emptyset max 4,5 cm \emptyset totale < 8 cm	70%
Pamplona, 2001 ⁴⁹	Retrospettivo	≤ 6 cm	≤ 3 noduli ciascuno ≤ 5 cm	60% (DFS)
Mount Sinai NY, 2002 ⁵⁰	Retrospettivo	5-7 cm	Non considerato	50%
French Multicentric, 2002 ⁵¹	Retrospettivo	-	≤ 3 noduli $\emptyset > 3$ cm	37%
Dallas Tumor Registry, 2007 ⁵²	Retrospettivo	≤ 6 cm	≤ 4 noduli ciascuno ≤ 5 cm	55%

Tabella 1 - Risultati dell'espansione dei criteri convenzionali per trapianto per HCC su cirrosi

Il Downstaging (retrostadiazione) dell'epatocarcinoma

Il termine downstaging indica la possibilità di ottenere una retrostadiazione di una neoplasia mediante una procedura (chemioterapica o loco-regionale), volta ad ottenere la riduzione volumetrica della porzione vitale della stessa⁴⁰.

In campo epatologico, il downstaging, mediante tecniche di chemioembolizzazione o di ablazione percutanea, ha l'obiettivo di attenuare la progressione del tumore e, in campo trapiantologico, di far mantenere o far rientrare entro i criteri di trapiantabilità convenzionali (attualmente i criteri di Milano), pazienti con HCC originariamente considerati al di fuori di essi.

Attualmente non vi sono studi prospettici che dimostrino se l'ottenimento di un downstaging di tumori inizialmente al di fuori dei criteri di Milano si associ a risultati di sopravvivenza sovrapponibili a quelli ottenuti nei tumori inizialmente entro tali criteri, in assenza di terapie locoregionali, né peraltro, vi è evidenza di quale sia la migliore metodica di downstaging².

Infezione da HIV

I pazienti portatori di HIV, dopo l'introduzione di terapie basate sulla combinazione di tre o più farmaci antiretrovirali (HAART= Highly Active Anti-Retroviral Therapy), mantengono spesso un'infezione cronica senza sviluppare AIDS. Questi pazienti hanno frequentemente una coinfezione con virus epatitici e l'insufficienza epatica terminale rappresenta attualmente, dopo l'AIDS, la seconda causa di morte di questi pazienti⁴¹⁻⁴².

Per tale motivo alcuni pazienti con infezione HIV sono stati sottoposti a trapianto di fegato nell'ambito di protocolli sperimentali.

Colangiocarcinoma

Le esperienze iniziali con il trapianto di fegato per colangiocarcinoma sono state deludenti a causa soprattutto di una inadeguata selezione dei pazienti. Come descritto dai dati Europei, prima del 2000, nessuno dei pazienti con CCC è sopravvissuto a 5 anni dal trapianto di fegato.

Tuttavia, in una recente pubblicazione, il gruppo della Mayo Clinic ha presentato i loro risultati preliminari utilizzando prima del trapianto di fegato un protocollo di terapia neoadiuvante integrando radio e chemioterapia⁴³ con effetti sorprendentemente positivi in termini di sopravvivenza e riduzione del tasso di recidiva⁴³⁻⁴⁴⁻⁴⁵⁻⁴⁶⁻⁴⁷.

I risultati eccellenti del gruppo della Mayo Clinic derivano da una rigorosa selezione di questi pazienti.

Questi dati suggeriscono che con l'ausilio del trattamento radio-chemioterapico neoadiuvante, il trapianto possa rappresentare una reale e più sicura opzione rispetto alla resezione epatica.

Metastasi da tumori neuroendocrini (TNE)

Le metastasi epatiche da tumori neuroendocrini (TNE) sono la causa principale di morte nei pazienti con TNE ad origine intestinale e/o pancreatica. In circa il 90% di questi la distribuzione delle metastasi è multifocale e bilaterale e quindi la resezione epatica con intento curativo è fattibile in non più del 20% dei casi.

Sia trattamenti medici che chirurgici sono stati proposti per i pazienti con metastasi epatiche da TNE (chemioterapia intrarteriosa e/o sistemica, analoghi della somatostatina, terapia con interferone) con una sopravvivenza a 5 anni che però non supera il 25-35%.

Peraltro, la chirurgia resettiva con intento curativo è associata ad una sopravvivenza a 5 anni del 50%; il numero di pazienti nei quali è possibile una resezione radicale è molto basso e quindi il trapianto di fegato rappresenta teoricamente una opzione terapeutica proponibile per un gran numero di pazienti con metastasi bilaterali non resecabili da TNE.

D'altro canto la scarsità degli organi e l'alto tasso di recidiva del tumore, fanno sì che l'indicazione al trapianto venga posta solo in quei pazienti nei quali altri metodi terapeutici sono stati giudicati inefficaci o non praticabili.

Sulla base delle conoscenze attuali il trapianto di fegato nei pazienti con metastasi epatiche da TNE deve essere considerato solo in individui selezionati⁴⁸.

Emangioendotelioma epitelioido (EEE)

Il trapianto di fegato è stato proposto come trattamento di scelta e come unica alternativa quando il tumore non era resecabile e soprattutto quando era multifocale. Rimane ancora da chiarire la possibile utilità del "Sirolimus" nella terapia immunosoppressiva nei pazienti trapiantati per EEE⁴⁹, mentre è stata evidenziata una discreta risposta clinica al trattamento delle recidive di malattia dopo trapianto con l'impiego dell'interferone.

Neoplasie benigne

Raramente vi è indicazione al trapianto di fegato per patologie benigne. Alcuni Autori in letteratura riportano l'utilizzazione del trapianto di fegato per forme giganti di angiomi complicate da lesioni da traumi accidentali, adenomatosi multiple con compromissione della funzionalità epatica o angiomiolipomi non resecabili.

1.4 Controindicazioni assolute

Le seguenti condizioni costituiscono controindicazioni assolute al trapianto di fegato²:

- neoplasie maligne extraepatiche in atto;
- neoplasie maligne pregresse con risposta completa al trattamento e con follow-up <5 anni (salvo valutazione oncologica collegiale indicativa di basso rischio di recidiva neoplastica e/o metastasi)
- trombosi portale neoplastica;
- epatocarcinoma primitivo, al di fuori delle indicazioni precedentemente riportate;
- colangiocarcinoma non resecabile, al di fuori delle indicazioni precedentemente riportate;
- insufficienza multiorgano;
- grave ipertensione polmonare con PAM \geq 45mmHg, non correggibile con terapia medica;
- sindrome epatopolmonare con saturazione di O₂<50% in aria ambiente;
- infezione da HIV, al di fuori del Programma Nazionale di trapianto di fegato da cadavere in HIV, per i Centri che ne fanno parte
- malattie cardiovascolari e polmonari avanzate (valutazione collegiale specialistica);
- grave osteoporosi con fratture spontanee vertebrali e con impotenza funzionale;
- livelli di HBV-DNA >20000 UI/ml al momento del trapianto;
- infezioni batteriche in atto sostenute da germi non identificati (tranne infezioni dell'albero biliare in trattamento), per le quali è possibile adottare una esclusione temporanea dalla lista attiva;
- dipendenza attiva da stupefacenti o da alcol;
- malattie psichiatriche gravi (schizofrenia, psicosi maggiori, severi disturbi della personalità), secondo le Legislazioni dei singoli Stati;
- mancata compliance del paziente;
- disordine neurologico grave (malattia di Alzheimer, danni neurologici irreversibili, ect).

1.5 Controindicazioni relative

Le seguenti condizioni costituiscono controindicazioni relative al trapianto di fegato²:

- presenza di trombosi portale parziale (non neoplastica);
- pregressi interventi chirurgici estesi su organi addominali;
- obesità (BMI > 30);
- pregressa chirurgia dei quadranti superiori dell'addome;
- pazienti in terapia sostitutiva con metadone o analoghi.

L'abuso di oppioidi rappresenta un problema clinico di frequente riscontro in pazienti coinfecti con virus HIV, con virus epatitici o in soggetti con concomitante abuso di alcolici. Per queste motivazioni non è infrequente incontrare pazienti con malattia terminale di fegato legata ad una

delle cause sopra citate che contemporaneamente presentano un abuso di oppioidi. Questa categoria di pazienti, attivi consumatori di oppioidi, vengono considerati come non candidabili al trapianto epatico. Molto più discussa è la possibilità di candidare al trapianto pazienti in trattamento sostitutivo con metadone e analoghi, nei quali sussistano le indicazioni epatologiche al trapianto. Alcune esperienze indicherebbero che sia i risultati post trapianto, sia la compliance alla terapia in questa particolare categoria di pazienti non siano significativamente diversi da quelli osservati per i pazienti non in terapia con metadone⁵⁰.

I pazienti in terapia di sostituzione con metadone o analoghi, possano essere considerati candidabili a trapianto epatico solo dopo una approfondita valutazione psichiatrica e psicologica, atte ad escludere la presenza di gravi disturbi della personalità, in presenza dei quali dovrebbe essere attuato quanto evidenziato in precedenza. Inoltre, la candidabilità a trapianto epatico di questa categoria di pazienti possa essere considerata solo in presenza di un programma di sorveglianza continua e certificata della terapia di sostituzione con metadone o analoghi².

1.6 Requisiti minimi per l'immissione in lista di trapianto di fegato nell'adulto

Per ciascuna delle indicazioni consolidate al trapianto di fegato è raccomandato il rispetto di precisi criteri minimi per l'iscrizione in lista di attesa. Tali criteri hanno lo scopo di identificare attraverso strumenti diversi, la severità della malattia epatica del paziente e attribuire di conseguenza un rischio di mortalità nel breve-medio termine. Nel momento in cui tale rischio supera quello derivante dall'intervento di trapianto, il paziente viene ritenuto avere i requisiti minimi di candidabilità al trapianto epatico, che di norma si considerano quando il rischio di morte ad un anno è >10%, corrispondente nel cirrotico ad un score di Child-Turcotte-Pugh (CTP) >7.

I modelli predittivi del rischio di mortalità per malattie epatiche attualmente in uso nel contesto della selezione del paziente al trapianto epatico sono tradizionalmente derivati da esperienze cliniche essenzialmente basate sull'applicazione della classificazione CTP, o più recentemente da un approccio statistico basato sull'analisi multivariata dei fattori predittivi indipendenti di mortalità, da cui è stato derivato lo score di MELD. Entrambi questi strumenti hanno pregi e limiti e non sono applicabili con uguale accuratezza in particolari categorie di malattie avanzate di fegato, come ad esempio le malattie colestatiche. Per tali motivazioni i requisiti minimi raccomandati per l'immissione in lista di attesa per trapianto epatico si basano su diversi strumenti di selezione a seconda della tipologia della malattia.

Cirrosi epatica (di qualunque eziologia)

I requisiti minimi raccomandati per considerare un paziente cirrotico per l'inserimento in lista di attesa per trapianto epatico sono:

- cirrosi con score di Child-Turcotte-Pugh ≥ 7 ;
- cirrosi con score di Child-Turcotte-Pugh < 7 solo se associata ad episodio di recente scompenso (ascite severa, encefalopatia porto-sistemica, sanguinamento da varici gastro-esofagee, peritonite batterica spontanea) non dovuto a fattori precipitanti rimuovibili;
- coesistenza di HCC entro i criteri di Milano anche con score di Child-Turcotte-Pugh < 7 .

Il CNT ha indicato, in Italia, come unico criterio minimo per l'immissione in lista di trapianto del paziente con cirrosi un punteggio MELD > 10 , sebbene a tale punteggio non corrisponda un rischio di morte significativo, né a breve né a medio termine.

Malattie colestatiche croniche

I modelli predittivi di sopravvivenza sono stati validati per la cirrosi biliare primitiva (CBP) e per la colangite sclerosante primitiva (PSC). In entrambe le patologie il criterio minimo di immissione in lista è legato alla presenza di un rischio di mortalità del paziente senza trapianto, ad un anno dall'osservazione, $> 10\%$. Un ulteriore criterio clinico può essere rappresentato dalla presenza di prurito intrattabile o di marcata astenia, gravemente condizionanti la qualità della vita.

Nel caso della CBP il modello predittivo di mortalità da utilizzare è il Mayo Risk Model, con il quale il punteggio minimo ritenuto adeguato per iscrivere il paziente in lista è > 6.5 .

Analogamente a quanto descritto per la CBP, anche in caso di PSC, il modello prognostico al quale fare riferimento è il New PSC model sviluppato dalla Mayo Clinic; un risk score calcolato > 1.9 rappresenta il criterio minimo di immissione in lista.

Considerando tuttavia la elevata incidenza annuale di colangiocarcinoma ($1,5\%$)⁵¹ in questa categoria di pazienti e la scarsa sensibilità e specificità delle metodiche di screening per una diagnosi precoce del tumore, è ipotizzabile che i pazienti affetti da PSC possano essere iscritti in lista precocemente, anche in assenza di severi segni di insufficienza epatica.

Età del candidato al trapianto di fegato

Dai dati del ELTR³ appare evidente come vi sia una significativa ridotta sopravvivenza sia a 5 che a 10 anni dal trapianto nei pazienti con età > 60 anni rispetto ai pazienti più giovani. La ridotta sopravvivenza è per lo più legata ad un peggiore stato nutrizionale, alla presenza di un più marcato depauperamento muscolare, alla maggior frequenza di severa encefalopatia epatica e di insufficienza renale al momento del trapianto e ad una maggior durata della ospedalizzazione post trapianto, sia nei reparti di terapia intensiva che nei reparti di degenza ordinaria⁵². Recentemente è stato evidenziato inoltre come i riceventi con età più avanzata presentino un rischio maggiore di mortalità post trapianto indipendente dal funzionamento del graft⁵³.

Nonostante non vi sia un valore assoluto di età codificato per candidare o meno un paziente al trapianto di fegato, i dati scientifici, unitamente alla sempre crescente scarsità di organi in relazione

alle richieste, indicano come in un ottica di razionalizzazione delle risorse, l'età massima alla quale candidare un paziente al trapianto epatico, in assenza di co-morbidità, non debba essere superiore a 65 anni².

Epatocarcinoma (HCC)

In pazienti con cirrosi epatica in classe A di Child-Turcotte-Pugh, rappresentano criteri minimi per l'inserimento in lista:

- presenza di nodulo singolo con dimensioni all'interno dei criteri di Milano, non trattabile con terapie curative alternative al trapianto (resezione, termoablazione, alcolizzazione).

In pazienti con malattia cirrotica in classe B o C di Child-Turcotte-Pugh, rappresentano criteri minimi per l'inserimento in lista:

- presenza di noduli singoli o multipli, con caratteristiche dimensionali e di numero riconducibili a quanto previsto dai criteri di Milano².

CAPITOLO 2

LE COMPLICANZE BILIARI POST-TRAPIANTO EPATICO

2.1 Introduzione

Le complicanze biliari da sempre rappresentano il “tallone d’Achille” del trapianto di fegato.

Esse segnarono le esperienze iniziali, verificandosi in quasi uno su tre riceventi il trapianto: fistole e stenosi si verificavano a seguito di difettosi metodi di ricostruzione, anastomosi tecnicamente inadeguate e dotti biliari danneggiati da una inadeguata conservazione. La frequenza delle complicanze biliari era gravata, inoltre, da limitate tecniche di imaging biliare e addominale che impedivano o ritardavano la loro scoperta. Come conseguenza, molti pazienti morivano di sepsi prima che l’intervento chirurgico potesse salvarli.

Ad oggi le complicanze biliari rimangono la principale fonte di morbilità e mortalità nel paziente trapiantato di fegato, anche se la loro incidenza è progressivamente diminuita a seguito dell’evoluzione delle tecniche chirurgiche⁵⁴⁻⁵⁵.

Tali complicanze sono rappresentate da stenosi, leakage, calcoli, sludge, biloma e disfunzione dello sfintere di Oddi.

La maggior parte di esse appare nei primi 2-3 mesi post-OLTx. L’incidenza complessiva varia dal 5 al 32%⁵⁶. Le complicanze più serie sono fistole e stenosi anastomotiche e stenosi più diffuse che coinvolgono la biforcazione o i dotti intraepatici dell’albero biliare.

Attualmente, il rischio complessivo di mortalità o perdita del graft da complicanze biliari post-OLTx si è ridotto ad una piccola percentuale, grazie soprattutto ai miglioramenti nella gestione del paziente ed a metodi più precisi per differenziare le complicanze biliari dalle altre cause di anomala funzione epatica.

2.2 Considerazioni anatomiche e tecniche

Irrorazione sanguigna del dotto biliare

L’irrorazione arteriosa dell’albero biliare è essenziale per l’integrità del drenaggio biliare del graft. L’irrorazione arteriosa al dotto sopraduodenale è assiale. I vasi originano dalle arterie nella parte iniziale e terminale del dotto e viaggiano longitudinalmente ad esso. Circa 2/3 del supporto arterioso originano da vasi sottostanti, mentre il resto origina dalla arteria epatica destra soprastante

e da rami diretti dell'arteria epatica quando essa scorre in prossimità del dotto. Il dotto del donatore dovrebbe essere diviso abbastanza in alto da essere certi che la sua lunghezza sia adeguatamente fornita dall'irrorazione assiale dall'alto e la mobilitazione del dotto dal tessuto periduttale dovrebbe essere ridotta al minimo.

L'albero biliare intraepatico del fegato trapiantato è criticamente dipendente dalla pervietà dell'arteria epatica. Sebbene la trombosi arteriosa possa risultare da un'ischemia globale del graft e disturbare profondamente la funzione dello stesso, talvolta l'unica indicazione di un'arteria trombizzata è una stenosi o una fistola biliare. La conferma della pervietà dell'arteria epatica è essenziale quando si sviluppano problemi biliari, soprattutto nel momento in cui l'albero biliare prossimale o intraepatico sono il sito di anormalità.

Ricostruzione biliare

La coledococoledocostomia (CCS) termino-terminale e la coledocodigiunostomia a Y secondo Roux (CJRY) sono le due procedure standard utilizzate per garantire un corretto drenaggio biliare. Quando i dotti del donatore e del ricevente sono di buon calibro e adeguata lunghezza, viene utilizzata la CCS termino-terminale. Se i dotti sono troppo piccoli, di insufficiente lunghezza, o hanno discrepanza nel calibro con quelli del ricevente, si preferisce utilizzare una CJRY.

Riguardo al tipo di ricostruzione, un inadeguato supporto sanguigno e una difettosa tensione sulla anastomosi sono prerequisiti per una non guarigione.

L'utilizzo del T-tube con funzione di tutore dell'anastomosi biliare ha attualmente un ruolo controverso e moltissimi centri hanno ormai abbandonato il suo uso routinario⁵⁷⁻⁵⁸⁻⁵⁹.

Graft di ridotte dimensioni

L'incidenza di fistole e stenosi biliari è maggiore quando vengono usati graft di ridotte dimensioni. Studi documentano un tasso di complicanze che variano dal 15 al 25% in riceventi di graft di ridotte dimensioni. La superficie di taglio aggiunge ovviamente una potenziale fonte di fistola biliare, ma le complicanze anastomotiche sono anche superiori. Le variazioni nell'anatomia biliare e la frequente necessità di anastomosi multiple bilio-enteriche aggiungono un rischio di complicanze maggiore. I dotti dovrebbero essere sezionati a livello del parenchima epatico per minimizzare la probabilità di devascularizzazione. Sebbene la crescente esperienza e l'individuazione di varianti anatomiche dovrebbe diminuire il tasso di complicanze biliari con graft di ridotte dimensioni, la natura intrinseca della chirurgia trapiantistica segmentale rende difficile ridurre l'incidenza dei problemi biliari rispetto a quando si procede al trapianto dell'intero organo.

2.3 Diagnosi

Le modalità di presentazione delle complicanze biliari sono varie.

Mentre il leakage si presenta solitamente nell'immediato periodo post-operatorio, le stenosi si verificano di solito alcune settimane dopo l'OLTx (Figura 6).

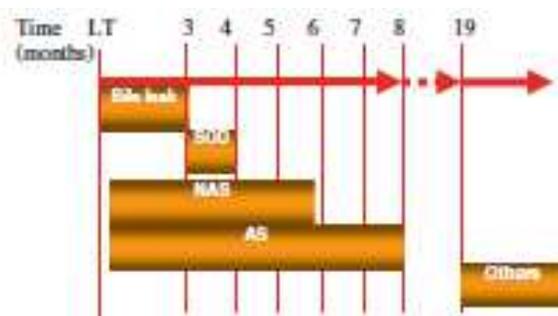


Figura 6 – Linea temporale delle complicanze biliari post-OLTx⁶⁵. Anche se NAS e AS sono solitamente più frequenti dopo 3 e 5 mesi dal trapianto, esse possono comunque essere osservate in qualunque fase post-OLTx. OLTx, Orthotopic liver transplantation; SOD, sphincter of Oddi dysfunction; NAS, non anastomotic stricture; AS, anastomotic stricture; Others, biliary stones, sludge, casts

Dal punto di vista clinico, alcuni pazienti sono asintomatici, con lieve incremento di transaminasi, fosfatasi alcalina, bilirubina e GGT, mentre altri si presentano con febbre, dolore addominale ed anoressia⁶⁰⁻⁶¹.

Una volta sospettata una complicanza biliare, risulta mandatorio eseguire un'ecocolordoppler addominale al fine di valutare la vascolarizzazione epatica ed eventuali anomalie morfologiche dell'albero biliare (Figura 7).

Se l'ecografia suggerisce una trombosi dell'arteria epatica, è indispensabile procedere con l'esecuzione di un'angiografia epatica con lo scopo di effettuare una disostruzione della stessa.

L'ecografia addominale presenta un elevato valore predittivo positivo solo in presenza di vie biliari dilatate. In assenza di dilatazione biliare, essa presenta una bassa sensibilità (38-68%) per la valutazione di ostruzione biliare⁶².

La colangio-RM (MRCP) o l'ERCP rappresentano lo step diagnostico successivo qualora permanga il sospetto clinico di alterazione biliare nonostante l'ecografia non rilevi alcuna dilatazione. La colangio-RM, quando disponibile, può fornire una valutazione dettagliata dell'albero biliare, che può aiutare l'endoscopista nello stabilire la necessità di intervento. La colangio-RM presenta un'eccellente sensibilità (93-100%) nell'individuazione di stenosi biliari e viene sempre più spesso utilizzata per evitare i rischi connessi all'ERCP o alla colangiografia transepatica percutanea (PTC)⁶³⁻⁶⁴. Comunque ERCP e PTC offrono un vantaggioso potenziale terapeutico nel management delle

stenosi biliari. L'utilità dell'ERCP può essere limitata nel setting ricostruttivo con Roux-en-Y, in cui si preferisce solitamente la colangiografia percutanea (PTC), che tradizionalmente negli altri casi viene utilizzata solo quando l'ERCP abbia fallito. In alcuni centri si utilizza anche l'enteroscopia a doppio pallone per accedere all'albero biliare nei casi di Roux-en-Y⁵⁴.

La scintigrafia con tecnezio ha una sensibilità e specificità rispettivamente del 75 e 100% nell'individuazione delle stenosi biliari. Comunque la sua mancanza di potenziale terapeutico e l'inferiore accuratezza diagnostica rispetto al MRCP ne limitano il suo utilizzo⁶².

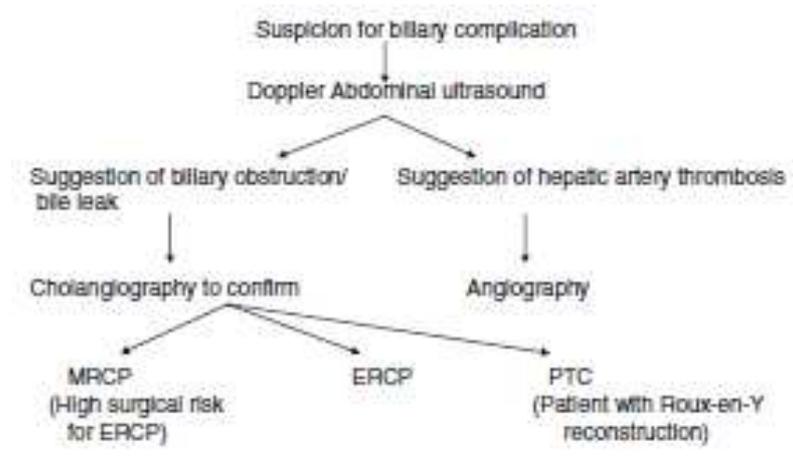


Figura 7 – Algoritmo per il management delle complicanze biliari post-OLTx. PTC, percutaneous cholangiography. La decisione di utilizzare la PTC versus la ERCP dipende dall'expertise del centro⁵⁶

2.4 Prevalenza, timing e management delle complicanze biliari

Classicamente le complicanze biliari post-trapianto di fegato possono essere suddivise in 2 grandi categorie, in base al timing della loro insorgenza: complicanze biliari *precoci* e *tardive*.

Come si può notare nella figura sottostante, l'incidenza delle problematiche biliari è maggiore nei primi 5 mesi dopo trapianto e diventa molto bassa dopo il primo anno, anche se occasionalmente problemi biliari possono presentarsi dopo molti anni.

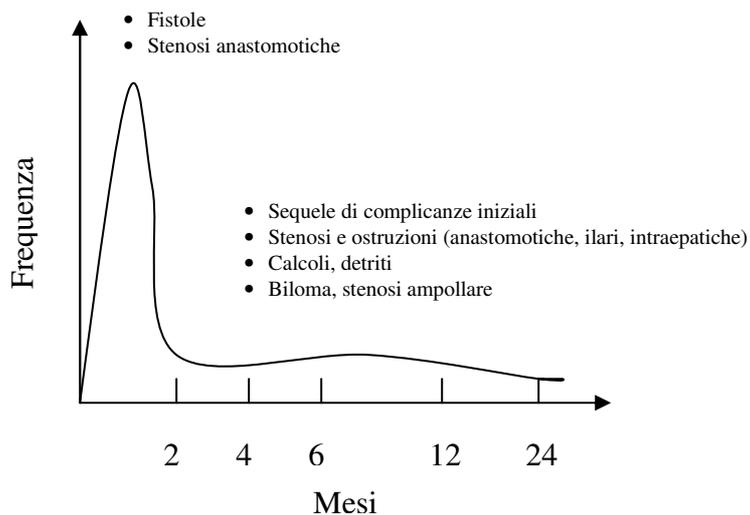


Figura 8 – Relazione tra frequenza e timing di insorgenza delle complicanze biliari dopo trapianto di fegato

Le complicanze precoci sono costituite soprattutto dalle fistole biliari, stenosi anastomotiche e, più raramente, da difetti acuti della vascolarizzazione.

Le complicanze tardive sono costituite soprattutto da stenosi anastomotiche e non (ilari, intraepatiche), calcoli e fango (sludge) biliare, biloma, stenosi ampollare (SDO, Sphincter of Oddi dysfunction) o possono anche essere sequele di complicanze iniziali.

Fistole biliari (leakage)

Le fistole biliari hanno un incidenza del 2-25% post-OLT⁶⁰.

Esse possono essere divise in precoci (entro 4 settimane dal trapianto) o tardive⁶¹.

Le fistole possono originare da: sito anastomotico (sia dal moncone del dotto cistico del donatore che da quello del ricevente), superficie di taglio (in caso di split), sito di uscita del tubo a T (quando utilizzato), deiscenza della Roux en Y, ischemia.

Le fistole che insorgono precocemente solitamente riflettono uno stato ischemico sottostante o problematiche di tecnica chirurgica, mentre quelle tardive tendono a verificarsi successivamente alla rimozione del tubo a T⁶⁵.

La stragrande maggioranza delle fistole sono generalmente secondarie a cause tecniche.

Le fistole anastomotiche sono causate principalmente da necrosi ischemica della porzione finale del dotto biliare (più comunemente il dotto del donatore) o da una anastomosi tecnicamente insoddisfacente e rappresentano la tipologia di fistola di maggiore gravità.

Le fistole biliari non anastomotiche, come per esempio quelle attorno al tubo a T o originate dalla superficie di taglio, hanno meno probabilità di mettere in pericolo il graft o il paziente. Tali tipi di fistole sono spesso contenute e, nella maggior parte dei casi, possono essere gestite con un

drenaggio percutaneo, associato o meno a drenaggio biliare endoscopico e/o sfinterotomia, senza la necessità di una gestione chirurgica⁶⁶. L'evidenza di infezione nei dotti biliari richiede terapia antibiotica in aggiunta al drenaggio.

Anche le fistole biliari anastomotiche piccole e localizzate possono essere trattate con successo senza la chirurgia, attraverso posizionamento di stent (mantenuti in sede per circa 2-3 mesi⁶⁰⁻⁶¹) per via endoscopica o percutanea (nei casi di Roux en Y), purché in assenza di sepsi significativa. Quando, invece, l'anastomosi è seriamente compromessa o lo stravasato biliare è maggiore, il re-intervento chirurgico con revisione è l'approccio indispensabile da utilizzare⁶⁰. Solitamente le fistole sono più comuni nella CCS termino-terminale e la conversione a una CJRY rappresenta l'adeguato trattamento definitivo. In sede di revisione anastomotica, al fine di ottenere un successo a lungo termine, sarà imperativo utilizzare tessuto duttale adeguatamente vascolarizzato. Alcuni pazienti, a causa delle loro condizioni cliniche o di lesioni locali dal lato della fistola, dovrebbero essere trattati unicamente con un drenaggio conservativo permettendo che la fistola biliare si ristabilisca da sola. La maggior parte di questi pazienti sviluppa una stenosi che necessiterà di un intervento successivo quando le condizioni del paziente saranno migliorate e i tessuti locali saranno più favorevoli per una procedura definitiva.

Stenosi biliari (anastomotiche e non)

Le stenosi biliari rappresentano la maggior parte delle complicanze biliari dopo trapianto epatico con un'incidenza del 5-15% dopo trapianto da donatore deceduto (DDLT) e 28-32% dopo trapianto da donatore vivente (LTLT)⁶².

Anche se le stenosi possono svilupparsi in qualsiasi periodo post-OLTx, esse tendono a verificarsi nei primi 5-8 mesi⁶².

Le stenosi biliari possono essere suddivise in anastomotiche (AS, Anastomotic Strictures) e non anastomotiche (NAS, Non Anastomotic Strictures)⁶⁰.

Le stenosi non anastomotiche tendono ad essere multiple, lunghe, localizzate a livello intraepatico o nel dotto biliare del donatore prossimalmente all'anastomosi. Il loro tasso di incidenza varia dal 5% al 15%⁶²⁻⁶⁷⁻⁶⁸ con un tempo medio di insorgenza di 3.3-5.9 mesi post-OLTx⁶⁷⁻⁶⁹.

Le stenosi anastomotiche (AS) tendono a svilupparsi dopo quelle non anastomotiche. Esse sono solitamente più brevi e localizzate al sito anastomotico e la loro incidenza è compresa tra il 4% e il 9%⁶²⁻⁶⁵⁻⁷⁰ (tab. 2).

Biliary strictures	
Anastomotic	Non-anastomotic
Single	Multiple
Short	Long
Anastomosis site	Intrahepatic and proximal to anastomosis

Tabella 2 – Classificazione delle stenosi biliari⁵⁶

Le stenosi non anastomotiche (NAS) possono ulteriormente essere classificate in macroangiopatiche, microangiopatiche e da cause immunologiche (tab.3)⁶²⁻⁷¹.

Le NAS ischemiche si presentano solitamente entro 1 anno dal OLTx, mentre le NAS immunologiche dopo 1 anno dal trapianto⁷²⁻⁷³. A differenza delle AS, le NAS possono esitare nella perdita del graft⁶⁹. Le AS sono generalmente il risultato di fibrosi, ischemia locale, anomalie tecniche o fistola biliare nel periodo post-operatorio⁷⁴⁻⁷⁵.

Macroangiopathic	Microangiopathic	Immunogenic
Hepatic artery thrombosis	Prolonged cold and warm ischemia times	Chronic rejection
	Donation after cardiac death	ABO incompatibility
	Prolonged use of vasopressors in the donor	Primary sclerosing cholangitis
		Autoimmune hepatitis

Tabella 3 – Classificazione delle stenosi biliari^{60-62,71}

Il trattamento endoscopico (mediante ERCP) delle stenosi biliari rappresenta l'approccio di prima scelta. Esso consiste nell'identificazione del sito della stenosi, nell'inserzione di un filo guida attraverso di essa e nella dilatazione meccanica o pneumatica prima del posizionamento di uno stent (v. figura sottostante). Lo stent viene quindi sostituito solitamente con uno stent di dimensioni maggiori ogni 3 mesi, fino a mediamente ad 1 anno, al fine di dilatare la stenosi e prevenire l'ostruzione e la formazione di calcoli⁶². Ove il trattamento endoscopico non abbia esito favorevole, può essere utilizzato l'approccio trans-epatico. Se si sviluppa una anomala funzione epatica o una colestasi in un periodo successivo al trattamento endoscopico, la reinsorgenza della stenosi dovrebbe essere il primo sospetto clinico. La presenza di stenosi biliari multiple, la loro localizzazione periferica e le stenosi di piccole dimensioni limitano l'efficacia dell'intervento endoscopico. Il successo del trattamento endoscopico delle stenosi biliari anastomotiche nel LDLT viene raggiunto solo nel 60-75% rispetto al 80-90% del DDLT⁷⁶⁻⁷⁷⁻⁷⁸. Il tasso di successo endoscopico nel trattamento delle stenosi non anastomotiche nel LDLT è ancora più basso,

attestandosi al 25-33%⁷⁹⁻⁸⁰. Il basso livello di risposta al trattamento endoscopico delle stenosi biliari nel LDLT riflette la complessa ricostruzione biliare con una anastomosi più periferica e dotti biliari più piccoli rispetto al DDLT⁸⁰. Un inadeguato trattamento delle NAS può indurre atrofia lobare, cirrosi biliare e colangiti ripetute. Fino al 50% dei pazienti con NAS richiederà un ritrapianto epatico a causa della perdita del graft o morirà nell'attesa del ritrapianto⁶²⁻⁶⁹.

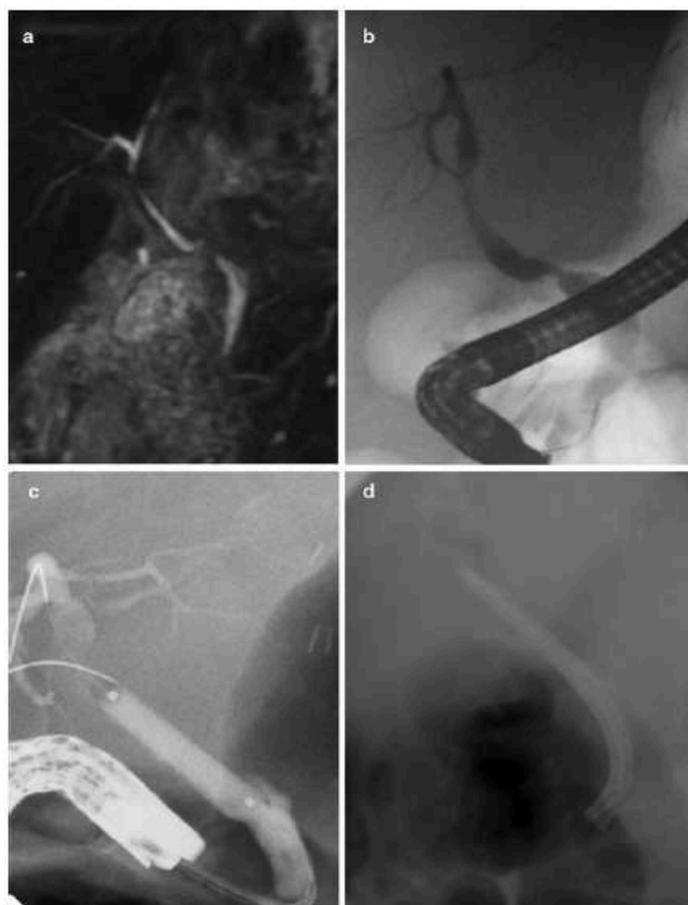


Figura 9 – (a) MRCP che rivela una stenosi anastomotica (AS). (b) ERCP che rivela la medesima stenosi. (c) ERCP con dilatazione pneumatica della AS. (d) ERCP con posizionamento di stent⁵⁶

Difetti di riempimento del dotto biliare comune

I difetti di riempimento del dotto biliare comune sono relativamente frequenti dopo OLTx e includono calcoli biliari, fango (sludge), coaguli sanguigni e concrezioni biliari; i calcoli biliari sono i più frequenti con un'incidenza del 3.3-12.3%⁶⁵⁻⁶⁶⁻⁷⁶.

Stenosi, infezioni batteriche e ischemia possono essere il risultato della formazione di calcoli e sludge biliare⁶⁰⁻⁶¹⁻⁶⁵.

L'ERCP con sfinterotomia e toilette biliare è efficace nel 90-100% dei casi nel liberare la via biliare da calcoli e sludge anche se spesso possono essere necessarie più sedute endoscopiche⁶⁶⁻⁷⁶.

Ci sono diverse teorie riguardanti la formazione delle concrezioni biliari: lo sfaldamento dell'epitelio biliare (a seguito di un prolungato tempo di ischemia fredda o di un'ischemia transitoria o continua), il rigetto cronico, l'infezione, la stasi biliare e l'alterazione della composizione biliare sono tutti stati implicati nella genesi di queste concrezioni⁸¹.

La loro eliminazione risulta spesso indaginoso e richiede ripetute sedute endoscopiche con sfinterotomia, toilette pneumatica o con basket, posizionamento di stent e litotrixxia, dovendo a volte ricorrere alla PTC⁸².

Nell'eventualità di ripetuta formazione di sludge, concrezioni o calcoli biliari occorre considerare la possibilità di un'ischemia sottostante quale fattore eziologico.

SOD (Sphincter of Oddi dysfunction)

La SOD post-OLTx ha un'incidenza del 2-3.5%.

La SOD è una sindrome clinica scarsamente definita e ancora non del tutto compresa. Diverse terminologie, come stenosi papillare, papillite sclerosante, spasmo biliare, discinesia biliare e sindrome post-colecistectomia, sono state utilizzate come sinonimi per definirla e ciò aggiunge ulteriore confusione alla sua caratterizzazione. Per evitare incomprensione, sono stati proposti 2 tipi di SOD sulla base di meccanismi patogenetici, vale a dire stenosi e discinesia. Qualsiasi processo che induca sfaldamento dell'epitelio biliare e infiammazione, come il passaggio di un calcolo attraverso la papilla, la manipolazione intraoperatoria del dotto biliare comune, l'infezione e l'adenomiosi, può portare alla stenosi dello sfintere di Oddi. La discinesia dello sfintere è secondaria a una sua alterazione funzionale che induce un blocco intermittente del flusso biliare. L'eziologia alla base di questo meccanismo non è tuttora chiara, anche se sono stati considerati quali probabili fattori causali l'alterazione ormonale e neuronale che può essere associata alla denervazione del dotto biliare comune nella regione ampollare. La coledocodigiunostomia viene riservata ai casi di fallimento della terapia endoscopica quale terapia chirurgica della SOD.

Biloma

La rottura di dotti biliari e lo stravasamento di bile nel fegato o nella cavità addominale esita nella formazione del cosiddetto "biloma". I piccoli bilomi comunicanti con l'albero biliare possono risolversi spontaneamente. Alcuni comunque richiedono il posizionamento di stent nel dotto biliare

extra-epatico. I bilomi di grandi dimensioni (non comunicanti con l'albero biliare) vengono solitamente trattati con antibioticoterapia e drenaggio percutaneo. Se tali procedure falliscono, si deve ricorrere all'intervento chirurgico di drenaggio del biloma.

Necrosi biliare diffusa

Una rara ma grave complicanza nell'iniziale periodo post-operatorio è la necrosi biliare diffusa secondaria a trombosi arteriosa acuta o incompatibilità di gruppo sanguigno tra il donatore e il ricevente. La manifestazione clinica è di solito caratterizzata dalla combinazione di sepsi, colestasi e fistolizzazione biliare. In tal caso è necessario un ritrapianto d'urgenza.

2.5 Prevenzione delle complicanze biliari

Dal momento che la maggior parte delle complicanze biliari sono correlate a problemi nella tecnica operatoria, occorre agire proprio sull'implementazione dei metodi atti a ridurre errate procedure intraoperatorie. A tal proposito occorre fare alcune considerazioni:

1. la maggior parte dei chirurghi attualmente preferiscono l'anastomosi "duct-to-duct" rispetto ad altri tipi di ricostruzione biliare. L'anastomosi "duct-to-duct" permette la preservazione dello sfintere di Oddi, una minore colonizzazione del tratto biliare, un ridotto tempo operatorio, una più bassa frequenza di leakage biliare e minori anastomosi biliari. Non da ultimo, inoltre, permette un accesso endoscopico alla via biliare.
2. Il mantenimento di un dotto destro adeguatamente vascolarizzato nel LDLT è vitale per la riduzione del rischio di sviluppare stenosi biliari. A tal proposito una attenta dissezione dell'area ilare è fondamentale al fine di assicurare un adeguato apporto sanguigno al dotto biliare del donatore.
3. Infine l'utilizzo di un basso numero di anastomosi biliari, quando possibile, esita in una riduzione del tasso di leakage biliare.

Oltre al miglioramento della tecnica operatoria, di estrema utilità sarebbe un'accurata individuazione dei fattori predisponenti lo sviluppo delle complicanze biliari, al fine di intervenire su di essi per prevenire l'insorgenza di queste pericolose problematiche.

A questo obiettivo, come vedremo, il nostro Centro ha rivolto particolare attenzione, cercando di individuare particolari fattori genetici che possano essere correlati con un aumentato sviluppo di complicanze biliari.

CAPITOLO 3

POLIMORFISMI GENETICI DELLA INTERLEUKINA 28B (IL-28B), HCV E TRAPIANTO EPATICO

3.1 Introduzione

L'epatite C è una forma di epatite causata dal Hepatitis C Virus (HCV). Prima dell'identificazione del virus, avvenuta nel 1989, l'epatite C era definita come "non A non B". Nel soggetto immuno-competente, una volta penetrato nell'epatocita, attraverso alcuni recettori specifici quali il CD 81 e il recettore delle LDL, il virus causa un'epatite acuta che, nella maggior parte dei casi, rimane asintomatica. La risoluzione spontanea dell'infezione e dell'epatite è un evento assai raro, per cui la malattia epatica HCV relata cronicizza nell'80% dei casi. Il decorso della malattia è vario e circa il 30% dei pazienti con epatite cronica sviluppa la cirrosi dopo 20-30 anni dall'infezione. In presenza di cofattori epatotossici quali il consumo di alcolici, la presenza di una steatoepatite o il diabete, l'intervallo di tempo tra l'infezione da HCV e lo sviluppo di cirrosi si accorcia sensibilmente. Un ulteriore fattore importante nel determinare la probabilità di sviluppare cirrosi epatica è l'età nella quale l'infezione da HCV viene contratta: più giovane è l'età nella quale viene contratta l'infezione, minore è la probabilità di sviluppare cirrosi. Questo data è maggiormente evidente nei soggetti di sesso femminile.

Ad oggi più di 170 milioni di persone nel mondo presentano un'infezione cronica HCV, la quale, come già sottolineato, può progressivamente esitare in danno epatico, fibrosi epatica e cirrosi epatica⁸³.

Studi su pazienti con cirrosi HCV relata in Europa e Stati Uniti hanno evidenziato, inoltre, un rischio cumulativo a 5 anni di sviluppare carcinoma epatocellulare (HCC) pari al 17%⁸⁴.

La patologia epatica in fase terminale, così come il carcinoma epatocellulare precoce attribuibile all'epatite C, rappresentano le maggiori indicazioni per il trapianto epatico in occidente⁸⁵.

Per quasi un decennio lo standard di cure per i pazienti con HCV è consistito in un ciclo di 24-28 settimane di PegINF- α 2a o PegINF- α 2b in combinazione con l'analogo guanosinico Ribavirina (RBV). Il Peg-Interferone è un interferone alfa modificato chimicamente con una catena di polietilen-glicole (Peg), che permette di allungarne l'emivita, consentendo una somministrazione settimanale anziché a giorni alterni. Il Peg-Interferone è più attivo dell'interferone standard

nell'inibire il virus HCV, con percentuali di risposta virologica sostenuta (SVR) più alte quando utilizzato nel trattamento dei genotipi 1 e 4 di HCV. La RBV è un farmaco antivirale con attività contro numerosi virus; la RBV da sola ha scarso effetto nei confronti del virus HCV, ma associata all'interferone aumenta la percentuale di SVR di 2-3 volte. La terapia combinata PegIFN- α 2a e RBV presenta tutti i comuni effetti collaterali dell'interferone, quali disturbi respiratori (tosse, dispnea, sintomi influenzali), cutanei (rash, prurito), astenia, nausea e anoressia, insonnia e alterazioni dell'equilibrio tiroideo; l'effetto collaterale più importante e più preoccupante attribuibile alla RBV è quello di una anemia emolitica e la teratogenicità.

La terapia combinata PegIFN- α 2a e RBV induce una SVR nel 42-52% pazienti affetti da HCV di genotipo 1, nel 65-85% dei pazienti con HCV genotipo 4,5 o 6 e nel 76-82% dei pazienti con HCV genotipo 2 o 3⁸⁶⁻⁸⁷.

L'esito della terapia antivirale combinata, quindi, è influenzato dal genotipo virale, ma, come vedremo in seguito, anche da una serie di fattori legati all'ospite, tra cui quelli genetici, dove i protagonisti sono alcuni polimorfismi, in particolare quello del IL-28B.

Nei pazienti che raggiungono una SVR, l'eliminazione del HCV-RNA circolante è duratura nel tempo e pertanto la SVR può essere definito come marcatore di guarigione dell'epatite HCV relata⁸⁸. L'ottenimento della SVR è associato al significativo decremento dei tassi di scompenso della malattia epatica, dello sviluppo di cirrosi epatica e di mortalità per cause epatiche⁸⁹. Nonostante la probabilità di sviluppo di carcinoma epatocellulare (HCC) sia molto ridotto nei pazienti che hanno ottenuto una SVR rispetto a coloro che rimangono positivi al HCV-RNA sierico, esso non è azzerato.

Negli ultimi anni le conoscenze scientifiche hanno permesso da un lato di individuare alcuni importanti predittori indipendenti di ottenimento della SVR con la terapia antivirale tradizionale e di sviluppare nuovi farmaci antivirali dall'altro, due dei quali (Boceprevir e Telaprevir) di prossima immissione in commercio anche in Italia. Tra i fattori predittivi indipendenti l'ottenimento della SVR, i polimorfismi genetici della Interleukina 28B (IL-28B) rappresentano la più sorprendente scoperta recente.

3.2 Fattori predisponenti la risposta alla terapia HCV (virus ed ospite correlati)

Come accennato pocanzi, nell'ultima decade numerosi gruppi internazionali hanno speso grandi energie nel cercare di caratterizzare meglio i fattori determinanti il successo del trattamento antivirale nei pazienti con malattia epatica HCV relata. Attualmente sono stati individuati diversi fattori virali o legati all'ospite, risultati di fondamentale importanza nel predire una risposta virologica favorevole e quindi utili nel processo decisionale terapeutico⁹⁰.

I fattori ospite-relati predisponenti una buona risposta terapeutica includono la giovane età (<40 anni), il sesso femminile, un basso peso corporeo (≤ 75 kg) o un basso BMI (< 30 kg/m²), l'assenza di fibrosi avanzata, steatosi o insulino resistenza, così come un'etnia non africana.

I fattori virali associati all'ottenimento della SVR sono rappresentati dal genotipo HCV non di tipo 1 e a basse concentrazioni basali di HCV-RNA⁹¹⁻⁹²⁻⁹³⁻⁹⁴.

Durante il trattamento farmacologico ulteriori fattori favorevoli sono rappresentati dal tempo in cui l'HCV-RNA sierico diventa non determinabile, denominato risposta virologica rapida (RVR, definita come HCV-RNA non dosabile alla 4° settimana di terapia antivirale) e risposta virologica precoce (EVR, definita come una diminuzione di HCV-RNA $> 2 \log_{10}$ UI/ml rispetto al basale, alla 12° settimana di terapia antivirale)⁹⁵⁻⁹⁶.

3.3 I polimorfismi genetici del IL-28B e la famiglia dell'INF- λ

Nella valutazione dei fattori predisponenti una risposta terapeutica favorevole all'infezione da HCV, un ruolo crescente stanno occupando i fattori genetici correlati all'ospite. A tal proposito di fondamentale importanza sono risultati i polimorfismi genetici della IL-28B, la quale codifica per l'Interferone $\lambda 3$ (INF- $\lambda 3$).

La famiglia INF- λ

L'INF- $\lambda 3$ appartiene alla famiglia degli INF- λ , unitamente all'INF- $\lambda 2$ e INF- $\lambda 3$, che sono codificati rispettivamente dalle Interleukine 29 e 28A.

Gli INF- λ sono catalogati come INF di tipo 3 e rappresentano potenti citokine antivirali endogene. Sebbene strutturalmente la maggior parte siano analoghi ai membri della famiglia del IL-10, dal punto di vista funzionale gli INF- λ sono più simili agli INF di tipo 1⁹⁷; essi comunicano attraverso trasduttori di segnale Jak e attivatori di trascrizione (STAT) intracellulare e up-regolano la trascrizione dei geni stimolati dall'INF (ISGs, INF-stimulated genes) che sono richiesti per il controllo dell'infezione virale.

Gli studi filogenetici degli INF di tipo 1 e di tipo 3 e della famiglia IL-10 indicano l'esistenza di un comune, ancestrale gene INF, che ha distribuito la struttura genomica multi-esone dei membri della famiglia degli INF- λ ; esso fu putativamente identificato nel pesce ancestrale, evoluto in una serie di duplicazioni e trasposizioni genetiche, dando origine agli INF osservati nei mammiferi. Negli esseri umani, i geni dell'INF- λ sono raggruppati nel cromosoma 19 (Figura 13)⁹⁸.

Gli INF- λ inibiscono la replicazione di HCV in vitro⁹⁹⁻¹⁰⁰⁻¹⁰¹ e trials clinici che hanno utilizzato l'INF- $\lambda 1$ in pazienti con infezioni croniche HCV relate, hanno evidenziato risultati promettenti¹⁰²;

l'86% dei pazienti "naive" che hanno ricevuto il trattamento combinato INF- λ pegilato (PegINF- λ) e Ribavirina (RBV) per 4 settimane hanno avuto una diminuzione di HCV-RNA $> 2 \log_{10}$ UI/ml per 4 settimane.

Variazioni nel genoma umano (polimorfismi genetici, SNP) e loro implicazioni

Il genoma umano contiene più di 3.3 miliardi di coppie di basi. Circa 10 milioni di queste possono variare nella sequenza nucleotidica tra gli individui (polimorfismo a singolo nucleotide o SNP). Alcune di queste variazioni possono esitare in un'alterata espressione genica, un'alterata processazione del prodotto genico (modificazione post-traslazionale) o un'alterata attività funzionale (per esempio il legame con il recettore). L'individuazione dei polimorfismi che esitano in un'alterata espressione clinica (fenotipo) rappresenta una delle recenti modalità utilizzate per valutare l'esistenza di una associazione tra la presenza o meno di alcuni SNPs e l'outcome di una patologia, attraverso gli studi definiti "genome wide association" (GWAS)¹⁰³.

Le SNPs variano all'interno della regione di un cromosoma (o blocco aplotipico) in un modo non casuale. Nelle popolazioni, l'associazione non casuale di SNPs viene indicato come "linkage disequilibrium"¹⁰⁴.

Grazie al linkage disequilibrium, i ricercatori possono saggiare un numero limitato di SNPs (i cosiddetti "tag SNPs"), ma valutare comuni variazioni lungo il 90% del genoma¹⁰⁵. Utilizzando la tecnologia a microarray sui chips o beads in commercio, si possono testare più di 1 milione di "tag SNPs" in un qualsiasi campione di DNA (Figura 10).

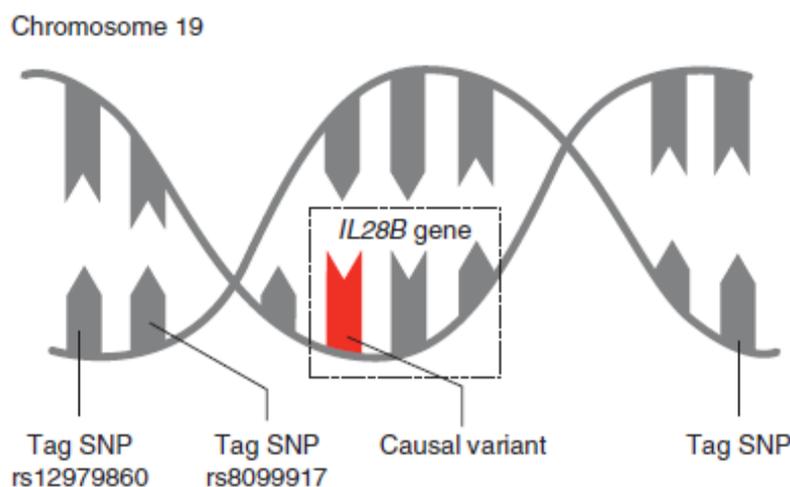


Figura 10 – Il principio del saggio dei tag SNPs. I tag SNP (evidenziati in grigio) sono utilizzati come markers per campionare un blocco aplo tipico. Il tag SNP è rappresentativo delle varianti comuni all’interno di questo blocco, le quali sono associate attraverso linkage disequilibrium. La variante causale (evidenziata in rosso) viene identificata raramente. In questo schema viene mostrato il gene IL-28B sul cromosoma 19. I tag SNPs sono usati su SNP chips disponibili in commercio; centinaia di migliaia di tag SNPs su un chip vengono usate per individuare più di 10.000.000 di varianti comuni riconosciute sul genoma umano. Come evidenziato in figura, ci possono essere multiple tag SNPs associate con un gene, le quali spesso si trovano distanti alcuni kb e non solo pochi nucleotidi

L’obiettivo di uno studio sui polimorfismi genetici è inizialmente quello di identificare le aree genetiche di interesse (“flags”). La variante genetica causale di una determinata malattia viene identificata raramente. Quindi gli studi GWAS usano le tecniche del campionamento genetico e quelle bioinformatiche per testare con probabilità statistica l’associazione di un particolare genotipo con un particolare fenotipo senza che il campionamento venga condizionato da ipotesi eziopatogenetiche predeterminate.

3.4 Ruolo dei polimorfismi genetici del IL-28B nell’infezione HCV genotipo 1

Oltre ai fattori favorevoli di risposta alla terapia antivirale dell’infezione da HCV valutati al paragrafo 3.2, gli studi GWAS hanno apportato un importante contributo con la scoperta dei polimorfismi genetici situati sul gene che codifica per l’IL-28B¹⁰⁶⁻¹⁰⁷⁻¹⁰⁸⁻¹⁰⁹ (Figura 13).

I primi dati della letteratura sono stati ottenuti da un ampio studio GWAS pubblicato su Nature nel 2009¹⁰⁶ con il test di genotipizzazione del IL-28B, consentendo di caratterizzare il polimorfismo di uno SNP (Short Nucleotide Polymorphism) in posizione “rs12979860”. Il polimorfismo C>T è localizzato nella sequenza del promotore, a monte del gene umano che codifica per la citochina “Interleukina B” (IL-28B SNP rs12979860), sul cromosoma 19 (- location 19q13.13).

L'espressione di questo gene, unitamente ad altre due citokine (IL28A ed IL29), è indotta ed attivata dalle infezioni virali. Il gene codifica per la proteina INF- λ 3.

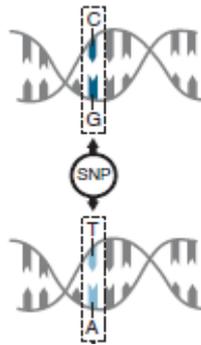


Figura 11 – SNP a livello del gene IL-28B sul cromosoma 19 con sostituzione C/T nella sequenza del promotore

Il test di genotipizzazione consente la differenziazione dei seguenti genotipi: omozigote (C/C), eterozigote (C/T), omozigote (T/T) i quali si sono dimostrati essere utilizzabili in ambito clinico al fine di personalizzare ed ottimizzare la somministrazione dei farmaci anti-HCV. Il polimorfismo non solo influenza fortemente la SVR all'interno di ciascuno dei principali gruppi di pazienti ma sembra anche spiegare molte delle differenze di risposta al trattamento antivirale osservate tra diversi gruppi etnici di popolazione (europei-americani rispetto ad afro-americani).

Si è evidenziato che i pazienti che possiedono il genotipo C/C hanno un tasso di SVR maggiore di due/tre volte rispetto a quello dei pazienti con genotipo T/T.

Questo SNP rs12979860, infatti, risulta essere fortemente associato con la SVR in tutti i gruppi di pazienti; in particolare nella popolazione europea-americana e asiatica dove la prevalenza del genotipo C/C è maggiore rispetto a quanto osservabile nella popolazione africana.

Si stima che metà delle differenze nella SVR tra le diverse popolazioni possono essere riconducibili alle differenze di frequenza dell'allele C tra pazienti afro-americani e pazienti di origine ancestrale europea. E' inoltre risultato interessante che pazienti provenienti dall'est asiatico abbiano valori più alti di SVR rispetto a pazienti europei. Studiando un campione random di popolazione di varie etnie senza distinzioni circa lo stato dei pazienti rispetto ad una infezione da HCV, è stata osservata una maggiore frequenza dell'allele C in pazienti provenienti dall'Asia orientale.

Di estrema rilevanza è stato anche notare che pazienti afro-americani con il genotipo C/C hanno un valore di risposta molto più alto rispetto ad individui di origine ancestrale europea con genotipo TT; questo fatto sottolinea la grande importanza del genotipo individuale rispetto all'etnia di appartenenza per predire la risposta al trattamento. In pratica il genotipo individuale è fondamentale non solo all'interno della stessa etnia, ma anche indipendentemente da essa.

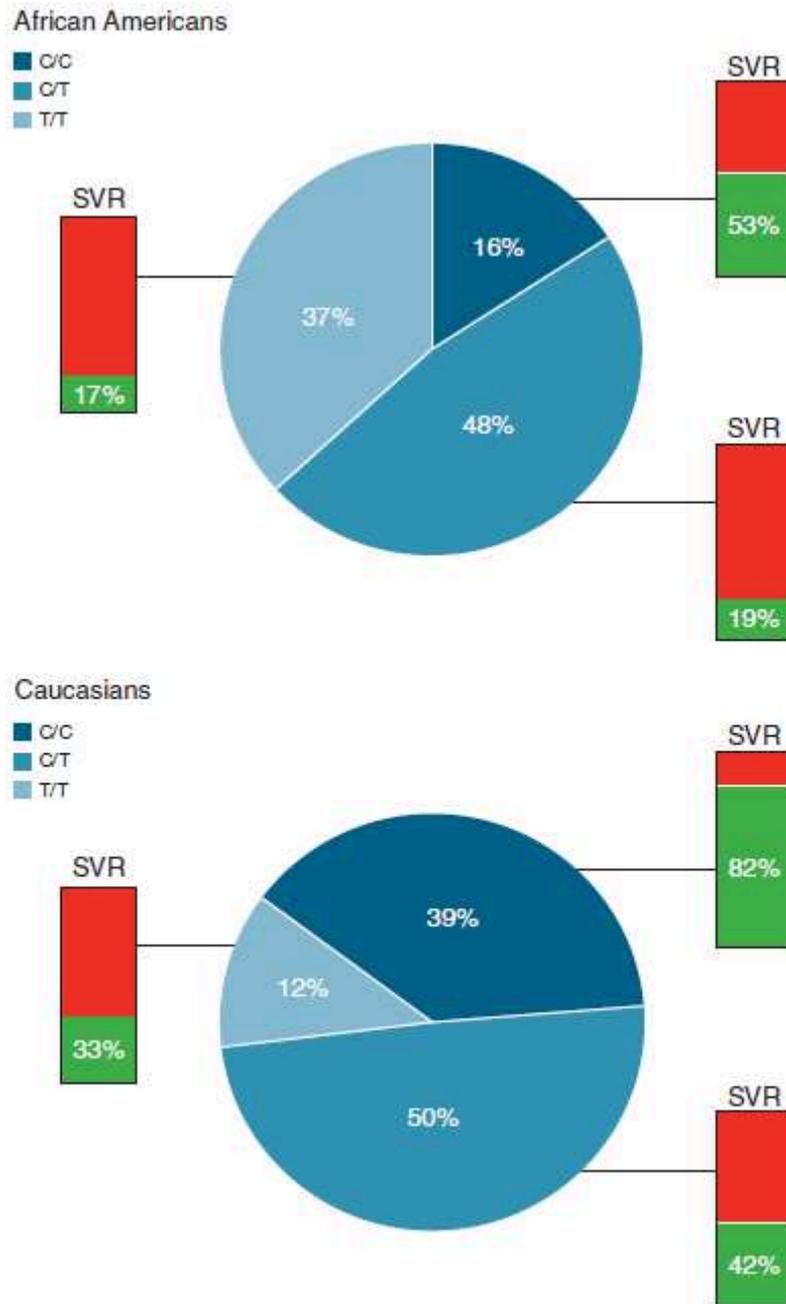


Figura 12 – Tassi di risposta virologica sostenuta (SVR) in relazione al genotipo IL-28B per gli afro-americani (sopra) e i caucasici (sotto)¹⁰⁶. Per ogni gruppo etnico, nel cerchio centrale in blu viene evidenziata la proporzione di pazienti con il genotipo favorevole IL-28B C/C e i genotipi meno favorevoli C/T e T/T. Per ciascuno di questi gruppi, i tassi di SVR sono indicati nei corrispondenti riquadri a fianco. Il tasso di SVR è evidenziato in verde. Come si può notare, i pazienti con genotipo IL-28B C/C hanno i tassi di SVR più elevati¹¹⁰

Si è poi cercato di valutare se questo polimorfismo genetico potesse influenzare la carica virale basale (prima del trattamento): si è riscontrata una significativa associazione in tutti i gruppi; in particolare, l'allele C, associato ad una migliore risposta al trattamento, è correlato ad una carica

virale basale più elevata. Sembra plausibile che il polimorfismo della IL-28B abbia un ruolo nella espressione intra-epatica del gene stimolato da IFN, con conseguenze sia per la carica virale, che per la risposta al trattamento farmacologico.

Non sono state individuate associazioni tra il polimorfismo e il valore soglia della carica virale che solitamente si utilizza per predire la risposta al trattamento; l'associazione tra il polimorfismo e la risposta virologica sostenuta sembra essere indipendente dal valore della carica virale.

Si è notato, inoltre, che la frequenza dell'allele C è significativamente ridotta in coorti cronicamente infette da HCV rispetto ad individui di controllo della stessa etnia: ciò sembra suggerire che ci sia un'associazione tra l'allele C e un valore più alto di risposta virologica sostenuta all'epatite C.

Vari studi¹⁰⁶⁻¹¹⁴ indicano come questo polimorfismo genetico sia anche fortemente associato ad una maggiore probabilità di clearance virale spontanea a seguito di una infezione acuta da HCV.

Dalle evidenze della letteratura, il polimorfismo genetico rs12979860 della IL-28B sembra essere, quindi, il più adatto marker predittivo circa l'esito della terapia anti-HCV, anche per l'HCV di genotipo 1, permettendo potenzialmente di dividere i pazienti in due gruppi: quello con un genotipo favorevole alla risposta alla terapia standard, che dovrà essere personalizzata in termini di durata, e quello con genotipo meno favorevole a tale risposta in cui la decisione di somministrare la terapia standard dovrà essere valutata in base anche al potenziale impiego dei farmaci antivirali emergenti.

Predittori significativi per l'ottenimento della SVR, come già evidenziato al paragrafo 3.2, includono fattori clinici legati al paziente (età, sesso, diabete, conta piastrinica, livelli di emoglobina, livelli di GTP), genotipo virale, fattori virali (sostituzioni nel core proteico in posizione 70 e 91 e nelle ISDR).

Considerando, infine, i fattori coinvolti in una variazione della carica virale si è visto che il genotipo CC per rs12979860 e il core 70 wild-type si sono mostrati essere significativamente associati al decadimento della carica virale mentre in pazienti portatori di genotipi C/T o T/T, la carica virale non subisce variazioni quantitative significative (indipendentemente dalle sostituzioni al core70). Al contrario, ISDR non è risultato essere un predittore significativo in soggetti portatori del genotipo rs12979860 C/C mentre i soggetti portatori dei genotipi C/T o T/T e con 2 o più sostituzioni nella regione ISDR hanno mostrato un declino virale significativo dopo 4 settimane rispetto a quelli senza alcuna sostituzione.

In conclusione la genotipizzazione del IL-28B può aiutare il clinico nella determinazione del tipo e della durata della terapia antivirale nei pazienti con infezione cronica da HCV, potendo selezionare i pazienti con maggiore probabilità di ottenere una SVR utilizzando l'attuale terapia di combinazione con PEG-IFN e RBV. L'ottenimento della SVR è associato ad una riduzione della mortalità per cause epatiche e ad una riduzione di incidenza del HCC¹¹¹).

Il ruolo dei polimorfismi genetici della IL-28B è stato confermato in diverse coorti di pazienti che comprendevano anche infezioni da HCV di genotipi 2 o 3 (anche se con minori evidenze)¹¹²⁻¹¹³⁻¹¹⁴, mentre ancora pochi sono i dati relativi all’impatto dei polimorfismi genetici della IL-28B in pazienti con caratteristiche particolari quali e di più difficile gestione terapeutica, quali i soggetti con infezione HIV o i trapiantati epatici HCV positivi¹¹⁵⁻¹¹⁶⁻¹¹⁷⁻¹¹⁸.

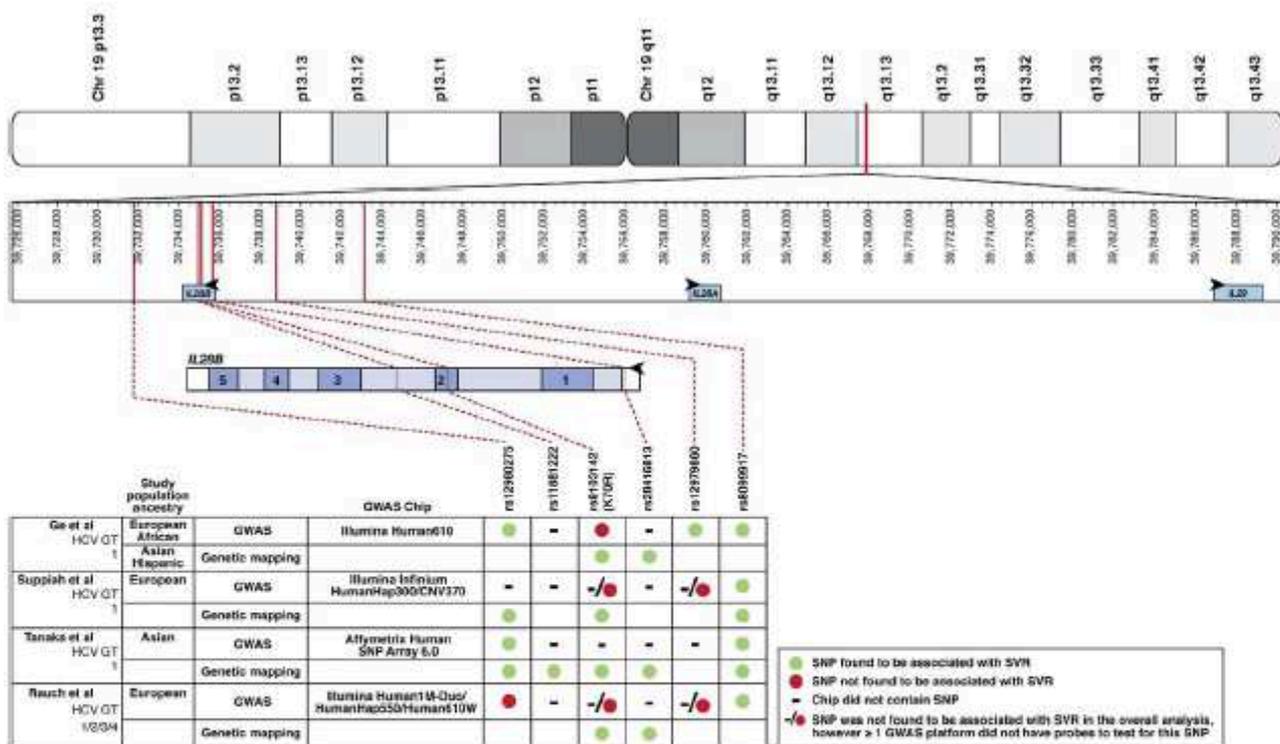


Figura 13 – SNPs nel cluster genico IFN-λ associato con il controllo del HCV. Il cluster genico IFN-λ è evidenziato nel riquadro superiore, indicando la sua posizione nel cromosoma 19. Nel secondo riquadro, vengono mostrate le posizioni degli SNPs più rilevanti, corrispondenti ai dati di letteratura, in relazione al cluster genico IFN-λ. Il gene IL-28B è all’inizio e con orientamento inverso rispetto IL28A. Il terzo riquadro evidenzia la struttura genica del IL-28B, con i suoi 5 esoni, gli introni intercorrenti e le regioni di regolazione. Le linee verticali denotano la posizione degli SNPs che sono associate con la risposta al trattamento HCV e sono collegati con linee tratteggiate alla tabella adiacente. L’unico SNP che si trova in una regione codificante codifica K70R; esso causa un polimorfismo A>G sul filamento codificante negativo e un polimorfismo T>C sul filamento codificante positivo. Il pannello più in basso mostra quali SNPs sono stati associati con la risposta al trattamento in ciascuno degli studi indicati, compresi quelli trovati da studi di mappaggio genico. Come indicato in legenda, i simboli stanno ad indicare se un dato SNP è associato con SVR in ciascuno dei 4 GWAS e studi di mappaggio genico¹¹⁹

3.5 Ruolo dei polimorfismi genetici del IL-28B in altri ambiti clinici: HCV genotipi non 1, infezione HIV, trapianto epatico

HCV genotipi non-1

Rauch et al.¹¹⁴ sono stati i primi a considerare la relazione tra i genotipi HCV 2/3 e i polimorfismi del IL-28B, includendo 230 pazienti nel loro studio GWAS, nel quale veniva valutato il loro impatto nella risposta al trattamento con PEG-INF. Essi non hanno osservato alcuna associazione significativa tra l'IL-28B e gli outcomes del trattamento. Il primo studio a considerare l'associazione tra il genotipo del IL-28B e la clearance virale indotta dal trattamento antivirale nei pazienti HCV di genotipo 2 e 3 ha preso in considerazione una coorte italiana di pazienti che era stata trattata con PEG-INF e RBV per un tempo variabile (n=268)¹²⁰. Mentre il polimorfismo del IL-28B è stato associato con l'ottenimento della SVR (tasso di SVR secondo il genotipo rs12979860: CC 82% vs CT 75% vs TT 58%, OR=1.76, P=0.008), la sua maggiore utilità è stata osservata nei pazienti che non ottenevano una RVR (24 settimane di terapia, SVR=CC 87% vs CT 67% vs TT 29%, OR=4.0, P=0.0002)¹¹².

Diversi studi successivi hanno dimostrato un'associazione tra il genotipo IL-28B e la RVR nei pazienti con HCV di genotipo 2/3. Complessivamente, non tutti gli studi hanno dimostrato una associazione significativa tra i genotipi della IL-28B e l'ottenimento di una SVR nei pazienti con infezione da HCV sostenuta dai genotipi 2 e 3, probabilmente perché in questa tipologia di infezioni la SVR è comunque molto elevata a fronte di una notevole sensibilità di questi genotipi virali all'azione combinata di PEG-IFN e RBV¹²¹⁻¹²²⁻¹²³⁻¹²⁴. Le differenze riguardanti le popolazioni in studio (etnia, proporzione relativa di HCV tipo 2:3) e gli schemi di trattamento (durata variabile, dose di RBV) rendono questi studi retrospettivi difficili da confrontare. Ciò che emerge chiaramente è che in questi genotipi di HCV molto sensibili all'INF, l'effetto assoluto del genotipo IL-28B sui tassi di SVR è meno marcato rispetto quanto osservabile nel genotipo 1. Saranno, quindi necessari, studi prospettici più lunghi per definire il ruolo clinico della genotipizzazione IL-28B per questi pazienti¹²⁵.

Ci sono pochi dati riguardanti il ruolo del IL-28B in altri genotipi di HCV. Il polimorfismo del IL-28B sembra essere rilevante nella terapia con PEG-INF per l'HCV di genotipo 4¹¹⁴⁻¹²⁶, con un effetto simile a quello osservato nel HCV di genotipo 1. In un recente piccolo studio di trattamento con PEG-INF e RBV su pazienti cinesi con HCV di genotipo 6, 23/24 pazienti che ottennero una SVR erano portatori del genotipo C/C; solo 1 paziente aveva un genotipo correlato alla cattiva risposta e questo paziente è risultato essere un relapser dopo 48 settimane di trattamento. La

relazione tra il genotipo della IL-28B e la risposta al trattamento nel HCV di genotipo 6, comunque, non è ancora chiara¹²⁷.

Implicazioni cliniche: la genotipizzazione del IL-28B è meno rilevante nel trattamento della infezione da HCV di genotipo 2/3 e per il momento non dovrebbe essere eseguita routinariamente, ma riservata per protocolli sperimentali. Sarà particolarmente importante ricercare la rilevanza dei polimorfismi del IL-28B nei pazienti con HCV di genotipo 3 con altre caratteristiche di risposta sfavorevole all'INF, quali la cirrosi e il mancato ottenimento della RVR, dove il genotipo IL-28B potrebbe essere rilevante nella decisione di estendere la terapia da 24 a 48 settimane. Ciò dovrebbe essere valutato con studi prospettici. Per l'HCV di genotipo 4, il polimorfismo della IL-28B sembra avere un'utilità clinica simile a quella osservata nel HCV di genotipo 1¹²⁵.

Confezione HIV/HCV

L'associazione tra la risposta al trattamento con PEGINF e RBV e il genotipo della IL-28B nei pazienti HCV monoinfetti è stata replicata nell'ambito della confezione HIV/HCV. In uno studio genetico retrospettivo su pazienti spagnoli con confezione HIV/HCV, il genotipo C/C della IL-28B è stato associato con elevati tassi di SVR rispetto a quanto osservato per i genotipi C/T e T/T. (percentuali di SVR rispettivamente del 75% vs 38%, $P < 0.0001$)¹²⁶. Il polimorfismo della IL-28B è rimasto un significativo fattore predittivo indipendente di SVR anche dopo la correzione di altri importanti fattori clinici, quali il genotipo di HCV, la concentrazione di HCV RNA, l'assenza di fibrosi¹²⁶ ed i livelli sierici di lipoproteina LDL¹²⁸. Simili riscontri sono stati riportati in altre coorti di pazienti con confezione HIV/HCV¹²⁹⁻¹³⁰⁻¹³¹. Il polimorfismo genetico della IL-28B è stato associato inoltre con un'aumentata cinetica virale di fase I come si osserva durante il trattamento dei pazienti HCV monoinfetti¹³²⁻¹³³. La forza di associazione varia anche secondo il genotipo HCV, dove un effetto forte si vede nel HCV genotipo 1/4, ma è più debole nel genotipo 2/3. La confezione HIV non sembra modulare l'associazione tra il polimorfismo del IL-28B e la clearance spontanea con simili odds ratios per la clearance spontanea confrontata con i pazienti HCV monoinfetti¹⁰⁸⁻¹¹⁴. Anche se molto rilevante per l'outcome dell'infezione da HCV, il genotipo della IL-28B sembra non avere alcun impatto sugli outcome dell'infezione da HIV¹³⁴⁻¹³⁵.

IL-28B e trapianto epatico

Il decorso clinico dell'infezione da HCV dopo trapianto epatico, definita come epatite ricorrente da HCV del graft, è generalmente maggiormente aggressivo rispetto a quanto osservabile nei pazienti immuno-competenti. Dopo 5 anni dal trapianto epatico circa il 30% dei pazienti presenta una cirrosi

del graft, la quale è associata ad una elevata probabilità di scompenso della malattia con conseguente perdita del graft e del paziente, in assenza di ritrapianto. Per queste motivazioni la sopravvivenza nel medio e lungo termine dei riceventi HCV positivi è significativamente inferiore rispetto a quanto osservato per le altre indicazioni al trapianto di fegato. Il trattamento dell'infezione da HCV post-OLTx è reso difficoltoso dalla necessità di continuare le terapie immunosoppressive, dal rischio di rigetto del graft, dall'interazione dei farmaci antivirali con quelli immunosoppressori, dall'aumentato rischio di tossicità, in particolare la pancitopenia, che inducono più alti tassi di interruzione e modificazione della dose. Tutte queste problematiche contribuiscono ad un ridotto tasso di SVR¹³⁶⁻¹³⁷. La terapia con antivirali specifici nel setting post-OLTx non è ancora stata validata ed è probabile che siano necessari alcuni anni prima che possa essere applicata. La valutazione della predizione di risposta al trattamento con PEG-INF e RBV nel trapiantato epatico assume, quindi, particolare interesse al fine di coadiuvare le decisioni terapeutiche e anche, potenzialmente, guidare le decisioni riguardanti l'andamento post-trapianto.

A tal proposito recentemente si è visto che il genotipo della IL-28B sia del donatore che del ricevente sono associati significativamente con l'outcome del trattamento antivirale nel post-OLTx,¹³⁸⁻¹³⁹⁻¹⁴⁰⁻¹⁴¹. I dati indicano che un ricevente con un genotipo della IL-28B sfavorevole che riceve un fegato con genotipo della IL-28B sfavorevole ha poche possibilità di rispondere alla terapia antivirale. I tassi di risposta migliorano quando il ricevente o il donatore presentano un polimorfismo correlato a buona risposta al trattamento e sono ancor più alti se sia il ricevente che il donatore sono portatori del polimorfismo C/C della IL-28B. In uno studio retrospettivo di 61 pazienti della Mayo Clinic, i tassi di SVR erano solo del 16% se ricevente e donatore presentavano la variante di IL-28B correlata a cattiva risposta, aumentando al 42-50% nel momento in cui o il ricevente o il donatore presentava la variante di buona risposta, sino ad arrivare all'86% (6/7 pazienti) quando entrambi avevano la variante allelica favorevole¹³⁹.

L'associazione dello status IL-28B con altri outcomes post-trapianto è meno chiara. Charlton et. al. hanno osservato un'associazione tra il genotipo della IL-28B e un endpoint composto di fibrosi epatica ≥ 2 e mortalità correlata al ritrapianto. Includendo tutti questi fattori, l'endpoint combinato dello studio è stato raggiunto con una percentuale significativamente più bassa nei casi in cui sia il donatore che il ricevente erano portatori del genotipo favorevole rispetto ai casi nei quali i pazienti erano portatori omozigoti della variante sfavorevole¹³⁹. Comunque, né il genotipo della IL-28B del ricevente né quello del donatore erano associati ad una sopravvivenza del graft a 5 anni o ad una mortalità correlata al fegato trapiantato.

In un altro studio tedesco, Eurich et al. hanno valutato l'associazione del polimorfismo genetico della IL-28B con gli outcomes istologici in 183 pazienti con epatite ricorrente da HCV¹⁴¹. In 605

biopsie epatiche, le varianti sfavorevoli (rs8099917, GT/GG) erano associate con un più alto grado di attività infiammatoria un più alto livello di alanina-aminotransferasi (ALT) sierico nel tempo. Tuttavia, nessuna relazione fu osservata tra il polimorfismo della IL-28B e lo stato di fibrosi, o lo sviluppo di rigetto cellulare acuto post-OLTx.

I dati osservati hanno delle potenziali implicazioni cliniche. La ricorrenza di HCV post-trapianto è aggressiva e associata con la perdita del graft. L'eradicazione virale si è dimostrata essere significativamente associata alla riduzione di perdita del graft, ma il trattamento antivirale è più complicato rispetto al setting del non-trapianto. Sfortunatamente le coorti di pazienti trapiantati tendono a selezionare genotipi della IL-28B non favorevoli in quanto derivano da pazienti quasi sempre non-responders alla terapia antivirale che quindi hanno presentato una progressione della malattia epatica sino alla cirrosi scompensata e allo sviluppo di HCC^{139,140}.

La conoscenza del genotipo della IL-28B del ricevente e/o del donatore potrebbero essere utili tuttavia per selezionare i pazienti candidati al trattamento con PEG-INF e RBV che presentano una maggiore probabilità di ottenere una SVR.

Un'interessante questione riguarda sapere se il graft con genotipo di IL-28B favorevole debba o possa essere trapiantato preferenzialmente a riceventi con genotipo di IL-28B sfavorevole, ma ciò porrebbe grosse difficoltà logistiche e forse etiche nel processo di distribuzione degli organi.

CAPITOLO 4

PROGETTO DI STUDIO

4.1 Scopo dello studio

Come evidenziato nel paragrafo 3.5, ultimamente sono state acquisite alcune importanti conoscenze sulle relazioni tra i polimorfismi genetici della IL-28B nel contesto della risposta alla terapia antivirale nella epatite ricorrente da HCV e nello sviluppo di rigetto cellulare acuto dopo trapianto epatico. Non esistono ad oggi dati sul ruolo dei polimorfismi genetici della IL-28B e ulteriori complicanze del trapianto epatico non solo nei pazienti HCV positivi ma anche per le altre indicazioni trapiantologiche.

Lo scopo del nostro studio è stato quindi quello di valutare il potenziale impatto dei polimorfismi genetici della IL-28B nello sviluppo di complicanze biliari nel post trapianto epatico.

4.2 Materiali e metodi

Pazienti. Sono stati arruolati in questo studio retrospettivo 174 pazienti consecutivi sottoposti a trapianto ortotopico di fegato presso il Centro Trapianti dell'Università di Udine a partire dal 1 gennaio 2004 fino al 30 novembre 2010. I dati sono stati raccolti esaminando le singole cartelle cliniche dei pazienti estratte dal database del Centro Trapianti. Il criterio di inclusione nello studio è stato l'aver un follow-up clinico, laboratoristico e strumentale post trapianto di almeno 30 giorni. Sono stati inclusi nello studio sia i pazienti nei quali l'anastomosi biliare è stata effettuata mediante coledoco-coledoco termino-terminale sia coloro nei quali l'anastomosi è stata effettuata mediante coledocodigiunostomia con ansa alla Roux o mediante posizionamento del tubo a T di Kehr. In quest'ultima categoria di pazienti il tubo di Kehr è stato rimosso a circa 3 mesi dal trapianto, durante l'esecuzione di una ERCP seguita dal posizionamento di uno stent biliare per ridurre la probabilità di sviluppare un eventuale leakage biliare. Sono stati esclusi dallo studio i pazienti con coinfezione da HIV e i pazienti sottoposti a trapianto da donatore vivente.

Sono stati analizzati i risultati di tutti gli esami inerenti alle procedure diagnostiche e terapeutiche sulle vie biliari quali la colangiopancreatografia retrograda endoscopica (ERCP), la colangiografia percutanea o trans-Kehr. Tali procedure sono state richieste a discrezione del medico chirurgo o

dell'epatologo, nel sospetto clinico di una stenosi della via biliare, di un leakage biliare o in presenza di una sindrome colestatica di sospetta natura ostruttivo-meccanica.

Durante il follow-up, la presenza di una stenosi anastomotica della via biliare è stata definita come una lesione ostruttiva a livello dell'anastomosi biliare, riscontrata attraverso un'indagine colangiografica e che abbia richiesto un intervento terapeutico come la dilatazione endoscopica, il posizionamento o la sostituzione di uno stent biliare precedentemente inserito. Il riscontro di una disparità di calibro fra la via biliare del donatore e del ricevente, in assenza di segni biochimici di colestasi, non è stata considerata sufficiente a definire la presenza di una stenosi biliare. Le stenosi biliari non anastomotiche ed il leakage biliare non sono stati incluse nell'analisi.

Terapia immunosoppressiva. Tutti i pazienti sono stati mantenuti in terapia immunosoppressiva utilizzando come farmaco principale o la Ciclosporina (N. = 55) o il Tacrolimus (N. = 119), associati durante i primi 3-6 mesi post trapianto ai corticosteroidi. La posologia della Ciclosporina è stata calcolata in modo da mantenere una concentrazione plasmatica pre-dose compresa tra 250 e 350 µg/L durante le prime 6 settimane e quindi compresa tra 50 ai 150 µg/L successivamente. Il dosaggio del Tacrolimus è stato calcolato al fine di mantenere una concentrazione plasmatica pre-dose del farmaco compresa tra 10 e 15 µg/L durante le prime 6 settimane e tra 5 e 10 µg/L successivamente. La terapia con corticosteroidi è stata avviata durante la fase operatoria con la somministrazione di un bolo e.v. di 500 mg di metilprednisolone, seguito da 250 mg in seconda e terza giornata post operatoria. A partire dalla quarta giornata è stata somministrata una dose quotidiana di 40 mg di prednisone per os che è quindi stata scalata e sospesa a circa 4 mesi dal trapianto. In 24 pazienti è stato applicato un protocollo di immunosoppressione senza l'utilizzo di steroidi.

Per la preservazione del graft sono state utilizzate due soluzioni: quella dell'Università del Wisconsin (UW) e la Celsior. I graft sono stati prelevati in tutti i casi da donatori deceduti ma a cuore battente.

ERCP. Dopo aver posto il sospetto clinico, laboratoristico e radiologico di una complicanza biliare, il paziente è stato sottoposto ad ERCP. Si è proceduto quindi ad una esofagogastroduodenoscopia con endoscopio a visione laterale sino al raggiungimento della papilla di Vater, proseguendo con l'incannulazione della stessa e la contrastografia della via biliare al fine di caratterizzare adeguatamente il tipo di complicanza. Successivamente, a seconda del tipo di problematica biliare, si è provveduto alla papillosfinterotomia (utilizzando papillotomo ad arco o ad ago) con posizionamento di stents (singoli o multipli), dilatazione (meccanica o pneumatica) e contemporanea toilette della via biliare per poi concludere con una contrastografia finale che

valutasse il buon esito delle procedure effettuate attraverso l'evidenza del ripristino di un valido flusso bilio-enterico.

Determinazione del polimorfismo genetico rs12979860 C/T del gene della IL-28B. La determinazione del polimorfismo rs12979860 C/T del gene del IL-28B è stata effettuata mediante la tecnica di “polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism assay”. Il DNA è stato estratto da campioni di sangue intero raccolti e stoccati a -80°C al momento dell'immissione in lista attiva di trapianto epatico in ciascun paziente arruolato nello studio, utilizzando il QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Milano, Italy). Un frammento di 242 coppie di basi (bp) è stato ottenuto utilizzando la seguente coppia di primers 5'-GCTTATCGCATACGGCTAGG-3', 5'-AGGCTCAGGGTCAATCACAG-3', disegnata utilizzando la NCBI Primer-Blast Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). L'amplificazione mediante PCR è stata effettuata in un volume totale di 10 µL contenenti 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, Tween-20 0.01%, 0.2 mM deoxyribonucleotides, 2-4 pmol di ciascun primer, 2 mM MgCl₂ e 0.5 units hot-start Taq DNA polymerase (@Taq, Euroclone, Milan, Italy). I campioni contenenti 10 ng di DNA genomico sono stati quindi sottoposti a 40 cicli di denaturazione (a 95°C per 30 s), “annealing” (a 62°C per 30 s) ad elongazione (a 72°C per 30 s) utilizzando una Techne TC-512 thermal cycler. In un volume totale di 20 µL di miscela di reazione, 10 µL dell'amplicone sono stati sottoposti a digestione enzimatica utilizzando 1 U dell'enzima di restrizione BstU-I (New England Biolabs, Hitchin, UK) a 60°C. I frammenti sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3.5% e quindi colorati con bromuro di etidio e rivelati al transilluminatore.

Analisi statistica. Le variabili categoriche sono state presentate come frequenze, le variabili continue come mediane e varianze. Il Pearson chi-square test e il Chi-square test for linear trend, quando appropriato, sono stati utilizzati per lo studio dei predittori di stenosi anastomotica. Per questa analisi le variabili continue sono state considerate come categoriche.

La regressione logistica in step-wise è stata utilizzata per verificare i fattori predittivi indipendenti associati allo sviluppo di stenosi anastomotica della via biliare. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software statistico MedCalc (MedCalc statistical software, Belgium). Le associazioni statistiche con un valore di $P < 0.05$ sono state considerate significative.

4.3 Risultati

Caratteristiche demografiche ed eventi clinici. Le principali caratteristiche cliniche e demografiche della popolazione studiata sono illustrate nella Tabella 4. L'età mediana dei riceventi è stata di 56 anni e il sesso prevalente è stato quello maschile (78.2%); l'età media dei donatori è

stata di 51 anni ed il sesso prevalente anche in questo caso è stato quello maschile (67.2%). Il punteggio MELD mediano al momento del trapianto è stato 14 (range 6-40), mentre l'eziologia della malattia epatica è risultata in metà dei casi virale (HBV e HCV). La colangite sclerosante primitiva (PSC) ha rappresentato l'eziologia dell'epatopatia solo in una minoranza dei casi; per questa ragione in quasi la totalità dei casi (98.9%) è stata effettuata una anastomosi biliare coledoco-coledocica termino-terminale. In 24 pazienti (13.8%) è stato posizionato un tubo a "T" di Kehr. Per quanto riguarda la soluzione utilizzata per la preservazione del graft solo in una minoranza dei casi (25.9%) è stata la soluzione dell'Università del Wisconsin.

La mortalità globale ad un anno dal trapianto è stata del 21.8%. Il riscontro di una stenosi anastomotica della via biliare è avvenuta in 40 pazienti (23.0%), mentre solo 7 pazienti (4.0%) hanno presentato una stenosi della via biliare non anastomotica e 19 pazienti (10.9%) hanno presentato un leakage biliare (Tabella 5). Tra tutti i casi di stenosi della via biliare 32/40 (80%) sono avvenuti entro il primo anno dal trapianto. La mediana in mesi dell'intervallo tra il trapianto e lo sviluppo della stenosi è stato di 5 mesi (0,3-70), 95% CI 4-7,5.

La comparsa di stenosi biliare anastomotica non è risultata influenzare negativamente la mortalità ad un anno, anzi, paradossalmente, i pazienti con stenosi dell'anastomosi hanno mostrato di avere una significativa migliore percentuale di sopravvivenza ad un anno post trapianto (3/40 Vs 35/134, $p=0.022$).

Fattori predittivi di sviluppo di stenosi anastomotica della via biliare. La Tabella 6 illustra la relazione tra le variabili cliniche e demografiche dei riceventi e dei donatori con la comparsa di stenosi biliare anastomotica.

L'incidenza di stenosi biliare anastomotica non differisce in modo statisticamente significativo in relazione al sesso e all'età sia dei riceventi che dei donatori, come non vi è alcuna associazione con l'eziologia virale dell'epatopatia.

Inoltre nella presente coorte di pazienti non è stata riscontrata alcuna associazione tra lo sviluppo di stenosi anastomotica della via biliare e la tipologia di preservazione del graft utilizzata. E' invece emersa una forte associazione tra l'utilizzo di Ciclosporina ($p=0.037$) e l'utilizzo del tubo a "T" di Kehr ($p=0.002$) e l'incidenza di stenosi biliare anastomotica. Accanto a queste due variabili l'analisi univariata ha evidenziato un'associazione statisticamente significativa tra lo sviluppo di stenosi anastomotica della via biliare e il polimorfismo genetico del IL-28B (22/71 C/C vs 16/85 C/T vs 2/18 T/T, $p=0.029$ for linear trend). Tale associazione è apparsa più significativa nei pazienti in terapia immunosoppressiva con Ciclosporina (10/20 C/C vs 7/29 C/T vs 1/6 T/T, $p=0.047$ for linear trend) rispetto ai pazienti in terapia con Tacrolimus (12/51 C/C vs 9/56 C/T vs 1/12 T/T, $p=0.168$ for linear trend). La regressione logistica in step-wise ha confermato che la terapia

immunosoppressiva con Ciclosporina (OR 2.509, CI 1.149-5.480, p=0.021), l'utilizzo del tubo a T di Kehr (OR 4.573, CI 1.778-11.762, p=0.001) e il polimorfismo genetico del IL-28B (OR 0.503, CI 0.267-0.948, p=0.034) sono risultati essere i fattori predittori indipendenti dello sviluppo di stenosi anastomotica della via biliare.

Età del ricevente, anni	56 (25-68)
Età del donatore, anni	51 (11-81)
Ricevente di sesso maschile, N.	136 (78.2%)
Donatore di sesso maschile, N.	117 (67.2%)
Utilizzo di uno spli graft, N.	13 (7.5%)
MELD score	14 (6-40)
D-MELD	671 (99-2479)
BMI del ricevente, Kg/m ²	25 (14.8-34.6)
Riattivazione CMV, N.	35 (20.1%)
Tecnica dell'anastomosi biliare	
	Biliodigestiva 2 (1.1%)
	Coledoco-coledoco 172 (98.9%)
Utilizzo del tubo di Kehr, N.	24 (13.8%)
Eziologia virale, N.	87 (50.0%)
Tempo di ischemia, min.	460 (128-955)
Utilizzo della soluzione UW, N.	45 (25.9%)
Terapia con Ciclosporina, N.	53 (30.5%)
Presenza di diabete mellito, N.	48 (26.4%)
Durata dello steroide, giorni	137 (0-868)

Tabella 4 - Caratteristiche cliniche e demografiche della popolazione studiata (N. 174). Le variabili categoriche sono presentate come percentuali, mentre le variabili continue come mediane (range)

Mortalità ad 1 anno	38 (21.8%)
Stenosi biliare anastomotica	40 (23.0%)
Stenosi biliare non anastomotica	7 (4.0%)
Leakage biliare	19 (10.9%)

Tabella 5 – Frequenza delle singole tipologie di stenosi della via biliare osservate e percentuale di sopravvivenza ad 1 anno da trapianto nella popolazione studiata

	Presenza di stenosi anastomotica		p
	Sì N. = 40 (23.0%)	No N. = 134 (77%)	
Età del ricevente >55 anni	24 (60.0%)	77 (57.5%)	0.918
Età del donatore >45 anni	27 (67.5%)	78 (58.2%)	0.384
Ricevente di sesso maschile	32 (80.0%)	104 (77.6%)	0.918
Donatore di sesso maschile	31 (77.5%)	86 (64.2%)	0.167
Utilizzo di un graft non intero	0 (0.0%)	13 (9.7%)	0.088
MELD >14	17 (42.5%)	59 (36.6%)	0.992
D-MELD >750	15 (37.5%)	54 (40.3%)	0.894
BMI del ricevente >25 Kg/m2	20 (50.0%)	54 (40.3%)	0.364
Riattivazione CMV	8 (20.0%)	27 (20.1%)	0.838
Utilizzo del tubo di Kehr	12 (30.0%)	12 (8.9%)	0.002
Eziologia virale	17 (42.5%)	70 (52.4%)	0.368
Tempo di ischemia in min. >460 min.	14 (35.0%)	55 (41.0%)	0.616
Utilizzo della soluzione UW	7 (17.5%)	38 (28.3%)	0.242
Terapia con ciclosporina	18 (45.0%)	35 (26.1%)	0.037
Presenza di diabete mellito	12 (30.0%)	34 (25.4%)	0.705
Durata dello steroide >120 giorni	29 (72.5%)	82 (61.2%)	0.286

Tabella 6 – Associazione tra caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione studiata e lo sviluppo di stenosi della via biliare. Le variabili categoriche sono presentate come frequenze. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test del Pearson chi-square

	OR	95% C.I.	p
Utilizzo del tubo di Kehr	4.573	1.778-11.762	0.001
Terapia con Ciclosporina	2.509	1.149-5.480	0.021
Polimorfismo del IL-28B	0.503	0.267-0.948	0.034

Tabella 7 – Analisi multivariata delle variabili cliniche e demografiche che si associano indipendentemente alla comparsa di stenosi anastomotica della via biliare

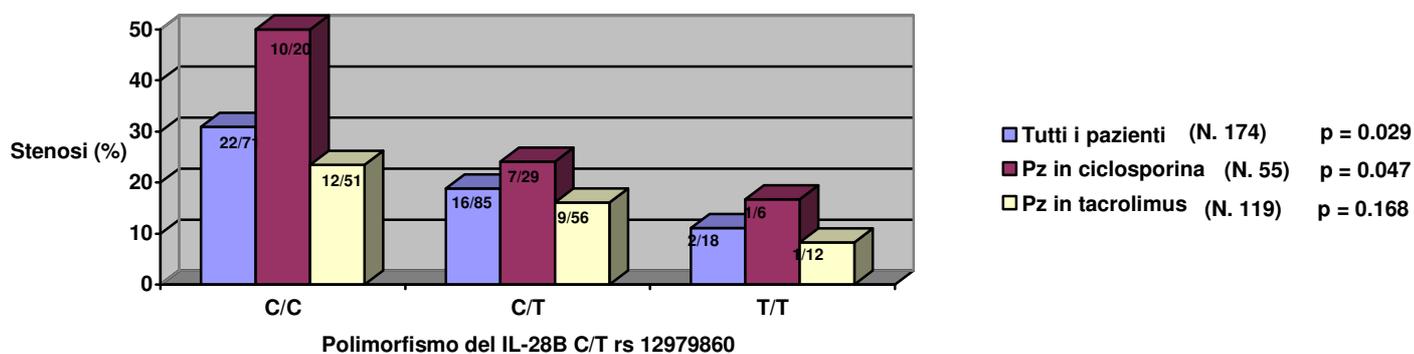


Figura 14 - Relazione tra il polimorfismo del IL-28B e la comparsa di stenosi anastomotica della via biliare. L'analisi è stata effettuata in tutta la popolazione e quindi sotto-stratificata in base alla tipologia della terapia immunosoppressiva impiegata. L'analisi statistica è stata effettuata mediante l'impiego del Pearson chi-square test for linear trend

CONCLUSIONI

La terapia immunosoppressiva nel trapianto di fegato ha subito negli anni recenti profondi cambiamenti, legati principalmente alla disponibilità di nuovi farmaci immunosoppressori, i quali presentano meccanismi di azione diversi e profilo di tollerabilità diverso rispetto agli inibitori della Calcineurina, quali la Ciclosporina e il Tacrolimus. Molti degli studi iniziali sulla tipologia degli schemi immunosoppressivi nel trapianto di fegato hanno privilegiato l'outcome del rigetto cellulare acuto, evento che nel passato ha rappresentato sicuramente un fattore predittivo importante nella perdita del graft. Per tali ragioni, l'introduzione del Tacrolimus ha dimostrato come questo farmaco potesse ridurre in maniera significativa le percentuali di rigetto cellulare acuto rispetto a quanto osservato con la Ciclosporina e pertanto attualmente viene impiegato in misura sempre più estesa quale immunosoppressore principale nel trapianto epatico. Gli effetti collaterali ben noti della Ciclosporina, riguardanti la nefrotossicità, lo sviluppo di iperplasia gengivale, l'irsutismo e la tossicità neurologica, sono stati solo in parte attenuati dall'impiego del Tacrolimus. Infatti quest'ultimo presenta alcuni importanti effetti collaterali, quali lo sviluppo del diabete e la tossicità neurologica. Allo scopo, quindi, di ridurre gli effetti collaterali degli inibitori della Calcineurina, gli schemi immunosoppressivi più recenti prevedono l'utilizzo di una combinazione tra Ciclosporina o Tacrolimus e un antimetabolita, quale il Micofenolato Mofetile o l'Acido Micofenolico. Tale combinazione ha reso possibile minimizzare gli effetti collaterali degli inibitori della Calcineurina e si è dimostrata significativamente associata al prolungamento della sopravvivenza sia del graft che del paziente. Farmaci immunosoppressori di più recente introduzione nella terapia immunosoppressiva dopo trapianto di fegato sono gli inibitori M-TOR quali il Sirolimus e l'Everolimus. Anche essi sono impiegati o in monoterapia o, più frequentemente, in terapia di associazione con un inibitore della Calcineurina.

La disponibilità di un numero considerevole di farmaci immunosoppressivi ha portato allo sviluppo di numerosissimi protocolli sperimentali di terapia e di moltissimi trials clinici che avevano l'obiettivo di dimostrare la maggiore efficacia degli uni rispetto agli altri nei confronti di diversi outcomes post-trapianto, quali la severità della epatite ricorrente da HCV, lo sviluppo di rigetto acuto e /o cronico, la funzionalità renale e lo sviluppo di neoplasie *de novo*. I dati derivanti da questi trials clinici sono in realtà ancora contrastanti, al punto da non rendere possibile ad oggi definire quale sia lo standard di terapia immunosoppressiva nel trapianto di fegato.

Le evidenze in vitro che la Ciclosporina inibisce, attraverso il suo legame con la Ciclofillina, la replicazione di HCV, ha portato a ritenere che questo farmaco fosse da preferire nei riceventi HCV

positivi, potendo teoricamente aumentare la probabilità di ottenimento di una SR dopo terapia antivirale. Nonostante molti lavori della letteratura abbiano confermato l'associazione positiva tra l'impiego di Ciclosporina e l'ottenimento della SVR nella epatite ricorrente da HCV, alcuni altri lavori, nei quali è stato effettuato un confronto tra l'impiego di Tacrolimus e Ciclosporina nella terapia della epatite ricorrente da HCV, non hanno dimostrato differenze statisticamente significative. Analoghe considerazioni sono possibili per quanto riguarda l'utilizzo degli steroidi e la severità dell'epatite ricorrente da HCV. La funzione renale dopo trapianto di fegato è un fattore importante in grado di influenzare la sopravvivenza del paziente nel lungo periodo. Circa il 7% dei pazienti sottoposti a trapianto epatico, dopo 10 anni dall'intervento, presenta un'insufficienza renale terminale che richiede il ricorso all'emodialisi cronica o al trapianto renale. Le principali motivazioni dell'insorgenza dell'insufficienza renale post-trapianto sono riconducibili alla nefrotossicità dei farmaci immunosoppressori e allo sviluppo di complicanze metaboliche quali il diabete, l'ipertensione arteriosa e la dislipidemia, anch'esse favorite dall'impiego degli stessi farmaci. Per molti anni, quindi, gli studi sulla immunosoppressione post-trapianto epatico si sono focalizzati nel valutare gli effetti benefici e non dei singoli farmaci nello sviluppo delle sopraccitate complicanze, non giungendo ancora ad una univoca interpretazione.

Lo sviluppo di complicanze biliari nel post-trapianto epatico rappresenta una complicanza estremamente frequente e in grado, in molti casi, di impattare negativamente sulla sopravvivenza del graft e del paziente o sulla necessità di effettuare un nuovo intervento chirurgico. Sicuramente la tecnica chirurgica, la qualità del graft e l'utilizzo di split livers appaiono essere elementi importanti nel determinare lo sviluppo di complicanze biliari. Tuttavia una quota di complicanze biliari può essere ascritta ad eventi immunologici. Così come è ampiamente conosciuta la problematica del rigetto del graft, non altrettanto ben indagata è la problematica del potenziale rigetto immunologico sulla via biliare extraepatica, sede molto frequente di stenosi, deformità o fissurazioni. E' plausibile infatti ritenere che nel punto dell'anastomosi biliare tra donatore e ricevente si realizzi una reazione immunologica analogamente a quanto accade nel parenchima epatico. La morfologia istologica di tale reazione non è visibile in quanto non è possibile effettuare biopsie di protocollo della via biliare, per cui i suoi potenziali effetti possono essere valutati e dedotti dai suoi esiti macroscopici quali appunto le stenosi.

I polimorfismi genetici della IL-28B hanno un importante impatto sull'ottenimento della SVR nella terapia antivirale della epatite HCV relata, sia nel soggetto immuno-competente che nel ricevente HCV positivo sottoposto a trapianto epatico. Il meccanismo biologico con il quale i vari polimorfismi della IL-28B agiscono non è del tutto chiaro, tuttavia è ragionevole ipotizzare che esso si espliciti attraverso un'azione mediata dai meccanismi dell'immunità innata, attraverso la

regolazione di geni Interferon inducibili nel tessuto epatico. I polimorfismi della IL-28B, quindi, potrebbero condizionare la risposta immune nel fegato dei pazienti infetti con HCV e svolgere una azione sinergica con l'Interferone esogeno somministrato ai fini terapeutici, aumentandone l'efficacia.

Non esistono ad oggi studi che abbiano valutato nel paziente sottoposto a trapianto epatico il ruolo dei polimorfismi genetici della IL-28B nello sviluppo di complicanze biliari. Nel nostro lavoro emerge come i polimorfismi genetici della IL-28B siano in grado di associarsi allo sviluppo di stenosi della via biliare in maniera diversa a seconda della tipologia di inibitore della Calcineurina utilizzato, Ciclosporina o Tacrolimus. I riceventi portatori del polimorfismo C/C della IL-28B presentano una percentuale di sviluppo di stenosi della via biliare significativamente maggiore rispetto ai riceventi portatori degli altri polimorfismi della IL-28B. I riceventi portatori del polimorfismo C/C trattati con Ciclosporina, presentano una probabilità di sviluppare stenosi della via biliare dopo trapianto epatico significativamente maggiore rispetto ai pazienti portatori di altri polimorfismi della IL-28B o ai pazienti trattati con Tacrolimus. Il meccanismo fisiopatologico di questa associazione non è attualmente noto. E' possibile speculare ritenendo che i pazienti portatori del genotipo C/C siano in grado di esprimere una maggiore attivazione dei geni dell'immunità innata e quindi sviluppare una maggiore reazione immunologica nei confronti dell'epitelio biliare del graft, inducendo un danno morfologico macroscopico. Tale attivazione immunologica non sarebbe tale da indurre necessariamente un maggior effetto immunologico nel parenchima epatico in quanto non sono state evidenziate differenze in termini di percentuale di rigetto acuto del graft nei pazienti trattati con Ciclosporina o Tacrolimus in relazione allo sviluppo di complicanze biliari. Una possibile ulteriore spiegazione potrebbe essere che i pazienti portatori del polimorfismo C/C siano in grado di metabolizzare in maniera diversa la Ciclosporina e non il Tacrolimus o che siano stati esposti a concentrazioni plasmatiche maggiori o minori di Ciclosporina rispetto ai riceventi portatori dei polimorfismi C/T e T/T. Dai nostri dati non sono emerse differenze nelle concentrazioni plasmatiche sia del Tacrolimus che della Ciclosporina in relazione ai diversi polimorfismi genetici della IL-28B. Un limite del nostro studio è quello di non avere la possibilità di verificare l'eventuale impatto dei polimorfismi genetici del IL-28B del donatore e il loro rapporto con quelli del ricevente.

In un'ottica di personalizzazione della terapia immunosoppressiva, la conoscenza del polimorfismo genetico del IL-28B, oltre che a predire la probabilità di ottenere una SVR dopo terapia antivirale nella epatite ricorrente da HCV potrebbe quindi essere utilizzato allo scopo di modificare la scelta del farmaco inibitore della calcineurina nei pazienti a potenziale maggior rischio di sviluppare complicanze biliari nel post-trapianto qualora portatori del polimorfismo C/C del IL-28B,

scegliendo preferenzialmente il Tacrolimus rispetto alla Ciclosporina. Questo potenziale utilizzo del genotipo della IL-28B tuttavia deve essere preceduto da conferme dei nostri risultati in altre casistiche effettuate anche mediante studi prospettici, nei quali venga anche valutata con attenzione la potenziale importanza dei livelli plasmatici dei farmaci immunosoppressivi in relazione allo sviluppo delle complicanze biliari e ai polimorfismi genetici del IL-28B.

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Angelico M. Introduzione e metodologia. Il Trapianto di Fegato: raccomandazioni dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato. 2008;15-17.
- ² Gerunda G, Toniutto P. Indicazioni e controindicazioni per il trapianto di fegato non urgente nell'adulto. Il Trapianto di Fegato: raccomandazioni dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato. 2008;19-41.
- ³ European Liver Transplantation Registry. Data Analysis Booklet 05/1968-12/2005.
- ⁴ O'Grady JG. Liver transplantation alcohol related liver disease: (deliberately) stirring a hornet's nest! Gut. 2006;55:1529-31.
- ⁵ Burra P, Mioni D, Cillo U, et al. Long-term medical and psycho-social evaluation of patients undergoing orthotopic liver transplantation for alcoholic liver disease. Transpl Int. 2000;13 Suppl 1:S174-8.
- ⁶ Bjornsson E, Olsson J, Rydell A, et al. Long-term follow-up of patients with alcoholic liver disease after liver transplantation in Sweden: impact of structured management on recidivism. Scand J Gastroenterol. 2005;40:206-16.
- ⁷ Pfitzmann R, Schwenzer J, Rayes N, et al. Long-term survival and predictors of relapse after orthotopic liver transplantation for alcoholic liver disease. Liver Transpl. 2007;13:197-205.
- ⁸ Bramstedt KA, Jabbour N. When alcohol abstinence criteria create ethical dilemmas for the liver transplant team. J Med Ethics. 2006;32:263-5.
- ⁹ Veldt BJ, Laine F, Guillygomarc'h A, et al. Indication of liver transplantation in severe alcoholic liver cirrhosis: quantitative evaluation and optimal timing. J Hepatol. 2002;36:93-8.
- ¹⁰ Samuel D. Management of hepatitis B in liver transplantation patients. Semin Liver Dis. 2004;24 Suppl 1:55-62.
- ¹¹ Terrault N, Roche B, Samuel D. Management of the hepatitis B virus in the liver transplantation setting: a European and an American perspective. Liver Transpl. 2005;11:716-32.
- ¹² Marzano A, Gaia S, Ghisetti V, et al. Viral load at the time of liver transplantation and risk of hepatitis B virus recurrence. Liver Transpl. 2005;11:402-9.
- ¹³ Benvegna L, Gios M, Boccato S, et al. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. Gut. 2004;53:744-9.

-
- ¹⁴ Shiffman ML. Natural history and risk factors for progression of hepatitis C virus disease and development of hepatocellular cancer before liver transplantation. *Liver Transpl.* 2003;9:S14-20.
- ¹⁵ Berenguer M. What determines the natural history of recurrent hepatitis C after liver transplantation? *J Hepatol.* 2005;42:448-56.
- ¹⁶ Forns X, Garcia-Retortillo M, Serrano T, et al. Antiviral therapy of patients with decompensated cirrhosis to prevent recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *J Hepatol.* 2003;39:389-96.
- ¹⁷ Everson GT, Trotter J, Forman L, et al. Treatment of advanced hepatitis C with a low accelerating dosage regimen of antiviral therapy. *Hepatology.* 2005;42:255-62.
- ¹⁸ Crippin JS, McCashland T, Terrault N, et al. A pilot study of the tolerability and efficacy of antiviral therapy in hepatitis C virus-infected patients awaiting liver transplantation. *Liver Transpl.* 2002;8:350-5.
- ¹⁹ Iacobellis A, Siciliano M, Perri F, et al. Peginterferon alfa-2b and ribavirin in patients with hepatitis C virus and decompensated cirrhosis: a controlled study. *J Hepatol.* 2007;46:206-12.
- ²⁰ Duclos-Vallee JC, Yilmaz F, Johanet C, et al. Could post-liver transplantation course be helpful for the diagnosis of so called cryptogenic cirrhosis? *Clin Transplant.* 2005;19:591-9.
- ²¹ Heneghan MA, Zolfino T, Muiesan P, et al. An evaluation of long-term outcomes after liver transplantation for cryptogenic cirrhosis. *Liver Transpl.* 2003;9:921-8.
- ²² Eghtesad B, Nezakatgoo N, Geraci LC, et al. Liver transplantation for Wilson's disease: a single-center experience. *Liver Transpl Surg.* 1999;5:467-74.
- ²³ Schumacher G, Platz KP, Mueller AR, et al. Liver transplantation: treatment of choice for hepatic and neurological manifestation of Wilson's disease. *Clin Transplant.* 1997;11:217-24.
- ²⁴ Farrell FJ, Nguyen M, Woodley S, et al. Outcome of liver transplantation in patients with hemochromatosis. *Hepatology.* 1994;20:404-10.
- ²⁵ Brandhagen DJ. Liver transplantation for hereditary hemochromatosis. *Liver Transpl.* 2001;7:663-72.
- ²⁶ Gartner JC, Jr., Zitelli BJ, Malatack JJ, et al. Orthotopic liver transplantation in children: two-year experience with 47 patients. *Pediatrics.* 1984;74:140-5.
- ²⁷ Birrer P, McElvaney NG, Chang-Stroman LM, et al. Alpha 1-antitrypsin deficiency and liver disease. *J Inherit Metab Dis.* 1991;14:512-25.
- ²⁸ Mascalchi M, Salvi F, Pirini MG, et al. Transthyretin amyloidosis and superficial siderosis of the CNS. *Neurology.* 1999;53:1498-503.
- ²⁹ Herlenius G, Wilczek HE, Larsson M, et al. Ten years of international experience with liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: results from the Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry. *Transplantation.* 2004;77:64-71.

-
- ³⁰ Stangou AJ, Hawkins PN, Heaton ND, et al. Progressive cardiac amyloidosis following liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy: implications for amyloid fibrillogenesis. *Transplantation*. 1998;66:229-33.
- ³¹ Suhr O, Danielsson A, Holmgren G, et al. Malnutrition and gastrointestinal dysfunction as prognostic factors for survival in familial amyloidotic polyneuropathy. *J Intern Med*. 1994;235:479-85.
- ³² Gigot JF, Jadoul P, Que F, et al. Adult polycystic liver disease: is fenestration the most adequate operation for long-term management? *Ann Surg*. 1997;225:286-94.
- ³³ Bruix J, Sherman M, Llovet JM, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol*. 2001;35:421-30.
- ³⁴ Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*. 1996;334:693-9.
- ³⁵ Yao FY, Ferrell L, Bass NM, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology*. 2001;33:1394-403.
- ³⁶ Herrero JI, Sangro B, Quiroga J, et al. Influence of tumor characteristics on the outcome of liver transplantation among patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl*. 2001;7:631-6.
- ³⁷ Roayaie S, Frischer JS, Emre SH, et al. Long-term results with multimodal adjuvant therapy and liver transplantation for the treatment of hepatocellular carcinomas larger than 5 centimeters. *Ann Surg*. 2002;235:533-9.
- ³⁸ Durand F, Belghiti J. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: should we push the limits? *Liver Transpl*. 2003;9:697-9.
- ³⁹ Onaca N, Davis GL, Goldstein RM, et al. Expanded criteria for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: a report from the International Registry of Hepatic Tumors in Liver Transplantation. *Liver Transpl*. 2007;13:391-9.
- ⁴⁰ Graziadei IW, Sandmueller H, Waldenberger P, et al. Chemoembolization followed by liver transplantation for hepatocellular carcinoma impedes tumor progression while on the waiting list and leads to excellent outcome. *Liver Transpl*. 2003;9:557-63.
- ⁴¹ Bonacini M, Puoti M. Hepatitis C in patients with human immunodeficiency virus infection: diagnosis, natural history, meta-analysis of sexual and vertical transmission, and therapeutic issues. *Arch Intern Med*. 2000;160:3365-73.
- ⁴² Puoti M, Spinetti A, Ghezzi A, et al. Mortality for liver disease in patients with HIV infection: a cohort study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000;24:211-7.

-
- ⁴³ De Vreede I, Steers JL, Burch PA, et al. Prolonged disease-free survival after orthotopic liver transplantation plus adjuvant chemoradiation for cholangiocarcinoma. *Liver Transpl.* 2000;6:309-16.
- ⁴⁴ Shimoda M, Farmer DG, Colquhoun SD, et al. Liver transplantation for cholangiocellular carcinoma: analysis of a single-center experience and review of the literature. *Liver Transpl.* 2001;7:1023-33.
- ⁴⁵ Sudan D, De Roover A, Chinnakotla S, et al. Radiochemotherapy and transplantation allow long-term survival for nonresectable hilar cholangiocarcinoma. *Am J Transplant.* 2002;2:774-9.
- ⁴⁶ Robles R, Figueras J, Turrion VS, et al. Spanish experience in liver transplantation for hilar and peripheral cholangiocarcinoma. *Ann Surg.* 2004;239:265-71.
- ⁴⁷ Rea DJ, Heimbach JK, Rosen CB, et al. Liver transplantation with neoadjuvant chemoradiation is more effective than resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg.* 2005;242:451-8; discussion 458-61.
- ⁴⁸ Coppa J, Pulvirenti A, Schiavo M, et al. Resection versus transplantation for liver metastases from neuroendocrine tumors. *Transplant Proc.* 2001;33:1537-9.
- ⁴⁹ Bufton S, Haydon G, Neil D. Liver transplantation for hepatic epithelioid hemangioendothelioma: a case series. *Prog Transplant.* 2007;17:70-2.
- ⁵⁰ Kanchana TP, Kaul V, Manzarbeitia C, et al. Liver transplantation for patients on methadone maintenance. *Liver Transpl.* 2002;8:778-82.
- ⁵¹ Bergquist A, Ekbohm A, Olsson R, et al. Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol.* 2002;36:321-7.
- ⁵² Zetterman RK, Belle SH, Hoofnagle JH, et al. Age and liver transplantation: a report of the Liver Transplantation Database. *Transplantation.* 1998;66:500-6.
- ⁵³ Gaynor JJ, Moon JI, Kato T, et al. A cause-specific hazard rate analysis of prognostic factors among 877 adults who received primary orthotopic liver transplantation. *Transplantation.* 2007;84:155-65.
- ⁵⁴ Thethy S, Thomson B, Pleass H, et al. Management of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation. *Clin Transplant.* 2004;18:647-653.
- ⁵⁵ Hampe T, Dogan A, Encke J, et al. Biliary complications after liver transplantation. *Clin Transplant.* 2006;20:93-96.
- ⁵⁶ Ayoub WS, Espiquel CO, Martin P. Biliary complications after liver transplantation. *Dig. Dis. Sci* 2010;55:1540-46.
- ⁵⁷ Scatton O, Meunier B, Cherqui D, et al. Randomized trial of choledochostomy with or without a T-tube in orthotopic liver transplantation. *Ann Surg.* 2001;233:432-437.

-
- ⁵⁸ Amador A, Charco R, Marti J, et al. Cost/efficacy clinical trial about the use of T-tube in cadaveric donor liver transplant: preliminary results. *Transplant Proc.* 2005;37:1129-1130.
- ⁵⁹ Vougas V, Rela M, Gane E, et al. A prospective randomised trial of bile duct reconstruction at liver transplantation: T-tube or no T-tube? *Transplant Int.* 1996;9:392-395.
- ⁶⁰ Londono MC, Balderramo D, Cardenas A. Management of biliary complications after orthotopic liver transplantation: the role of endoscopy. *World J Gastroenterol.* 2008;14:493-497.
- ⁶¹ Thuluvath PJ, Pfau PR, Kimmey MB, Ginsberg GG. Biliary complications after liver transplantation: the role of endoscopy. *Endoscopy.* 2005;37:857-863.
- ⁶² Sharma S, Gurakar A, Jabbour N. Biliary strictures following liver transplantation: past, present and preventive strategies. *Liver Transplant.* 2008;14:759-769.
- ⁶³ Kitazono MT, Qayyum A, Yeh BM, Chard PS, Ostroff JW, Coakley FV. Magnetic resonance cholangiography of biliary strictures after liver transplantation: a prospective double-blind study. *J Magn Reson Imaging.* 2007;25:1168-1173.
- ⁶⁴ Beltran MM, Marugan RB, Oton E, Blesa C, Nuno J. Accuracy of magnetic resonance cholangiography in the evaluation of late biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc.* 2005;37:3924-3925.
- ⁶⁵ Scanga AE, Kowdley KV. Management of biliary complications following orthotopic liver transplantation. *Curr Gastroenterol Rep.* 2007;9:31-38.
- ⁶⁶ Thuluvath PJ, Atassi T, Lee J. An endoscopic approach to biliary complications following orthotopic liver transplantation. *Liver Int.* 2003;23:156-162.
- ⁶⁷ Graziadei IW, Schwaighofer H, Koch R, et al. Long-term outcome of endoscopic treatment of biliary strictures after liver transplantation. *Liver Transplant.* 2006;12:718-725.
- ⁶⁸ Pascher A, Neuhaus P. Biliary complications after deceaseddonor orthotopic liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2006;13:487-496.
- ⁶⁹ Guichelaar MM, Benson JT, Malinchoc M, Krom RA, Wiesner RH, Charlton MR. Risk factors for and clinical course of nonanastomotic biliary strictures after liver transplantation. *Am J Transplant.* 2003;3:885-890.
- ⁷⁰ Baccarani U, Risaliti A, Zoratti L, et al. Role of endoscopic retrograde cholangiopancreatography in the diagnosis and treatment of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation. *Dig Liver Dis.* 2002;34:582-586.
- ⁷¹ Moench C, Moench K, Lohse AW, Thies J, Otto G. Prevention of ischemic-type biliary lesions by arterial back-table pressure perfusion. *Liver Transplant.* 2003;9:285-289.

-
- ⁷² Buis CI, Verdonk RC, Van der Jagt EJ, et al. Nonanastomotic biliary strictures after liver transplantation, part 1: radiological features and risk factors for early vs. Late presentation. *Liver Transplant.* 2007;13:708-718.
- ⁷³ Verdonk RC, Buis CI, van der Jagt EJ, et al. Nonanastomotic biliary strictures after liver transplantation, part 2: management, outcome, and risk factors for disease progression. *Liver Transplant.* 2007;13:725-732.
- ⁷⁴ Verdonk RC, Buis CI, Porte RJ, et al. Anastomotic biliary strictures after liver transplantation: causes and consequences. *Liver Transplant.* 2006;12:726-735..
- ⁷⁵ Ostroff JW. Post-transplant biliary problems. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2001;11:163-183.
- ⁷⁶ Park JS, Kim MH, Lee SK, et al. Efficacy of endoscopic and percutaneous treatments for biliary complications after cadaveric and living donor liver transplantation. *Gastrointest Endosc.* 2003;57:78-85.
- ⁷⁷ Shah SA, Grant DR, McGilvray ID, et al. Biliary strictures in 130 consecutive right lobe living donor liver transplant recipients: results of a Western center. *Am J Transplant.* 2007;7:161-167.
- ⁷⁸ Tashiro H, Itamoto T, Sasaki T, et al. Biliary complications after duct-to-duct biliary reconstruction in living-donor liver transplantation: causes and treatment. *World J Surg.* 2007;31:2222-2229.
- ⁷⁹ Yazumi S, Yoshimoto T, Hisatsune H, et al. Endoscopic treatment of biliary complications after right-lobe living-donor liver transplantation with duct-to-duct biliary anastomosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2006;13:502-510.
- ⁸⁰ Tsujino T, Isayama H, Sugawara Y, et al. Endoscopic management of biliary complications after adult living donor liver transplantation. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:2230-2236.
- ⁸¹ Pfau PR, Kochman ML, Lewis JD, et al. Endoscopic management of postoperative biliary complications in orthotopic liver transplantation. *Gastrointest Endosc.* 2000;52:55-63.
- ⁸² Shah JN, Haigh WG, Lee SP, et al. Biliary casts after orthotopic liver transplantation: clinical factors, treatment, biochemical analysis. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:1861-1867.
- ⁸³ Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 345, 41-52 (2001).
- ⁸⁴ Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 127 (Suppl. 1), S35-S50 (2004).
- ⁸⁵ Brown RS. Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* 436, 973-978 (2005).
- ⁸⁶ Hoofnagle JH, Seeff LB. Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N. Engl. J. Med.* 355, 2444-2451 (2006).
- ⁸⁷ Antaki N, et al. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver Int.* 30, 342-355 (2010).

-
- ⁸⁸ Swain MG, et al. A sustained virologic response is durable in patients with chronic hepatitis C treated with peginterferon alfa-2a and ribavirin. *Gastroenterology* 139, 1593-1601 (2010).
- ⁸⁹ Veldt BJ, et al. Sustained virologic response and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C and advanced fibrosis. *Ann. Intern. Med.* 147, 677-684 (2007).
- ⁹⁰ Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J. Hepatol.* 49, 634-651 (2008).
- ⁹¹ Poynard T, et al. Randomised trial of interferon α 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 352, 1426-1432 (1998).
- ⁹² Manns MP, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358, 958-965 (2001).
- ⁹³ Fried MW, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 347, 975-982 (2002).
- ⁹⁴ Zeuzem S, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J. Hepatol.* 40, 993-999 (2004).
- ⁹⁵ Jensen DM et al. Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon α -2a (40 kd)/ribavirin therapy. *Hepatology* 43, 954-960 (2006).
- ⁹⁶ Berg T, et al. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 37, 600-609 (2003).
- ⁹⁷ Gad HH, Dellgren C, Hamming OJ, et al. Interferon-lambda is functionally an interferon but structurally related to the interleukin- 10 family. *J Biol Chem* 2009;284:20869-20875.
- ⁹⁸ Fox BA, Sheppard PO, O'Hara PJ. The role of genomic data in the discovery, annotation and evolutionary interpretation of the interferon-lambda family. *PLoS One* 2009;4:e4933.
- ⁹⁹ Robek MD, Boyd BS, Chisari FV. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J Virol* 2005;79:3851-3854.
- ¹⁰⁰ Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, et al. Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* 2006;131:1887-1898.
- ¹⁰¹ Pagliaccetti NE, Eduardo R, Kleinstein SH, et al. Interleukin-29 functions cooperatively with interferon to induce antiviral gene expression and inhibit hepatitis C virus replication. *J Biol Chem* 2008;283:30079-30089.
- ¹⁰² Muir AJ, Shiffman ML, Zaman A, et al. Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2010; 52:822-832.

-
- ¹⁰³ Attia J , Ioannidis JP , Th akkinstian A et al. How to use an article about genetic association: a background concepts . JAMA 2009;301:74-81.
- ¹⁰⁴ Goldstein DM , Weale E. Population genomics: linkage disequilibrium holds the key . Curr Biol 2001;11:R576-9.
- ¹⁰⁵ Pe ' er I , de Bakker PI , Maller J, et al. Evaluating and improving power in whole-genome association studies using fixed marker sets . Nat Genet 2006;38:663-77.
- ¹⁰⁶ Ge D, et al. Genetic variation in IL-28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature 461,399-401 (2009).
- ¹⁰⁷ Tanaka Y, et al. Genome-wide association of IL-28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat. Genet. 41,1105-1109 (2009).
- ¹⁰⁸ Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL-28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. Nature 2009; 461:798–801.
- ¹⁰⁹ Suppiah V, et al. IL-28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. Nat. Genet. 41,1100-1104 (2009).
- ¹¹⁰ Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG. IL-28B genomic-based treatment paradigmas for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies. Am J of Gastroenterol 2011 106; 38-45.
- ¹¹¹ Fabris C, Falletti E, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, Bignulin S, Cmet S, Fornasiere E, Fumolo E, Fangazio S, Cerutti A, Minisini R, Pirisi M, Toniutto P. IL-28B rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: Role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC. J of Hepatology 2011 54; 716-722.
- ¹¹² Mangia A, et al. An IL-28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. Gastroenterology 139, 821-827.e1 (2010).
- ¹¹³ McCarthy JJ, et al. Replicated association between an IL-28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. Gastroenterology 138, 2307-2314 (2010).
- ¹¹⁴ Rauch A, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. Gastroenterology 138, 1338-1345.e1-7 (2010).
- ¹¹⁵ Rallon NI, et al. Interleukin-28B gene polymorphisms do not influence the susceptibility to HIV-infection or CD4 cell decline. AIDS 25, 269-271 (2010).
- ¹¹⁶ Pineda JA, et al. Prediction of response to pegylated interferon plus ribavirin by IL-28B gene variation in patients coinfectd with HIV and hepatitis C virus. Clin. Infect. Dis. 51, 788-795 (2010).

-
- ¹¹⁷ Fukuhara T, et al. Variants in IL-28B in liver recipients and donors correlate with response to peg-interferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology* 139, 1577-1585.e1-3 (2010).
- ¹¹⁸ Lange CM, et al. Impact of donor and recipient IL-28B rs12979860 genotypes on hepatitis C virus liver graft reinfection. *J. Hepatol.* doi:10.1016/j.jhep.2010.10.037.
- ¹¹⁹ Ashwin B, David LT, Chloe LT. IL-28B and the control of Hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010; 139:1865-1876.
- ¹²⁰ Mangia A, Santoro R, Minerva N, et al. Peginterferon Alfa-2b and Ribavirin for 12 vs. 24 Weeks in HCV Genotype 2 or 3. *N Engl J Med.* 2005; 352: 2609-17.
- ¹²¹ Sinn DH, Kim YJ, Lee ST, et al. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in Asian Patients. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011.
- ¹²² Sarrazin C, Susser S, Doehring A, et al. Importance of IL-28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients. *Journal of Hepatology.* 2011; 54: 415-21.
- ¹²³ Yu ML, Huang CF, Huang JF, et al. Role of interleukin-28B polymorphisms in the treatment of hepatitis C virus genotype 2 infection in Asian patients. *Hepatology.* 2011; 53: 7-13.
- ¹²⁴ Moghaddam A, Melum E, Reinton N, et al. IL-28B genetic variation and treatment response in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection. *Hepatology.* 2011; 53: 746-54.
- ¹²⁵ Clark PJ, Thompson AJ. Host genomics and HCV treatment response. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2011 “accepted article”; doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06918.x.
- ¹²⁶ Rallon NI, Naggie S, Benito JM, et al. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS.* 2010; 24: F23-9.
- ¹²⁷ Seto WK, Tanaka Y, Liu K, Lai CL, Yuen MF. The Effects of IL-28B and ITPA Polymorphisms on Treatment of Hepatitis C Virus Genotype 6. *Am J Gastroenterol.* 2011; 106: 1007-8.
- ¹²⁸ Pineda JA, Caruz A, Rivero A, et al. Prediction of response to pegylated interferon plus ribavirin by IL-28B gene variation in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus. *Clin Infect Dis.* 2010; 51: 788-95.
- ¹²⁹ Labarga P, Barreiro P, Mira JA, et al. Impact of IL-28B polymorphisms on response to peginterferon and ribavirin in HIV-hepatitis C virus-coinfected patients with prior nonresponse or relapse. *AIDS.* 2011; 25: 1131-3.
- ¹³⁰ Aparicio E, Parera M, Franco S, et al. IL-28B SNP rs8099917 is strongly associated with pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy treatment failure in HCV/HIV-1 coinfecting patients. *PLoS One.* 2010; 5.

-
- ¹³¹ Medrano J, Neukam K, Rallon N, et al. Modeling the probability of sustained virological response to therapy with pegylated interferon plus ribavirin in patients coinfecting with hepatitis C virus and HIV. *Clin Infect Dis*. 2010; 51: 1209-16.
- ¹³² de Araujo ES, Dahari H, Cotler SJ, et al. Pharmacodynamics of PEG-IFN-[alpha]-2a and HCV response as a function of IL-28B polymorphism in HIV/HCV-coinfecting patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011; 56: 95-9.
- ¹³³ Rallon NI, Soriano V, Naggie S, et al. IL-28B gene polymorphisms and viral kinetics in HIV/hepatitis C virus-coinfecting patients treated with pegylated interferon and ribavirin. *AIDS*. 2011; 25: 1025-33.
- ¹³⁴ Fellay J, Shianna KV, Ge D, et al. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science*. 2007; 317: 944-7.
- ¹³⁵ Martin MP, Qi Y, Goedert JJ, et al. IL-28B polymorphism does not determine outcomes of hepatitis B virus or HIV infection. *J Infect Dis*. 2010; 202: 1749-53.
- ¹³⁶ Terrault NA, Berenguer M. Treating hepatitis C infection in liver transplant recipients. *Liver Transplantation*. 2006; 12: 1192-204.
- ¹³⁷ Chalasani N, Manzarbeitia C, Ferenci P, et al. Peginterferon alfa-2a for hepatitis C after liver transplantation: Two randomized, controlled trials. *Hepatology*. 2005; 41: 289-98.
- ¹³⁸ Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, et al. Variants in IL-28B in Liver Recipients and Donors Correlate With Response to Peg-Interferon and Ribavirin Therapy for Recurrent Hepatitis C. *Gastroenterology*. 2010; 139: 1577-85.e3.
- ¹³⁹ Charlton MR, Thompson A, Veldt BJ, et al. Interleukin-28B polymorphisms are associated with histological recurrence and treatment response following liver transplantation in patients with hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2011; 53: 317-24.
- ¹⁴⁰ Lange CM, Moradpour D, Doehring A, et al. Impact of donor and recipient IL-28B rs12979860 genotypes on hepatitis C virus liver graft reinfection. *Journal of Hepatology*. In Press, Corrected Proof.
- ¹⁴¹ Eurich D, Boas-Knoop S, Ruehl M, et al. Relationship between the interleukin-28b gene polymorphism and the histological severity of hepatitis C virus-induced graft inflammation and the response to antiviral therapy after liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2011; 17: 289-98.