

INDICE

1.ABSTRACT	2
2. INTRODUZIONE	4
2.1 Generalità.....	4
2.2 Epidemiologia.....	6
2.3 Fattori di rischio.....	7
2.4 Patogenesi.....	8
2.5 Classificazione anatomopatologica	9
2.6 Stadiazione	11
2.7 Clinica.....	14
2.8 Diagnosi.....	15
2.9 Trattamento	18
3. SCOPO DELLO STUDIO	26
4.PAZIENTI E METODI.....	39
4.1 Pazienti	39
4.2 Metodi	40
5.RISULTATI	42
6.DISCUSSIONE	49
7. CONCLUSIONI.....	55
ICONOGRAFIA.....	55
BIBLIOGRAFIA.....	57
RINGRAZIAMENTI	64

1.ABSTRACT

Obiettivo: L'obiettivo di questo studio è quello di valutare se la stima della clearance del Bevacizumab abbia un ruolo nel predire la prognosi dei pazienti trattati con la combinazione Atezolizumab-Bevacizumab.

Pazienti e metodi: Si tratta di uno studio osservazionale retrospettivo, nel quale sono stati presi in esame i pazienti in trattamento presso la Clinica Oncologica-Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche - Università Politecnica delle Marche, affetti da epatocarcinoma stadio BCLC C o B, che abbiano ricevuto in prima linea trattamento con Atezolizumab- Bevacizumab.

La stima della clearance del Bevacizumab e del volume di distribuzione è stata calcolata attraverso formule matematiche validate in letteratura [1]. Il tempo di estrazione è stato definito come rapporto tra volume di distribuzione e clearance del Bevacizumab.

Per l'identificazione dei cut-off da applicare ai valori degli esami di laboratorio presi in esame (PCR, neutrofili/linfociti, albumina, fosfatasi alcalina) e delle stime sopraindicate, per quelli con una distribuzione normale (valutata sec. metodo Shapiro-Wilk) si è applicato il valore mediano della distribuzione. In caso di distribuzione non-normale si è calcolato il cut-off con sistema della curva ROC mettendo come variabile di selezione l'aver ottenuto una stabilità o risposta parziale/completa alla prima rivalutazione strumentale. La sopravvivenza globale dei pazienti (OS) è stata calcolata a partire dal giorno di inizio del trattamento con Atezolizumab+Bevacizumab fino al decesso del paziente o, per i pazienti persi al follow-up, alla data dell'ultimo appuntamento noto per

il paziente. La sopravvivenza libera da progressione (PFS), è un altro parametro epidemiologico di valutazione dell'efficacia degli interventi terapeutici, e rappresenta il tempo dall'inizio della terapia fino alla progressione della malattia. Le curve di sopravvivenza sono state valutate con il metodo di Kaplan-Meier. L'associazione tra le variabili e la sopravvivenza è stata valutata in forma univariata mediante log-rank test.

Risultati: Ad oggi sono stati arruolati nel presente studio 14 pazienti. Dall'analisi dei valori di clearance del farmaco, è emerso che: il valore più basso risulta essere di 22,7262 ml/h, quello più alto 46,7306 ml/h, con un intervallo di confidenza (IC) del 95%, la mediana è di 31,1416 ml/h con IC del 95%. Dall'analisi dei valori del volume di distribuzione, è emerso che: il valore più basso risulta essere 2307,6635 ml, quello più alto 3506,6259 ml, la mediana 2926,9191 ml con IC del 95%. Dall'analisi dei valori del tempo di estrazione, è emerso che: il valore più basso è di 65,7674 h, quello più alto più alto è pari a 127,0836 h, la mediana 94,4267h con IC del 95%.

La probabilità di ottenere il controllo di malattia è stata valutabile nei 9 pazienti dei 14 totali di cui era disponibile la rivalutazione radiologica. Di questi, 6 hanno ottenuto come migliore risultato una stabilizzazione di malattia o una risposta parziale/completa mentre 3 hanno sviluppato una progressione. Nei pazienti con tempi di estrazione più brevi (4/9) soltanto un paziente aveva presentato una stabilità/risposta di malattia (1/4, 25%) rispetto alla totalità dei pazienti tempi di estrazione più lunghi (5/5, 100%). Questa differenza è risultata statisticamente significativa al test esatto di Fisher ($p=0.04$).

I pazienti con la clearance più rapida e quindi con tempo di estrazione ridotto hanno una PFS media di 5,208 con un errore standard (SE) di 1,126 e un intervallo di confidenza (IC)

del 95% tra 3,002 e 7,415; quelli con la clearance più lenta e con tempo di estrazione più lungo invece hanno una PFS media di 28,885 con un SE di 0,000 e un IC del 95% da 28,885 a 28,885. Sul totale la media risulta essere di 24,547 con un SE di 2,835 e un IC del 95% tra 18,990 e 30,104.

I pazienti con la clearance più rapida e quindi con tempo di estrazione ridotto hanno una OS media di 5,164 con un errore standard (SE) di 1,127 e un intervallo di confidenza (IC) del 95% tra 2,955 e 7,373; quelli con la clearance più lenta e con tempo di estrazione più lungo invece hanno una media di 28,885 con un SE di 0,000 e un IC del 95% da 28,885 a 28,885. Sul totale la media risulta essere di 24,636 con un SE di 2,764 e un IC del 95% tra 19,218 e 30,053.

Conclusione: i risultati del presente studio suggeriscono che i pazienti che presentano tempi di estrazione più brevi dovuti a clearance particolarmente rapida rispetto al volume di distribuzione del Bevacizumab potrebbero avere un beneficio inferiore dal trattamento con Atezolizumab+Bevacizumab rispetto a coloro che hanno tempi di estrazione maggiori.

2. INTRODUZIONE

2.1 Generalità

Il carcinoma epatocellulare è il più frequente tumore primitivo del fegato, è causato da uno sviluppo incontrollato delle cellule epatiche, spesso in un organo già affetto da cirrosi.

L'epatocarcinoma (HCC) rappresenta una delle principali cause di morte per patologia oncologica anche in Italia e, trattandosi di una neoplasia con alcuni elementi peculiari che la distinguono dalla maggior parte dei tumori solidi, la sua gestione terapeutica risulta estremamente complessa. In primo luogo, la maggior parte degli HCC si sviluppa nel contesto di un fegato cirrotico e, quindi, la prognosi di questi pazienti dipende non solo dallo stadio del tumore ma anche dalla funzione epatica residua. In aggiunta, la presenza e la severità della cirrosi (insieme con le comorbidità frequentemente osservabili in tali pazienti) condizionano fortemente la scelta terapeutica. Inoltre, i trattamenti per la patologia epatica sottostante (antivirali, azioni volte a modificare lo stile di vita del paziente in caso di epatopatia dovuta ad abuso alcolico o disfunzioni metaboliche) giocano un ruolo non secondario nella prognosi. Infine, la disponibilità di numerosi trattamenti (trapianto di fegato, resezione epatica, ablazione percutanea/laparoscopica, diversi tipi di trattamenti transarteriosi, radioterapia stereotassica e diversi tipi di terapie sistemiche), che trovano la loro indicazione in momenti evolutivi diversi della neoplasia e che sono di competenza di specialisti diversi, rende indispensabile la discussione del paziente in un ambito multidisciplinare che comprenda competenze epatologiche, oncologiche, chirurgiche, radiologiche e anatomo-patologiche. La discussione multidisciplinare è particolarmente necessaria nei pazienti con HCC in stadio intermedio (tumore multinodulare localizzato al fegato e con funzione epatica buona) o localmente avanzato (invasione vascolare intraepatica), che possono essere trattati con approcci che vanno dal trapianto di fegato alla terapia sistemica, in considerazione dell'ampia variabilità del grado di diffusione intraepatica della neoplasia. Se non discussi in ambito multidisciplinare, questi pazienti ricevono una

terapia basata sulla esperienza di un singolo operatore e sulle opzioni terapeutiche disponibili nel singolo centro (che potrebbero non comprendere l'intero armamentario terapeutico disponibile per l'HCC), con un elevato rischio di incorrere in un "sovra-trattamento" o in un "sotto-trattamento", precludendo loro la terapia maggiormente appropriata su base personalizzata [2].

2.2 Epidemiologia

Per quanto riguarda l'incidenza, nel 2022 in Italia circa 12.000 sono state le nuove diagnosi (rapporto U:D 2:1). Tale dato risulta in decremento nei maschi. Il Sud Italia si caratterizza per un più elevata incidenza e mortalità, il Centro per l'incidenza più bassa. Questa differenza può essere spiegata con la differente incidenza di virus epatici, in particolare da virus dell'epatite C (HCV). Sebbene, il virus dell'epatite B (HBV) sia un noto fattore patogenetico dell'HCC, il suo ruolo in Italia è stato mitigato dalla disponibilità di un vaccino efficace, sistematicamente somministrato a tutti i soggetti nati dal 1978.

Per la prevalenza, sono 33.800 le persone viventi in Italia dopo una diagnosi di tumore del fegato, tra gli ultrasessantacinquenni la proporzione di persone con tumore è del 25% in più rispetto ai 60-74enni e oltre il quintuplo rispetto ai 45-59enni.

L'HCC rientra tra le prime 5 cause di morte per tumore negli uomini di qualsiasi età (7%), ma è al terzo posto (8%) nella fascia 50-69 anni. A partire dai primi anni '90, la mortalità complessiva da HCC è in decremento, con un tasso annuale di decremento annuo nei maschi dell'1,6% e nelle femmine dell'1,3%.

Risulta ancora oggi una neoplasia a prognosi severa, con una sopravvivenza netta a 5 anni dalla diagnosi stimata al 22% negli uomini e ugualmente nelle donne, mentre dopo 10 anni dalla diagnosi è circa il 10% [3].

2.3 Fattori di rischio

Oltre il 70% dei casi di tumori primitivi del fegato è riconducibile a fattori di rischio noti, quali l'infezione da virus dell'epatite C (HCV) e da virus dell'epatite B (HBV), infatti un impatto positivo sull'incidenza di questa patologia è riportato all'introduzione della vaccinazione anti-HBV e alle terapie antivirali per l'HCV. Nelle aree del Nord Italia circa un terzo dei tumori del fegato è peraltro attribuibile al consumo di bevande alcoliche. Ulteriori fattori di rischio sono rappresentati da aflatossine (in particolare Asia orientale e Africa sub-Sahariana) assunte con l'alimentazione, emocromatosi, deficit di alfa-1-antitripsina, obesità (specie se complicata da presenza di diabete) e steatoepatite non alcolica (NAFLD) che attualmente risulta essere la più importante causa emergente nei paesi industrializzati. Anche il fumo di tabacco è stato riconosciuto tra i fattori di rischio [4].

Negli ultimi anni è emerso che HCC è sempre più causato dall'abuso di sostanze e malattie metaboliche, le quali sono in aumento; a favorirne l'insorgenza sono l'infiammazione intraepatica e l'insulino-resistenza. In particolare, in Italia la forma virale è diminuita del 10% negli ultimi 15 anni mentre quella non virale è aumentata del 10%: stanno quindi aumentando i casi non associati alla cirrosi, che sono di più difficile diagnosi; tutto ciò lo possiamo osservare anche in Italia dove i pazienti con HCV che hanno buona consapevolezza della malattia vanno incontro ad una sorveglianza

semestrale, mentre solo 1/3 dei pazienti con obesità e problemi da alcool vanno incontro a sorveglianza. Il cancro del fegato è il tipico cancro di tipo infiammatorio: ci sono modificazioni ai telomeri e anomalie cellulari che possono insorgere anche prima che il paziente abbia la cirrosi.

Quindi se da una parte i soggetti con HCV e HBV sono predisposti allo sviluppo di questa patologia, dall'altra abbiamo una maggiore possibilità in questi pazienti di una diagnosi precoce grazie alla sorveglianza eseguita con ecografia semestrale, mediante la quale possiamo intercettare anche noduli di piccole dimensioni; al contrario i soggetti con sindrome metabolica (la cui manifestazione epatica è proprio la NAFLD) molto spesso non vanno a sorveglianza e la diagnosi risulta pertanto più spesso tardiva.

2.4 Patogenesi

Il carcinoma epatocellulare origina principalmente dalla trasformazione maligna di noduli preneoplastici/ displastici, in un processo multistep. Tuttavia, la carcinogenesi epatica legata a NAFLD è in qualche modo peculiare, in quanto, come accennato sopra, il carcinoma può occorrere in assenza di una sottostante cirrosi, sebbene rimanga salda l'evidenza di una chiara associazione tra la severità dell'epatopatia e l'insorgenza di HCC [5]. Sebbene i meccanismi coinvolti nell'eziopatogenesi del cancro NAFLD-correlato non siano del tutto conosciuti, è ben noto che essi si vanno via via sommando durante il decorso dell'epatopatia cronica. Tra questi ricordiamo lo stato di infiammazione cronica, insieme alla sindrome metabolica, e specialmente all'obesità, giocano un ruolo chiave nello sviluppo di insulino-resistenza, attraverso il rilascio di citochine pro-infiammatorie (TNF-alfa, IL-6) e l'attivazione di specifiche vie di segnale intracellulare (JNK, JAK2/STAT3

e PI3K/Akt) [6]. La riprogrammazione metabolica epatica che ne consegue, unita all'ambiente infiammatorio cronico, inducono stress ossidativo negli epatociti, con conseguente danno al DNA, che sta alla base dell'oncogenesi [7].

2.5 Classificazione anatomopatologica

La comparsa di displasia nei noduli rigenerativi della cirrosi denota la progressione in nodulo displastico, il quale costituisce la lesione preneoplastica correlata all'insorgenza di HCC.

L'HCC è distinto in **Early** e **Progressed**.

- Un nodulo displastico che infiltra il parenchima circostante, gli spazi portal, i setti, diventa un Early HCC, che è caratterizzato dall'essere di piccole dimensioni (<2cm), ben differenziato, con i margini nodulari mal definiti ma conservati, non delimitato da pseudocapsula fibrosa, con incompleta vascolarizzazione arteriosa. Come mostrato nella figura 1, l'infiltrazione dal punto di vista morfologico si manifesta con nidi di epatociti circondati da fibrosi, che in questo caso è segno di una reazione sclerotica stimolata dalle cellule epatiche infiltranti. L'istochimica mostra una marcata riduzione o perdita del reticolo che delimita i sinusoidi. Per quanto riguarda l'immunistochemica, la positività di almeno due marker tra GPC3, Hsp70 e Glutamina-sintasi è indicativa di Early HCC.
- Per quanto riguarda il Progressed: può essere di dimensioni inferiori ai 2 cm ma meno differenziato (G2-G3) oppure di grandi dimensioni (sopra i 2 cm); inoltre può originare o direttamente da un nodulo con displasia di alto grado o da un Early HCC, crescendo diventa sempre più infiltrante. È caratterizzato da

alterazioni vascolari molto importanti che consistono nella scomparsa dell'apporto venoso portale: progressivamente l'apporto vascolare al nodulo diventa esclusivamente di tipo arterioso. Fattori prognostici negativi: le dimensioni (1 nodulo maggiore di 5 cm, 3 inferiori a 1 cm), l'invasione microvascolare, il grading nucleare. Una variante a prognosi migliore è quella fibrolamellare, in cui si osservano gruppi di epatociti organizzati in maniera lamellare separati da tralci di connettivo fibrosi; interessa i pazienti più giovani ed è meno frequentemente associato a cirrosi e ad altri tipi di epatopatie, il marker caratteristico è il CD34.

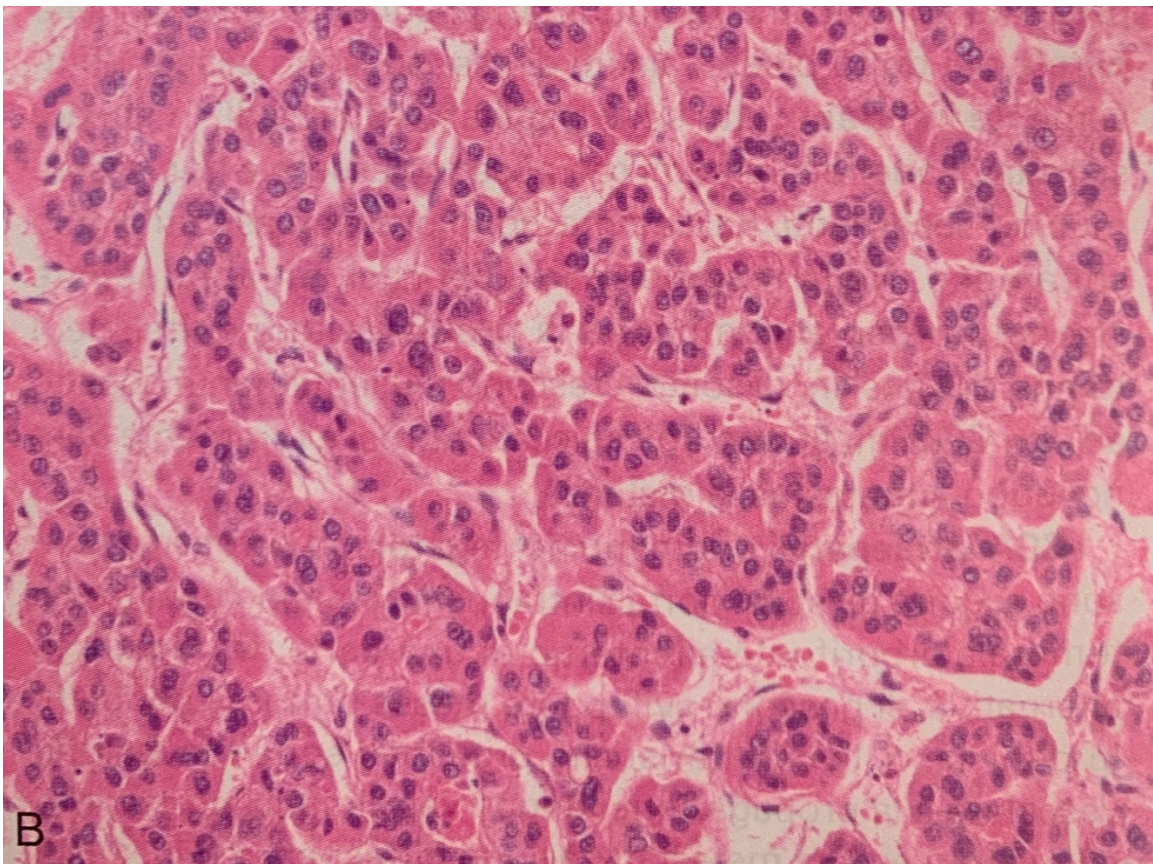


Figura 1. Carcinoma epatocellulare, valutazione microscopica di lesione ben differenziata, le cellule tumorali si dispongono a nidi, talvolta con un lume centrale. Robbins e Cotran, *Atlante di Anatomia Patologica*. Losi, Lorena, 2016. [1]

2.6 Stadiazione

La stadiazione TNM dell'HCC è la seguente:

1. T1: tumore solitario senza invasione vascolare;
2. T2: tumore solitario con invasione vascolare (T2a) o tumori multipli con o senza invasione vascolare (T2b), nessuno dei quali è maggiore di 5 cm;
3. T3: tumori multipli con dimensioni maggiori di 5cm o invasione di un ramo principale della vena porta o delle vene epatiche;
4. T4 invasione diretta degli organi circostanti o perforazione del peritoneo viscerale [8]

A differenza della maggior parte delle altre neoplasie, per le quali i sistemi di stadiazione sono ben codificati ed universalmente accettati, nell'HCC i sistemi di stadiazione proposti non sono universalmente condivisi. Una delle ragioni che ne rendono difficile la stadiazione è legata al fatto che nella quasi totalità dei casi, l'HCC insorge in pazienti affetti da cirrosi e pertanto, la stadiazione non può non tener conto della severità della sottostante malattia epatica, spesso elemento condizionante la prognosi del paziente.

Diversi sistemi di stadiazione sono stati proposti, ma attualmente la classificazione standard per il management clinico dell'HCC è quella proposta dalla BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) e convalidata da AASLD ed EASL [9]. Come illustrato in figura 2, questo sistema include caratteristiche macroscopiche del tumore (dimensioni, invasione vascolare, diffusione extraepatica) e variabili cliniche, quali la funzione epatica (classe di Child-Pugh, ovvero uno score che con un range da 1 a 3, basa la sua valutazione su 5 parametri clinici: livelli di bilirubina totale, albumina sierica, presenza o assenza di attività protrombotica, di ascite e grado di encefalopatia) e lo stato fisico (Performance

Status) . Il principale vantaggio di questa classificazione è la correlazione tra stadio e modalità di trattamento. In base ai parametri precedentemente descritti, si identificano 5 stadi:

- stadio molto precoce (stadio 0): pazienti con singolo nodulo inferiore a 2 cm in cirrosi ben compensata e in assenza di ipertensione portale. Per questi casi, il trattamento indicato è la resezione chirurgica e la prognosi è eccellente con tassi di sopravvivenza a 5 anni superiori al 90%;
- stadio precoce (stadio A): pazienti con funzione epatica preservata (Child-Pugh A o B), con HCC singolo o multiplo, fino a 3 noduli, di dimensioni < 3 cm. Questi pazienti beneficiano di trattamenti curativi, quali resezione, trapianto epatico e procedure percutanee ad intento ablativo con radiofrequenze o iniezione di etanolo; i tassi di sopravvivenza sono del 50-70% a 5 anni;
- stadio intermedio (stadio B): pazienti asintomatici con classe Child-Pugh A e B con HCC > 5 cm o multifocale, in assenza di invasione vascolare o diffusione extraepatica; questi pazienti sono candidati ottimali alla chemioembolizzazione, che migliora l'outcome fino ad una mediana di 20 mesi [10];
- stadio avanzato (stadio C): pazienti con sintomi tumore-correlati e/o invasione vascolare o diffusione extraepatica, per cui i trattamenti sono principalmente palliativi e prevedono trials clinici con nuovi agenti terapeutici;
- stadio terminale (stadio D): pazienti con deterioramento fisico severo (PST>2) e/o ChildPugh C; i trattamenti sono esclusivamente di tipo sintomatico e l'aspettativa di vita è di circa 3 mesi.

La stadiazione TNM, che si basa su parametri di tipo patologico, ha un limitato ruolo predittivo. Analogamente non è predittivo il Child-Pugh score, che con la sua valutazione non tiene conto della variabilità clinica e biochimica della malattia, spontanea o indotta dall'intervento del medico. Proprio per questi motivi, l'unico sistema di stadiazione ampiamente validato è quello proposto dalla BCLC, il quale possiede, principalmente, delle implicazioni di carattere terapeutico, ma è anche in grado di fornire una stratificazione prognostica. Attualmente, nessun marcatore è in grado di riflettere i meccanismi biologici che governano la proliferazione e la disseminazione della neoplasia. Per questo ulteriori indagini sono necessarie per poter tradurre nella pratica clinica i dati genomici e proteomici e cambiare significativamente la predizione prognostica e le indicazioni al trattamento [11].

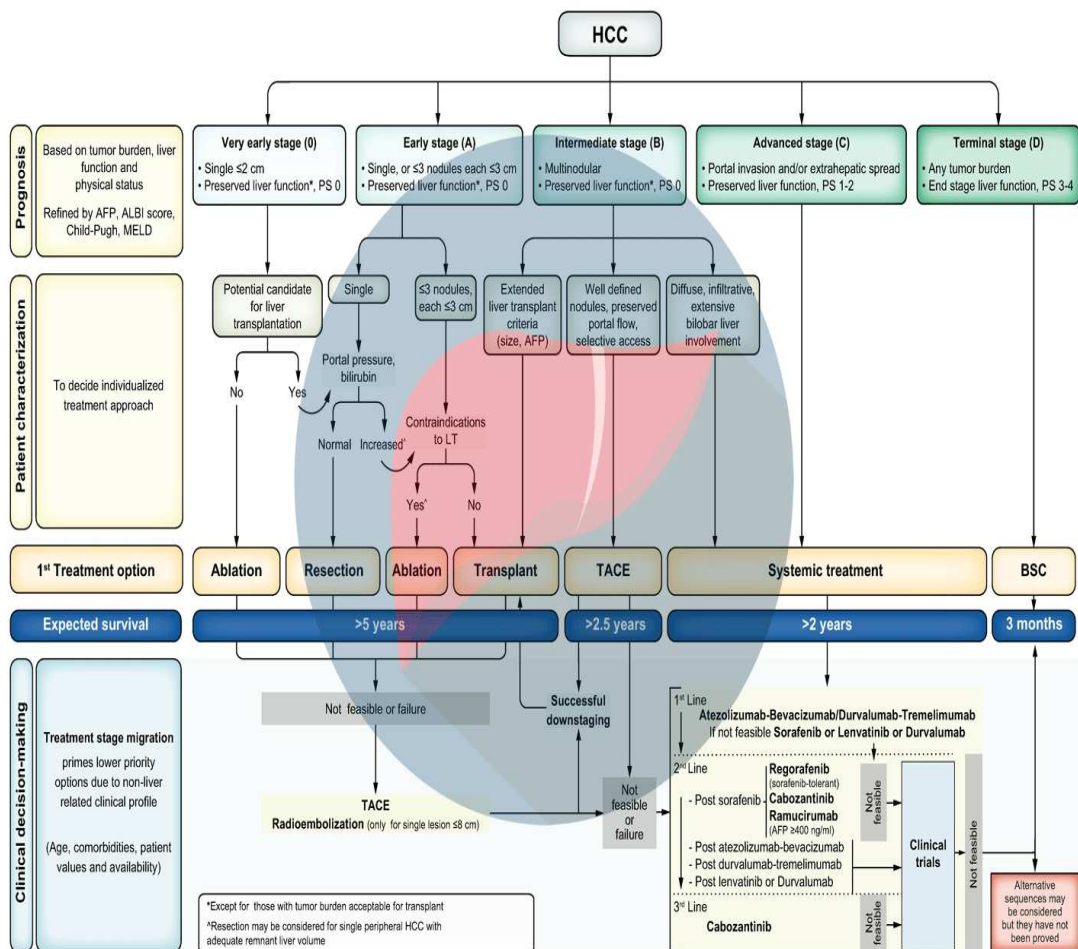


Figura 2. Classificazione BCLC 2022 [2].

2.7 Clinica

I tumori del fegato di piccole dimensioni possono essere asintomatici, perché il fegato non è innervato, solo la capsula lo è, quindi, soltanto una trazione di quest'ultima può provocare dolore. Per questo è necessario che i pazienti a rischio si controllino periodicamente.

I tumori di dimensioni più grandi possono invece causare dolori, al fianco destro e alla schiena, senso di peso e di tensione all'addome, ma anche disturbi della digestione e calo ponderale.

Quando l'epatocarcinoma raggiunge stadi ancora più avanzati insorgono i sintomi dell'insufficienza epatica:

- ittero (colorazione gialla delle sclere dell'occhio e della pelle),
- ascite (liquido libero in cavità addominale),
- turbe della coagulazione (i fattori necessari alla coagulazione sono prodotti dal fegato)
- ipertensione portale (che si può presentare in maniera variabile dal punto di vista clinico, con quadri che vanno dall'asintomaticità fino al sanguinamento da varici gastroesofagee o gastropatia/enteropatia congestizia da ipertensione portale)

In generale chi non ha condizioni croniche si accorge quando è diventato molto grande e nota l'ingombro per effetto massa: il paziente riferisce di sentire una massa in ipocondrio destro, un dolore gravativo cronico a volte irradiato posteriormente.

2.8 Diagnosi

La diagnosi dell'epatocarcinoma si raggiunge con esami radiologici.

L'unico esame del sangue correlato alla presenza del tumore è l' α_1 -feto proteina (AFP), che risulta elevata però solo nel 50% circa dei casi.

- L'ecografia è solitamente il primo strumento per identificare la neoplasia. Il tumore appare come un nodulo più scuro (ipoecogeno) nel contesto del fegato.

Oggi è possibile eseguire questo esame anche con mezzi di contrasto sofisticati, che riescono a rilevare la presenza di noduli di dimensioni molto piccole.

- La TC (tomografia assiale computerizzata) è forse l'esame più completo, in particolare se eseguita con la tecnica spirale. Richiede l'iniezione di mezzo di contrasto per via endovenosa. La TC spirale consente di esaminare in brevissimo tempo tutto il fegato e mostra la posizione del tumore rispetto ai vasi situati dentro al fegato. È la metodica più sensibile per lo studio degli epatocarcinomi. Deve essere eseguita con mezzi di contrasto epato-specifici in maniera trifasica (si devono visualizzare la fase arteriosa, la fase portale e la fase tardiva della diffusione del mezzo di contrasto nel fegato). L'iperdensità di un nodulo del fegato in fase arteriosa è un elemento assolutamente determinante per fare diagnosi di epatocarcinoma. Il nodulo neoplastico capta il mezzo di contrasto più velocemente del parenchima circostante in fase arteriosa (e diventa bianco "wash in") e lo elimina più velocemente nella fase venosa (e diventa nero "wash out").
- La risonanza magnetica (RM) viene usata sempre più frequentemente nello studio di questi tumori, in quanto è probabilmente l'esame in assoluto più utile per lo studio dei noduli del fegato.
- La biopsia ha sempre meno rilievo nella diagnosi, anche perché sappiamo che il nodulo che abbiamo visto all'imaging e che ha caratteristiche contrastografiche tipiche può essere definito come HCC se presente una epatopatia sottostante. La biopsia nei pazienti cirrotici dovrebbe essere realizzata nei casi in cui le tecniche di imaging risultino inconcludenti, laddove tecnicamente possibile,

soprattutto per le lesioni con diametro inferiore a 2 cm. Nei pazienti non cirrotici, al contrario, le sole metodiche radiologiche non sono sufficienti e deve essere realizzata una valutazione istologica tramite biopsia. La ripetizione della biopsia è raccomandata se l'istologia è inconclusiva o discordante, o in caso di crescita o modifiche nel pattern durante il follow-up. La diagnosi istologica di HCC è molto più difficile per le lesioni con diametri inferiori a 2 cm poiché queste lesioni rappresentano spesso tumori ben differenziati. Poiché i criteri di malignità istocitologici (atipia e invasione vascolare ed interstiziale) per l'HCC possono non essere presenti nel campione bioptico, le diagnosi di early HCC ed epatocarcinoma ben differenziato dovrebbero essere supplementate dall'analisi immunohistochimica per i markers di trasformazione maligna degli epatociti, come la combinazione di HSP70, glipicano 3 (GPC3) e glutamina sintetasi (sensibilità e specificità per HCC ben differenziato del 72% e 100%, rispettivamente [12]). La biopsia è inoltre dirimente in quei casi (la cui incidenza è in aumento, essendo spesso correlati a forme dismetaboliche) di epatocolangiocarcinomi, cioè forme neoplastiche in cui vi è una commistione di cellule neoplastiche morfologicamente sia di tipo epatocitario che di derivazione dalle vie biliari.

Per inquadrare ancora meglio i pazienti, valutandone la funzione residua del fegato, è possibile usufruire anche del sistema MELD (Mayo End stage Liver Disease), il quale è un particolare sistema a punteggio che è stato proposto dalla Mayo Clinic (Rochester, Minnesota, USA) per stimare la gravità della malattia epatica cronica nei pazienti con cirrosi e insufficienza epatica terminale in attesa di trapianto. Si basa sulla

determinazione dei valori di bilirubina, di INR (indice della coagulazione del paziente) e di creatinina (indice della funzione dei reni, ridotta nei pazienti con sindrome epato-renale). Tutti questi valori sono facilmente reperibili fra gli esami del sangue che i pazienti con cirrosi eseguono di routine. Tanto più alto è il punteggio ottenuto, tanto più gravi sono le condizioni cliniche del paziente.

Attualmente possiamo usufruire del nuovo modello MELD 3.0, per valutare in modo più efficiente i pazienti in merito alla priorità di accedere al trapianto [13].

2.9 Trattamento

Una volta fatta la diagnosi di epatocarcinoma e dopo averne definito l'estensione, l'algoritmo più usato per stabilire il trattamento è, come abbiamo già visto, l'algoritmo di Barcellona (BCLC): in base a quello si sceglie come procedere.

Tra le terapie attualmente proponibili per il trattamento dell'epatocarcinoma troviamo:

- **la resezione epatica:** è stata la prima terapia ad essere usata per questa malattia. È indicata per i pazienti con noduli singoli, in classe di Child A5, A6 e B7. Un valore di MELD di 11 rappresenta il punto in cui è possibile condurre in sicurezza le resezioni epatiche. È inoltre necessario che in pazienti che presentino ipertensione portale non vi sia piastrinopenia rilevante da ricondurre all'ipersplenismo. L'indicazione alla resezione epatica è per i pazienti nelle classi BCLC 0 e A, per le B secondo l'algoritmo BCLC non è indicata. I vantaggi della resezione epatica risiedono nell'asportazione completa del tumore e del tessuto circostante. Gli svantaggi risiedono nella possibilità di insorgenza di

insufficienza epatica dopo l'intervento e nella possibilità che si presentino delle recidive di malattia.

- **L'ablazione con alcolizzazione o radiofrequenza:** sono tecniche sviluppate in alternativa alla resezione. Prevedono la distruzione del tumore mediante iniezione di alcool assoluto o calore portati dentro il fegato da aghi o sonde introdotte attraverso la parete addominale. Hanno indicazioni simili alla chirurgia, includendo però anche quei pazienti che non possono essere operati o non vogliono operarsi. I vantaggi risiedono nell'evitare l'intervento chirurgico. Gli svantaggi consistono nella mancata certezza della distruzione di tutto il tumore e nella necessità di dover eseguire più sedute. Possono ripresentarsi nuovi noduli con il tempo. I risultati sono di poco inferiori a quelli della chirurgia. I limiti delle metodiche di ablazione sono quelli prevalentemente limitati alle dimensioni dei noduli (risultano meno efficaci all'aumentare delle dimensioni del nodulo sopra ai 3 cm e richiedono più sedute per "sterilizzare" il nodulo se ha dimensioni superiori ai 5 cm) ed alla sede dei noduli (praticamente non effettuabili se il nodulo è in corrispondenza della colecisti o della capsula epatica pena il rischio di causare gravi complicanze mentre risultano di efficacia limitata le tecniche di ablazione termica se il nodulo è in prossimità di un vaso sanguigno per effetto "sinkhole" di dissipazione del calore/freddo dovuto ai moti convettivi del vaso in prossimità del nodulo).
- **Il trapianto di fegato:** è in teoria la terapia più efficace, rimuovendo sia il tumore che il fegato cirrotico. Purtroppo la cronica carenza di donatori non consente di poter candidare al trapianto tutti i pazienti con epatocarcinoma.

Inoltre, i risultati peggiorano quanto più è grande il tumore, cosa che esclude molti pazienti. Criteri accettati per l'inserimento in lista di attesa, oltre a quelli generali per il trapianto, sono quelli di Milano:

- ⇒ Assenza di invasione neoplastica nei rami portali;
- ⇒ presenza di un singolo nodulo di dimensioni inferiori 5 cm;
- ⇒ presenza di non più di 3 noduli, nessuno di dimensioni maggiori di 3 cm.

Non tutti i centri seguono strettamente questi criteri. Il rischio operatorio varia oggi fra il 2 ed il 5%. La sopravvivenza a 5 anni dei pazienti trapiantati che rientrano nei criteri giunge anche all'80%.

Più recentemente gli stessi colleghi della Chirurgia di Milano hanno proposto un'estensione nei criteri per candidare pazienti a trapianto epatico (up-to-seven): questi criteri prevedono di proporre il trapianto epatico anche a pazienti che sebbene non soddisfano i criteri di Milano classici presentino non più di 7 noduli in cui la somma dei diametri maggiori dei noduli non superi 7 cm. Con questi criteri estesi di indicazione al trapianto sono state osservate sopravvivenze a 5 anni inferiori a quelle osservate con i criteri di Milano (73,3%), ma in assenza di invasione microvascolare quasi sovrapponibili (71%) a quelle ottenute con i criteri di Milano. Da questi dati emerge che un numero maggiore di pazienti con carcinoma epatocellulare potrebbe essere candidato per il trapianto di fegato qualora i criteri di Milano fossero sostituiti dai criteri up-to-seven.

[14]

- **Chemioembolizzazione (TACE trans-arterial chemo embolization – TACE):** è una terapia palliativa per pazienti che non possono eseguire nessuno dei trattamenti precedenti. Prevede l'infusione di farmaci direttamente sul fegato per pazienti

con noduli singoli o multipli, di dimensioni non superiori a 5-6cm di diametro, valutando che la funzionalità del fegato sia adeguata a tollerare il trattamento. Viene utilizzata in pazienti che non possono sottoporsi a resezione epatica, come procedura preliminare alla resezione epatica o preliminare al trapianto. In generale, come riporta l'algoritmo BCLC può essere utilizzata nella classe B e come seconda linea in 0 e A. La procedura si effettua in anestesia locale e dura circa un'ora. Attraverso l'inserimento di un catetere dall'arteria femorale all'inguine, si arriva al fegato per poter introdurre all'interno dell'arteria che vascolarizza la regione del fegato maggiormente interessata dal tumore una soluzione con mezzo di contrasto liposolubile (Lipiodol), un farmaco chemioterapico e una sostanza che provoca l'occlusione dell'arteria, in modo da ridurre il flusso sanguigno al tumore.

Può provocare dolore al fianco e febbre, che si risolvono generalmente in pochi giorni.

- **Terapia medica – terapia sistemica:** nello stadio BCLC C (e nei pazienti BCLC B non candidabili a procedure di embolizzazione), non operabile e nel quale non è possibile candidare il paziente ad un trapianto, è indicata una terapia sistemica che da algoritmo consta di tre linee:

- 1) PRIMA LINEA: è indicata la combinazione Atezolizumab-Bevacizumab, in alternativa Durvalumab-Tremelimumab (attualmente non rimborsata in Italia); in alternativa, sono indicati Sorafenib, Levantinib o Durvalumab (quest'ultimo farmaco immunoterapico non attualmente rimborsato in Italia)

2) SECONDA LINEA, in caso di progressione alla prima linea di terapia:

- a) A progressione da Sorafenib sono indicati Regorafenib, Cabozantinib o Ramucirumab (se AFP>400 ng/ml);
- b) A progressione da Atezolizumab-Bevacizumab o Durvalumab-Tremelimumab o Levantinib o Durvalumab è importante valutare l'arruolamento in eventuali trial clinici . Nella pratica clinica, in assenza di evidenze solide su come debbano essere trattati questi pazienti, se si fa riferimento ai dati retrospettivi dei pazienti arruolati negli studi registrativi (IMBRAVE150, REFLECT e HIMALAYA): la maggior parte di questi pazienti riceve terapia con inibitori delle tirosine kinasi (TKIs) in monoterapia come Sorafenib o Lenvatinib (off-label).

3) TERZA LINEA, a fallimento di due precedenti linee: Cabozantinib (nei pazienti che abbiano ricevuto precedentemente Sorafenib)

Per gli stadi più avanzati, dunque, l'unico trattamento attuabile risulta essere quello sistemico. Sorafenib, un inibitore multichinasico, è stato il primo farmaco che si è dimostrato attivo per via sistemica, con il quale la sopravvivenza mediana e il tempo alla progressione radiologica sono stati 3 mesi in più rispetto a quelli trattati con placebo [15]. Tutto ciò che è stato studiato poi, è stato confrontato con i risultati ottenuti con questo farmaco che per lungo tempo è stato il cardine della terapia medica del carcinoma epatocellulare in fase avanzata non resecabile.

Lenvatinib, anch'esso un farmaco TKI, è stato confrontato con Sorafenib, mostrando risultati statisticamente significativi in termini di sopravvivenza libera da progressione (7,2 mesi contro 4,6 mesi) e tasso di risposta obiettiva (29,6% contro 6,9%) nella popolazione complessiva, ma con una sopravvivenza globale sovrapponibile [16].

Successivamente, è stata anche valutata l'associazione di Lenvatinib con Pembrolizumab (un anti PD-1), rispetto a Lenvatinib più placebo nel carcinoma epatocellulare avanzato non resecabile precedentemente non trattato: questa combinazione non ha però migliorato significativamente la sopravvivenza libera da progressione o globale; tuttavia il braccio di controllo ha ottenuto dei buoni risultati, con una sopravvivenza globale mediana di 19 mesi, confermando il beneficio di Lenvatinib in monoterapia come trattamento di prima linea [17] .

La novità più importante nel trattamento è però la combinazione di Atezolizumab (un checkpoint inibitore anti-PD-L1) con Bevacizumab (un anticorpo monoclonale anti-VEGF) che ha dimostrato un significativo vantaggio in termini di sopravvivenza globale e libera da progressione rispetto a Sorafenib, come dimostrato dallo studio IMbrave 150, nel quale il rischio di morte inferiore del 42% e la sopravvivenza globale significativamente più lunga con Atezolizumab-Bevacizumab rispetto a Sorafenib sono sostenuti da un aumento di 2,5 mesi della sopravvivenza libera da progressione mediana (figura 3), una corrispondente diminuzione del 41% del rischio di progressione della malattia o morte, e un tasso di risposta del 27,3%, oltre al fatto che l'88% dei pazienti che hanno avuto una risposta (completa o parziale) ha continuato ad avere una risposta a 6 mesi. Inoltre, nel gruppo Atezolizumab-Bevacizumab, il tempo mediano al deterioramento della qualità della vita e del funzionamento è stato notevolmente più lungo della sopravvivenza libera da progressione mediana, differenza che non è stata osservata nel gruppo Sorafenib. La durata mediana del trattamento con sorafenib (2,8 mesi) era coerente con la sopravvivenza libera da progressione mediana valutata dai ricercatori [18].

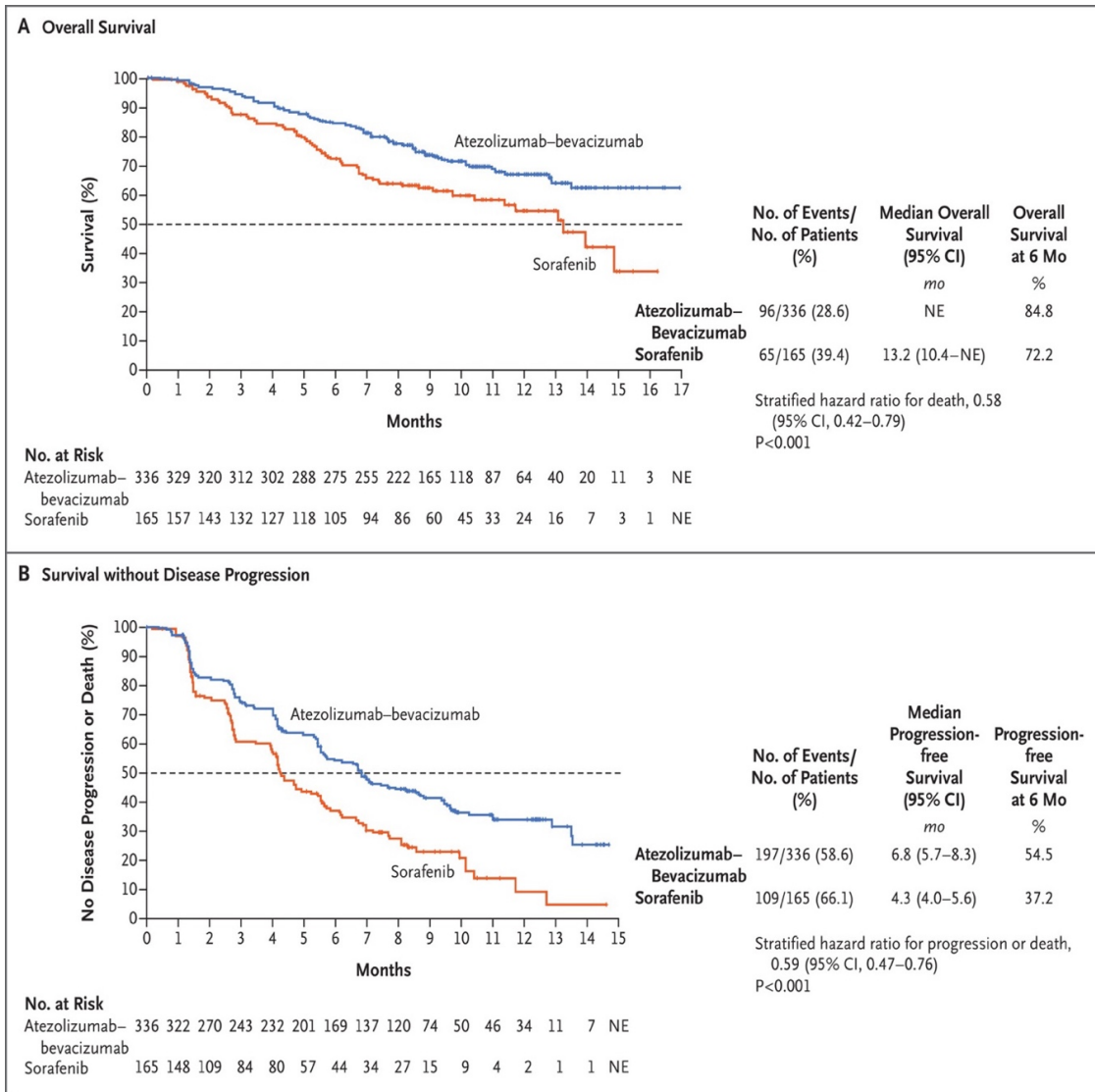


Figura 3 R. S. Finn *et al.*, «Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma», *N. Engl. J. Med.*, vol. 382, fasc. 20, pp. 1894–1905, mag. 2020, doi: 10.1056/NEJMoa1915745 [3].

Come mostrato dall'algoritmo BCLC, in prima linea troviamo anche un'altra combinazione di farmaci, ovvero quella data da Tremelimumab (un anticorpo anti-CTL4) e Durvalumab (un anticorpo anti-PD-L1) che ha mostrato un vantaggio in termini di sopravvivenza rispetto a Sorafenib: il regime STRIDE dello studio HIMALAYA (che consta di una dose di Tremelimumab combinata con Durvalumab ogni quattro settimane) ha mostrato una chiara superiorità rispetto a Sorafenib, come mostrato in figura 4, con un

tasso di sopravvivenza a 36 mesi del 30,7% nella curva di Kaplan-Meier. Il regime si è rivelato superiore anche alla monoterapia con Durvalumab, dimostrando chiaramente che una singola dose primaria elevata di anticorpo anti-CTLA-4 ha un effetto aggiuntivo quando combinata con anticorpo anti-PD-L1 [19].

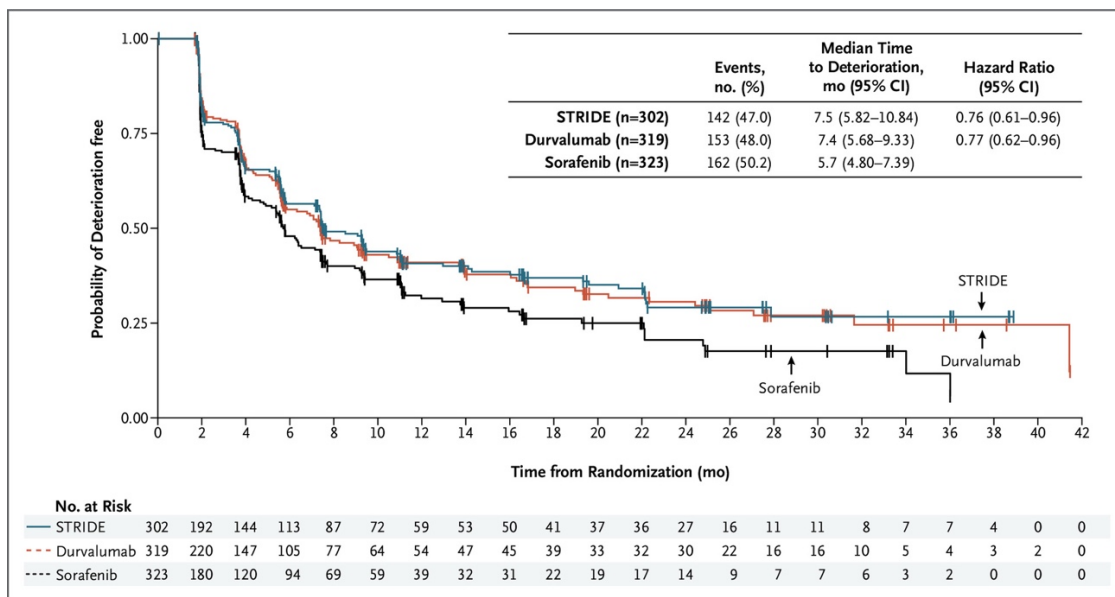


Fig. 4 G. K. Abou-Alfa *et al.*, «Tremelimumab plus Durvalumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma», *NEJM Evid.*, vol. 1, fasc. 8, lug. 2022, doi: 10.1056/EVIDoa2100070 [4].

Per quanto riguarda la seconda e la terza linea di trattamento, nel setting dei pazienti pretrattati con Sorafenib, due inibitori multichinasici, il Regorafenib ed il Cabozantinib, hanno dimostrato entrambi efficacia clinica.

Nello studio RESORCE, Regorafenib ha dimostrato di migliorare in modo statisticamente significativo e clinicamente rilevante la sopravvivenza dei pazienti con epatocarcinoma in progressione dopo il trattamento con Sorafenib, con un guadagno di circa 3 mesi rispetto al placebo. Questo risultato, inoltre, è stato ottenuto senza che siano state

osservate tossicità gravi, in particolare senza peggioramenti rilevanti della funzione epatica [20].

Invece, il trattamento con Cabozantinib, è compreso nella seconda linea di trattamento, ma da solo costituisce anche la terza linea: con lo studio CELESTIAL è emerso che la sopravvivenza globale mediana è di 10,2 mesi con Cabozantinib rispetto a 8,0 mesi con placebo, mentre la mediana di sopravvivenza libera da progressione è più che raddoppiata: 5,2 mesi con Cabozantinib e 1,9 mesi con placebo. Il controllo della malattia (risposta parziale o malattia stabile) è stato raggiunto dal 64% dei pazienti nel gruppo trattato con Cabozantinib rispetto al 33% nel gruppo placebo; tutto ciò a prezzo di una tossicità attesa che comprende eritrodissiestesia palmoplantare, ipertensione, rialzo delle transaminasi, fatigue e diarrea, in linea con il profilo di sicurezza di Cabozantinib [21].

Infine, nel gruppo di pazienti pretrattati con valori di alfa-FP nel sangue ≥ 400 ng/ml, si è dimostrato attivo il Ramucirumab, un anticorpo monoclonale antiVEGFR-2 [22].

3. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio è di valutare se la stima della clearance del Bevacizumab abbia un ruolo nel predire la prognosi dei pazienti trattati con la combinazione Atezolizumab-Bevacizumab.

I presupposti pre-clinici di un possibile effetto sinergico dei due farmaci sono legati all'evidenza che, in seguito all'effetto antiangiogenico mediato da Bevacizumab si osserva un aumento di espressione di PD-L1 che è rappresentata con l'asse PD-L1/PD-1 il bersaglio della terapia a base di Atezolizumab. Alcuni studi come il LEAP-02 mettono in

discussione tale ipotesi: non si è mostrato un vantaggio statisticamente significativo dall'impiego concomitante di immunoterapia con antiangiogenico rispetto alla sola terapia con antiangiogenico [17].

Viene da chiedersi pertanto se questo effetto sinergico sia in realtà solo osservabile quando l'effetto antiangiogenico viene mediato da Bevacizumab piuttosto che da altri farmaci antiangiogenici e pertanto se il ruolo di Bevacizumab nella combinazione non sia necessario ai fini di rendere più efficace l'Atezolizumab.

Per quanto riguarda gli immunoterapici, alcuni capisaldi della predittività di risposta a questi farmaci (come ad esempio i livelli di espressione di PD-L1, tumor mutational burden, combined prognostic score, l'instabilità dei microsatelliti, la perdita di espressione delle proteine del mismatch repair), che risultano validi ed applicabili in altri setting tumorali a partenza dal tratto gastrointestinale, sembrano non avere lo stesso significato nei pazienti con HCC che ricevono questi farmaci. Inoltre, occorre considerare che solo in un numero limitato di pazienti si ha disposizione il pezzo istologico, considerando che per i pazienti con carcinoma epatocellulare su fegato con nota epatopatia, la diagnosi può essere posta anche solo sulla base dei criteri radiologici, se conforme al comportamento tipico di una lesione sospetta per epatocarcinoma. In assenza di materiale istologico, markers sierici o laboratoristici assumono un'importanza cruciale, rappresentando una delle poche informazioni che si possono acquisire con una relativa facilità durante il percorso clinico del paziente. Tra gli esami laboratoristici che più sembrerebbero associati con alterazioni del funzionamento del sistema immunitario e con uno stato di infiammazione sistemica, sicuramente i valori di proteina C reattiva (PCR) ed ed il rapporto neutrofili/linfociti, rappresentano gli indicatori più sensibili di un

attivazione aspecifica del sistema immunitario, diversa rispetto a quanto prospettato con l'impiego dei farmaci immunoterapici: studi effettuati in altri setting, hanno dimostrato che un'elevazione di questi mediatori dell'infiammazione sembrerebbe essere associata ad un minore effetto dell'immunoterapia o quantomeno ad una prognosi peggiore.

Nello studio CAVE, è stato evidenziato come nel carcinoma del colon retto metastatico in pazienti chemiorefrattari, in rechallenge con Cetuximab più Avelumab, il gruppo con rapporto neutrofili/linfociti (NLR) <3 ha avuto una sopravvivenza globale mediana (mOS) di 17,8 mesi rispetto a 8,9 mesi nel gruppo con NLR>3, con rispettivamente una sopravvivenza libera da progressione mediana (mPFS) di 3,9 mesi nei primi contro 3,5 mesi nei secondi. Quindi il NLR ridotto nello studio CAVE si è dimostrato significativamente correlato con un miglioramento della sopravvivenza nei pazienti con carcinoma del colon retto metastatico e può rappresentare un potenziale biomarcatore predittivo [23].

Sul fronte degli antiangiogenici, in merito alla possibilità di predire la risposta in seguito al trattamento con questi farmaci, ci sono numerosi studi che hanno mostrato un possibile ruolo prognostico di una serie di parametri tra cui polimorfismi di proteine coinvolte nell'angiogenesi (ALICE-ALICE2), i livelli di esami di laboratorio tra cui la LDH, o altri score derivati come l'ALBI, ma non vi sono indicazioni definitive in merito a quale sia la loro applicabilità nella pratica clinica e soprattutto se i risultati ottenuti in analisi condotte su pazienti trattati con altri angiogenici siano applicabili al Bevacizumab.

In particolare, lo studio ALICE-1 ha evidenziato che l'allele C di rs2010963 (VEGF-A) e l'allele T di rs4604006 (VEGF-C) hanno mostrato una correlazione significativa con PFS e

OS. Rs2010963 si trova nella regione terminale 5'-UTR del gene VEGF-A mentre rs4604006 si trova in una delle regioni introniche del gene VEGF-C [24]; inoltre, questo studio ha sottolineato che è probabile che diversi polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) all'interno del gene VEGF possano alterare i livelli circolanti di VEGF, influenzando quindi la risposta alle terapie anti-VEGF [25] [26]. Secondo questi risultati e ipotesi, l'esito di un trattamento antiangiogenetico potrebbe essere significativamente influenzato da una certa variazione costitutiva nei livelli di VEGF e VEGFR. A livello globale, questi dati mostrano che l'analisi del polimorfismo dei geni VEGF e VEGFR può rappresentare una risorsa preziosa per identificare meglio i pazienti con HCC che hanno maggiori probabilità di beneficiare del trattamento con sorafenib. Questo strumento di selezione consentirebbe inoltre ai medici di candidare pazienti potenzialmente resistenti a diverse opzioni terapeutiche imminenti, migliorando i risultati ed evitando inutili tossicità [24].

Con lo studio ALICE-2 invece l'obiettivo era quello di definire un profilo prognostico dell'angiogenesi per identificare meglio i pazienti con carcinoma epatico con maggiori probabilità di trarre beneficio dal trattamento con Sorafenib: ciò che è emerso da questo studio è che l'analisi del polimorfismo dei geni HIF-1 α , VEGF e VEGFR può rappresentare un pannello prognostico per identificare meglio i pazienti con HCC che hanno maggiori probabilità di trarre beneficio dal trattamento con Sorafenib (figura 5). All'analisi multivariata rs12434438 di HIF1- α , rs2010963 di VEGF - A e rs4604006 di VEGF - C sono stati confermati come fattori predittivi indipendenti. All'analisi combinata di SNP significativi, la presenza di due alleli favorevoli di rs2010963 e rs4604006 di VEGF rispetto a un solo allele favorevole o a nessuno, è stata in grado di identificare

tre popolazioni separate di pazienti con diverso tempo alla progressione (TTP) (10,8 vs. 5,6 vs. 3,7 mesi, rispettivamente; $p < 0,0001$) e la sopravvivenza globale (OS) (rispettivamente 19,0 vs. 13,5 vs. 7,5 mesi; $p < 0,0001$). Inoltre, la presenza del genotipo GG di rs12434438 (HIF - 1 α) sembrava in grado di selezionare una popolazione con un esito particolarmente sfavorevole, indipendentemente dall'effetto clinico dei due SNP VEGF (TTP: 2,6 mesi, HR: 0,54, $p = 0,0374$; OS: 6,6 mesi, $p = 0,0061$, HR: 0,43) [27]. Sulla base dei dati disponibili, è stato ipotizzato che gli SNP del gene HIF-1 α potrebbero implicare una diversa sensibilità di HIF-1 α agli stimoli ipossici, portando ad una trascrizione eterogenea dei geni bersaglio, incluso VEGF. Studi recenti hanno dimostrato che gli SNP di HIF-1 α potrebbero portare a variazioni nel dominio di degradazione dipendente dall'ossigeno di HIF-1 α , influenzando di conseguenza l'espressione proteica [28]. Allo stesso modo, ci sono prove che diversi SNP nel gene HIF-1 α e nel VEGF potrebbero modificare i livelli circolanti di VEGF, influenzando così la risposta alle strategie di trattamento antiangiogenetico [25] [26]. Globalmente, quindi gli studi ALICE 1 e ALICE 2 potrebbero quindi essere considerati due studi complementari generatori di ipotesi in questo contesto. I principali limiti del secondo sono rappresentati dall'assenza di un braccio di controllo e dalla natura retrospettiva della ricerca. L'assenza di un braccio di controllo non consente di distinguere tra il ruolo prognostico e quello predittivo dei biomarcatori valutati, mentre la natura retrospettiva dell'analisi impedisce di raggiungere conclusioni definitive.

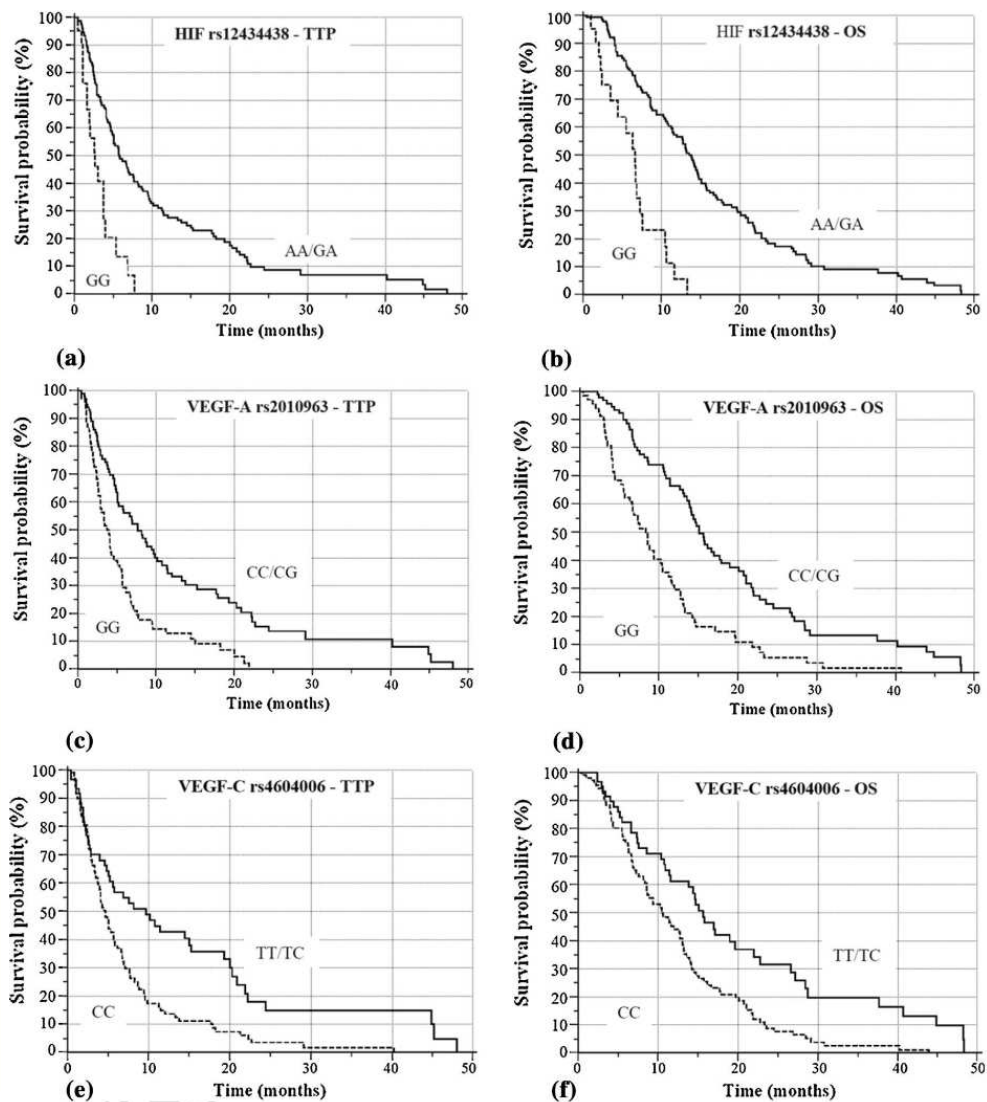


Figura 5. A) Tempo alla progressione (TTP) secondo i polimorfismi HIF rs12434438: genotipo AA/GA (linea continua) 5,8 mesi vs genotipo GG (linea tratteggiata) 2,6 mesi; $p < 0,0001$. B) Sopravvivenza globale (OS) secondo il polimorfismo HIF rs12434438: genotipo AA/GA (linea continua) 13,5 mesi vs genotipo GG (linea tratteggiata) 6,6 mesi; $p < 0,0001$. C) TTP secondo il polimorfismo VEGF-A rs2010963: genotipo CC/CG (linea continua) 7,6 mesi rispetto al genotipo GG (linea tratteggiata) 3,9 mesi; $p < 0,0001$. D) OS secondo il polimorfismo VEGF-A rs2010963: genotipo CC/CG (linea continua) 15,1 mesi rispetto al genotipo GG (linea tratteggiata) 8,4 mesi; $p < 0,0001$. E) TTP secondo il polimorfismo VEGF-C rs4604006: genotipo TT/TC (linea continua) 9,7 mesi vs genotipo CC (linea tratteggiata) 4,6 mesi; $p < 0,0001$. F) OS secondo il polimorfismo VEGF-C rs4604006: genotipo TT/TC (linea continua) 16,6 mesi rispetto al genotipo CC (linea tratteggiata) 10,5 mesi; $p < 0,0001$ [5].

Sempre sul fronte degli antiangiogenici, in merito alla possibilità di predire la risposta in seguito al trattamento con questi farmaci, sembra avere un ruolo anche la LDH: i dati provenienti da numerose analisi su diversi tipi di tumore sembrano suggerire che elevati livelli di LDH possano rappresentare un fattore prognostico negativo [29]. La lattico deidrogenasi (LDH) è un enzima glicolitico chiave nella conversione del piruvato in lattato in condizioni anaerobiche, sono state identificate cinque isoforme di LDH come risultato delle cinque diverse combinazioni di subunità polipeptidiche [30]. Nei modelli preclinici, è stato suggerito che la sovraregolazione dell'LDH garantisca sia un efficiente metabolismo anaerobico/glicolitico sia una ridotta dipendenza dall'ossigeno in condizioni ipossiche nelle cellule tumorali (figura 6); è stata infatti dimostrata una correlazione tra elevato volume del tumore, alta percentuale di necrosi, elevata espressione di LDH nel tumore e alti livelli sierici di LDH. Inoltre, ricordiamo che viene tipicamente rilasciato dalle cellule necrotiche. Il legame biologico tra ipossia, livelli di LDH e la via dell'angiogenesi guidata dal tumore attraverso l'attivazione anomala del fattore 1 inducibile dall'ipossia (HIF-1) è ben stabilito. L'attività biologica dell'HIF-1 è determinata dall'espressione e dall'attività della subunità α dell'HIF-1 [31]. HIF-1 α è un fattore essenziale che sovraregola una serie di geni coinvolti nel metabolismo energetico glicolitico, nell'angiogenesi, nell'eritropoiesi e nella sopravvivenza cellulare [32]. L'ipossia nel microambiente tumorale è sufficiente per attivare l'espressione dipendente dall'HIF di diversi geni sottoregolati [33]. Questi includono quelli che codificano per il fattore di crescita dell'endotelio vascolare, l'eritropoietina e molti enzimi coinvolti nel metabolismo del glucosio, del ferro e dei nucleotidi [34].

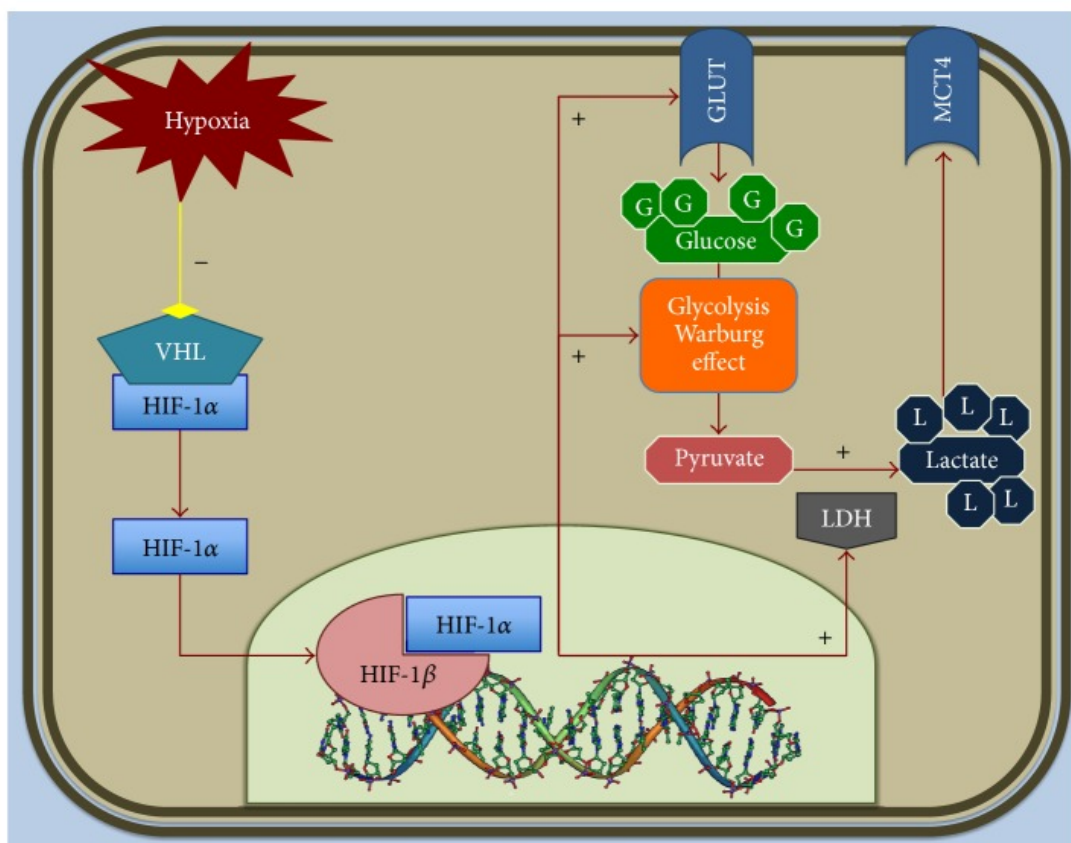


Fig. 6 L. Faloppi *et al.*, «Lactate Dehydrogenase in Hepatocellular Carcinoma: Something Old, Something New», *BioMed Res. Int.*, vol. 2016, pp. 1–7, 2016 [6].

Una forte associazione tra LDH e fenotipo aggressivo è stata riscontrata nel carcinoma gastrico [35], nel carcinoma del pancreas [36], mentre nel cancro del colon retto è associata ad un aumentato rischio di metastasi linfonodali e a distanza nonché ad una ridotta sopravvivenza globale mediana [37] [38].

In uno studio retrospettivo su 200 pazienti trattati con resezione epatica curativa, Wang *et al.* [39] hanno valutato diversi fattori sierici e clinici raccolti al basale prima del trattamento. I pazienti sono stati divisi in base alla sopravvivenza mediana libera da recidiva (RFS) nel gruppo con recidiva precoce (ER) e nel gruppo con recidiva non

precoce (non-ER). All'analisi multivariata, sono stati identificati cinque fattori prognostici avversi indipendenti per la recidiva precoce, tra cui la LDH (HR = 1,711, IC 95% = 1,170–2,502 e $p = 0,006$), il rapporto aspartato aminotransferasi (AST)/alanina aminotransferasi (ALT) (HR = 1,769, IC 95% = 1,180–2,540 e $p = 0,006$), alfa-fetoproteina (AFP) (HR = 2,079, IC 95% = 1,221–3,542 e $p = 0,007$), margine di resezione (HR = 2,354, IC al 95% = 1,490–3,719 e $p < 0,001$) e stadio TNM (HR = 2,164, IC al 95% = 1,463–3,201 e $p < 0,001$). Quindi anche qui viene ribadito il ruolo prognostico avverso dell'elevazione della LDH, ma in questo caso si parla di epatocarcinoma nello specifico, non solo di tumori del tratto gastrointestinale. Questo viene confermato ulteriormente in uno studio più ampio (323 pazienti) di Hu et al. [40], dove viene valutato il ruolo dei livelli sierici di LDH prima dell'intervento chirurgico. I pazienti sono stati classificati come gruppo con LDH alto (>240 U/L) e LDH basso (≤ 240 U/L). Tra questi due gruppi sono state osservate differenze significative nella dimensione del tumore, nell'incapsulamento, nel numero del tumore, nell'invasione vascolare e nello stadio del TNM ($p < 0,05$). La sopravvivenza libera da malattia (DFS) a 1, 3, 5 anni (24,3%, 13,5% e 12,2% contro 51,2%, 36,3% e 32,1%; $p < 0,001$) e la sopravvivenza globale (45,9%, 28,4% e 24,3% contro 78,3%, 51,8% e 43,7%; $p < 0,001$) dei pazienti con HCC nel gruppo LDH > 240 U/L erano più poveri di quelli nel gruppo LDH ≤ 240 U/L. L'analisi multivariata ha dimostrato che LDH > 240 U/L fungeva da indicatore prognostico indipendente della peggiore sopravvivenza libera da malattia (HR = 1,711, 95% CI = 1,275–2,297 e $p < 0,001$) e della sopravvivenza globale (HR = 1,568, 95% CI = 1,144–2,149 e $p = 0,005$). L'analisi di stratificazione ha mostrato che LDH ha mostrato un valore predittivo maggiore per DFS e OS nei pazienti con HCC con AFP < 200 ng/mL.

Il ruolo dell'LDH è stato valutato anche nei pazienti con HCC in fase avanzata in trattamento con TACE e terapia sistemica, perché si è visto che soltanto una piccola fetta di pazienti beneficia di questa procedura nel lungo termine, forse alcune risposte adattive legate all'ipossia possono rappresentare un fattore chiave per la resistenza, ma nello specifico il meccanismo molecolare alla base che spiega il fallimento non è chiaro [41] [42].

In questo contesto, il ruolo di LDH è stato valutato anche in uno studio retrospettivo, Scartozzi et al. [43], analizzando una popolazione di 114 pazienti consecutivi con HCC trattati con TACE dal 2002 al 2010. I pazienti sono stati classificati in base all'ECOG PS (performance status dell'Eastern Cooperative Oncology Group) e sono stati stadati utilizzando diversi sistemi di stadiazione: Child-Pugh, BCLC, Okuda, MELD (Model for End-Stage Liver Disease) e MELD-Na (Model for End -Stadio della malattia epatica, sodio). Sono stati registrati i livelli sierici di LDH prima (entro 1 mese prima del trattamento) e dopo (entro un mese dopo) il trattamento. I pazienti sono stati divisi in due gruppi, in base alla concentrazione sierica di LDH registrata prima della TACE. Il primo gruppo comprendeva pazienti con LDH pretrattamento \leq limite normale superiore di 450 U/L (gruppo A), mentre l'altro gruppo comprendeva pazienti con LDH pretrattamento $>$ 450 U/L (gruppo B). I pazienti sono stati inoltre classificati in base a qualsiasi variazione dei livelli sierici di LDH prima e dopo il trattamento (aumento rispetto a diminuzione). Nei pazienti con valori di LDH inferiori a 450 U/L, il tempo mediano alla progressione (TTP) era di 16,3 mesi, mentre era di 10,1 mesi nei pazienti al di sopra del cut-off ($p = 0,0085$). Di conseguenza, la sopravvivenza globale mediana (OS)

è stata di 22,4 mesi e 11,7 mesi rispettivamente nei gruppi A e B ($p = 0,0049$). Nei pazienti con valori di LDH diminuiti dopo il trattamento, il TTP mediano era di 12,4 mesi e l'OS mediana era di 22,1 mesi, mentre il TTP era di 9,1 mesi e l'OS era di 9,5 nei pazienti con livelli di LDH aumentati (TTP: $p = 0,0087$; OS: $p = 0,0001$). Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i gruppi di pazienti per tutte le caratteristiche cliniche analizzate (sesso, età mediana, performance status ECOG, sistemi di stadiazione e tipologia di TACE eseguita).

Per quanto concerne la terapia sistemica, i benefici clinici di Sorafenib non sembrano influenzati dai livelli basali di LDH, ma una loro diminuzione potrebbe essere associata a un miglioramento degli esiti clinici [29].

In conclusione, dopo queste conferme, l'LDH dovrebbe essere considerata una variabile biologica rilevante da includere nel quadro di base dei pazienti con HCC, con l'obiettivo di stratificare meglio i pazienti inclusi negli studi clinici e di definire meglio la strategia terapeutica più appropriata.

Resta di fatto, però, che non vi sono indicazioni definitive in merito a quale sia l'applicabilità di questi fattori presi in esame nella pratica clinica, ma soprattutto se i risultati ottenuti in analisi condotte su pazienti trattati con altri angiogenici siano applicabili al Bevacizumab.

Sul versante relativo al Bevacizumab, nell'ambito degli esami di laboratorio che potrebbero essere utili nella stima del possibile vantaggio dato dal farmaco, i livelli di albumina e della fosfatasi alcalina potrebbero avere un particolare ruolo: oltre a far

parte degli indici necessari per il calcolo dei più comuni score per la stima della funzionalità epatica (Child-Pugh, MELD, ALBI per quanto riguarda l'albumina), precedenti esperienze condotte in pazienti trattati con Bevacizumab negli studi registrativi in cui il farmaco è stato impiegato per il trattamento del carcinoma colico, renale, polmonare e mammario, hanno portato a stimare che la *clearance del Bevacizumab* ed il *volume di distribuzione del farmaco*, sono direttamente correlati, oltre che con il peso del paziente, anche con i livelli di albumina e di fosfatasi alcalina: nello specifico, essendo il Bevacizumab un anticorpo monoclonale ed essendo eliminato come tutti gli anticorpi dal sistema reticolo-endoteliale, la quota di farmaco che viene eliminata è correlata sia con i livelli di albumina (a cui è legato in percentuale variabile) sia con i livelli di fosfatasi alcalina (che apparentemente “protegge” dall'eventuale degradazione del farmaco). In base alla clearance ed al volume di distribuzione stimabile attraverso questi parametri, pur non avendo un parametro in grado di predire l'efficacia del trattamento con Bevacizumab, si avrebbe comunque un dato obiettivamente sulla rapida o meno eliminazione del farmaco dal circolo e sulla possibilità o meno pertanto che possa mantenersi a concentrazioni sufficientemente alte da poter aver un effetto, condizionando quindi inevitabilmente anche la prognosi.

Inoltre, come descritto nell'articolo di Jian-Feng Lu et al. [44] il peso corporeo e il sesso sono le covariate più importanti per spiegare la variabilità interindividuale per la clearance del Bevacizumab, che per un peso corporeo estremo (da 49 a 114 kg) era fino al 30% attorno al valore tipico. Dopo l'aggiustamento per il peso, il sesso è risultato rimanere un effetto significativo, con una clearance più veloce del 26% nei maschi

rispetto alle femmine, correlabile con una maggiore massa muscolare nei primi rispetto alle seconde. I parametri farmacocinetici di popolazione per bevacizumab sono simili a quelli per altri anticorpi IgG [45] I pazienti con basse concentrazioni di albumina sierica (≤ 29 g/L) o con elevate concentrazioni di fosfatasi alcalina sierica (≥ 483 U/L), nello studio hanno avuto un aumento della clearance di circa il 20% rispetto a un paziente tipico. Bassi livelli di albumina (un segno di infiammazione) e livelli elevati di fosfatasi alcalina risultano essere correlati con la gravità della malattia e con il carico tumorale. Quindi peso e sesso sono le covariate con la maggiore influenza sulla clearance e sul volume di distribuzione del compartimento centrale di Bevacizumab, supportando il dosaggio di questo basato sul peso corporeo.

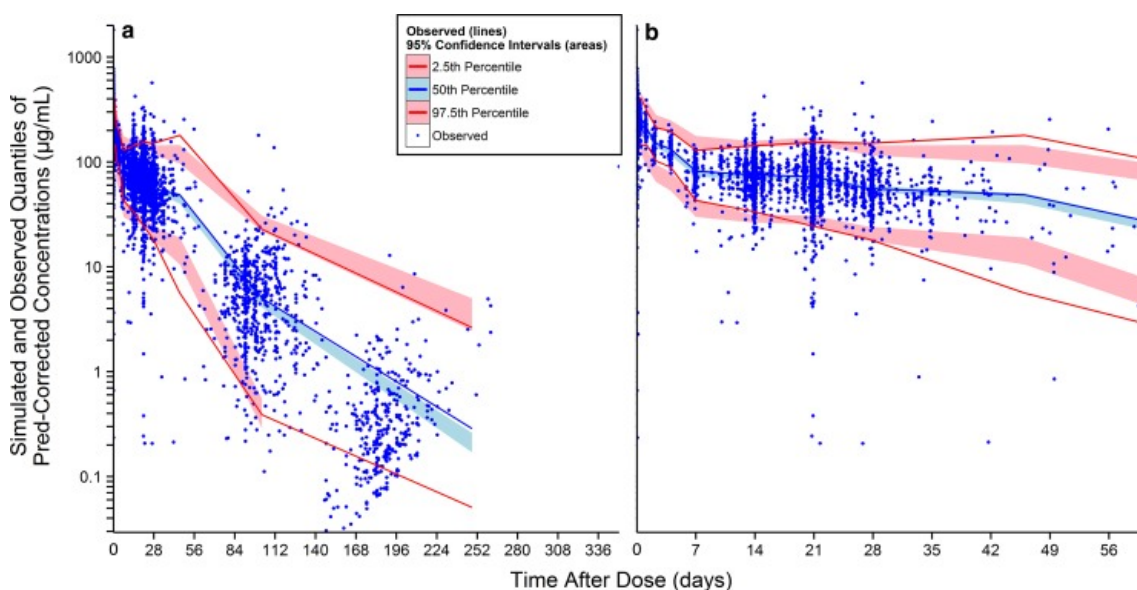


Fig.7 Controllo predittivo visivo corretto per la previsione dei profili concentrazione sierica-tempo di Bevacizumab utilizzando il modello finale in pazienti adulti affetti da cancro. Previsione della popolazione; la figura a destra è la parte della figura a sinistra durante i primi 2 mesi dopo la dose. K. Han *et al.*, «Population pharmacokinetics of bevacizumab in cancer patients with external validation», *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 78, fasc. 2, pp. 341–351, ago. 2016,doi: 10.1007/s00280-016-3079-6 [7].

Tutto ciò che è stato in precedenza riportato è confermato anche dallo studio di Kelong Han et al. [1]. Infatti i fattori significativamente associati alla farmacocinetica di Bevacizumab confermano quelli precedentemente pubblicati [44] (figura7): clearance e volume di distribuzione aumentano con il peso e sono più alti nei maschi, mentre la clearance diminuisce con l'aumento dell'albumina e la diminuzione della fosfatasi alcalina, la quale è probabile perché è un indicatore del carico di malattia, come metastasi epatiche o ossee. È noto che la clearance di altri anticorpi IgG è più rapida nei pazienti con livelli di albumina sierica più bassi [46], per due ragioni: in primo luogo, il livello di albumina è correlato allo stato della malattia, inoltre il riciclo dell'albumina e delle IgG è entrambi mediato dall'FcRn (recettore neonatale dell'Fc) e pertanto i livelli di albumina possono riflettere l'abbondanza e l'efficienza di FcRn.

4. PAZIENTI E METODI

4.1 Pazienti

Si tratta di uno studio osservazionale retrospettivo, nel quale sono stati arruolati i pazienti affetti da epatocarcinoma stadio BCLC C o B, che abbiano ricevuto in prima linea di trattamento il trattamento medico con Atezolizumab- Bevacizumab.

Criteri d'inclusione per l'inserimento nello studio:

- Età maggiore di 18 anni
- Paziente con epatocarcinoma stadio BCLC-C o BCLC-B non suscettibile di altri trattamenti se non la terapia sistemica, che abbia ricevuto trattamento con

Atezolizumab+Bevacizumab di prima linea con finalità giudicate palliative all'inizio della terapia. L'analisi è stata condotta mediante metodo "intention-to-treat" ed ha incluso anche pazienti che abbiamo solo iniziato terapia con Atezolizumab+Bevacizumab e l'abbiano sospeso per cause non direttamente correlate ad una progressione radiologica di malattia (es. pazienti che in seguito a downstaging siano andati a ricevere successivamente all'inizio di trattamento medico anche procedure a finalità di radicalizzazione di malattia come chirurgia o trattamento locoregionale).

Per tutti i pazienti è stata prevista una rivalutazione strumentale con una TC per valutare l'andamento della malattia, dopo 3 mesi dall'inizio del trattamento sistemico.

4.2 Metodi

I dati clinici sono stati raccolti e analizzati presso la Clinica Oncologica- Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche - Università Politecnica delle Marche.

I dati clinici relativi ai pazienti sono stati trattati in forma totalmente anonima, identificati mediante numerazione progressiva ed in assenza di fattori che possano ricondurre all'identificazione del paziente. I dati clinici che sono stati ritenuti rilevanti ai fini della stratificazione prognostica sono l'età ed il sesso del paziente, l'eziologia di HCC, il CTP e stadio BCLC all'inizio del trattamento con Atezolizumab+Bevacizumab ed il performance status del paziente (stimato attraverso scala ECOG PS). Gli esami di

laboratorio scelti sono quelli relativi al calcolo del volume di distribuzione e clearance del Bevacizumab come identificati dalla formula sottostante (albumina, fosfatasi alcalina) e quelli relativi agli indici di infiammazione (valore assoluto neutrofili, valore assoluto linfociti, rapporto neutrofili/linfociti, PCR).

Il Calcolo della clearance della creatinina è stato ottenuto con la formula seguente, derivata da studi retrospettivi già pubblicati in letteratura:

$$\text{CLi} = 8.60 \times \text{BWTi}^{0.70} \times \text{ALBUi}^{0.39} \times \text{In}(\text{BALPi})^{-0.473} \times \text{In}(109)^{0.312} \times (1.14 \text{ for males}) \times (0.844 \text{ for interferon alpha treatment}) \quad [1]$$

Il Volume di distribuzione è stato ottenuto con la formula seguente, anche questa derivata da studi già pubblicati:

$$\text{V1i} = 2678 \times \text{BWTi}^{0.70} \times (1.18 \text{ for males})$$

Il Tempo di estrazione è stato calcolato con il rapporto tra V1i/CLi

Per l'identificazione dei cut-off da applicare ai valori degli esami di laboratorio raccolti (PCR, neutrofili/linfociti, albumina, fosfatasi alcalina), per quelli con una distribuzione normale (valutata sec. metodo Shapiro-Wilk) si è applicato il valore mediano della distribuzione. In caso di distribuzione non normale si calcola il cut-off con sistema della

curva ROC mettendo come variabile di selezione l'aver ottenuto una stabilità o risposta parziale/completa alla prima rivalutazione strumentale. La sopravvivenza dei pazienti (OS) è stata calcolata con il metodo di Kaplan-Meier a partire dal giorno di inizio del trattamento con Atezolizumab+Bevacizumab fino al decesso o, per i pazienti persi al follow-up, la data dell'ultimo appuntamento noto per il paziente. La sopravvivenza libera da progressione (PFS), altro parametro epidemiologico di valutazione dell'efficacia degli interventi terapeutici, rappresenta il tempo tra l'inizio del trattamento con la prima linea, fino alla progressione della malattia.

L'associazione con le misure di sopravvivenza è stata valutata in forma univariata mediante log-rank test.

5.RISULTATI

Ad oggi sono stati arruolati 14 pazienti, in trattamento presso la Clinica Oncologica di Ancona con le seguenti caratteristiche:

- 11 maschi, 3 femmine;
- Età mediana 67 anni (range 54-79 anni)
- 5 affetti da infezione virale con virus epatotropi;
- 9 con condizioni dismetaboliche, potus e/o fumo alla valutazione basale;
- 1 epatopatia criptogenica;

- 6 affetti da cirrosi;
- Stadio BCLC all'esordio della malattia: un solo paziente allo stadio B, gli altri 13 presentavano uno stadio C, di cui uno con diffusione metastatica e lesione principale 16X15 cm;
- Stadio BCLC all'inizio della prima linea: un paziente in stadio BCLC A ma non suscettibile di altre opzioni di trattamento, 4 in stadio BCLC B di cui 2 con masse troppo voluminose per ulteriori trattamenti locoregionali o troppo numerose ed i rimanenti 9 pazienti con stadio BCLC C;
- CHILD PUGH A;
- Livelli di Alfafetoproteina (AFP) alla diagnosi da 2 a >20000 ng/ml;
- Nessun paziente era stato sottoposto a trapianto prima di essere incluso nello studio;
- 2 pazienti erano stati sottoposti a chirurgia in precedenza per malattia resecabile, ma poi sono successivamente ricaduti;
- Nessun paziente era stato sottoposto ad alcolizzazione percutanea epatica;
- 3 con malattia metastatica all'inizio della prima linea;
- 3 con trombosi portale;

- ECOG PS all'inizio della prima linea: quasi tutti 0, due pazienti con 1, tre pazienti con 2;
- Nessun paziente presentava encefalopatia;
- Un paziente con ascite all'inizio della prima linea;
- 4 pazienti con bilirubina >1 mg/dl

Venendo al focus del nostro studio, secondo l'ipotesi alla base della nostra indagine i pazienti con i tempi di estrazione del farmaco più lunghi dovrebbero avere anche una prognosi migliore, mentre i pazienti che eliminano il farmaco più velocemente dovrebbero avere una prognosi peggiore.

Quindi, la prima cosa che è stata calcolata è la clearance del farmaco: i dati ottenuti dal calcolo della clearance del Bevacizumab sono stati analizzati con il test di Shapiro Wilk, ovvero uno dei test più importanti per la verifica della normalità soprattutto per piccoli campioni [47], da questo è emerso che la curva della distribuzione dei valori è una curva a campana, perciò con una distribuzione normale. Partendo da questo presupposto si è poi applicato il valore mediano della distribuzione.

Nella formula che abbiamo impiegato per calcolare la clearance sono incluse l'albumina, la fosfatasi alcalina, il genere e il peso.

Dall'analisi dei valori di clearance del farmaco, è emerso che:

- il valore più basso che risulta essere di 22,7262 ml/h

- quello più alto 46,7306 ml/h
- l'intervallo di confidenza (IC) del 95%
- la mediana è di 31,1416 ml/h con IC del 95%

Dall'analisi dei valori del volume di distribuzione, è emerso che:

- il valore più basso risulta essere 2307,6635 ml
- quello più alto 3506,6259 ml
- la mediana 2926,9191 ml con IC del 95%

Attraverso queste due formule, si ricavano rispettivamente la clearance e il volume di distribuzione del farmaco; successivamente, facendo il rapporto tra le due, otteniamo il tempo di estrazione: quest'ultimo non è altro che il tempo impiegato dall'organismo per smaltire il farmaco e "ripulire" quel volume.

Dall'analisi dei valori del tempo di estrazione, è emerso che:

- il valore più basso è di 65,7674 h
- quello più alto più alto di 127,0836 h
- la mediana 94,4267h con IC del 95%

La clearance del Bevacizumab ha una distribuzione dei valori normale con una curva a campana che ci permette di applicare il valore mediano della distribuzione al tempo di estrazione, che è il parametro ricavato dal rapporto tra la clearance e il volume di distribuzione: il cut-off che abbiamo scelto è a 94,42.

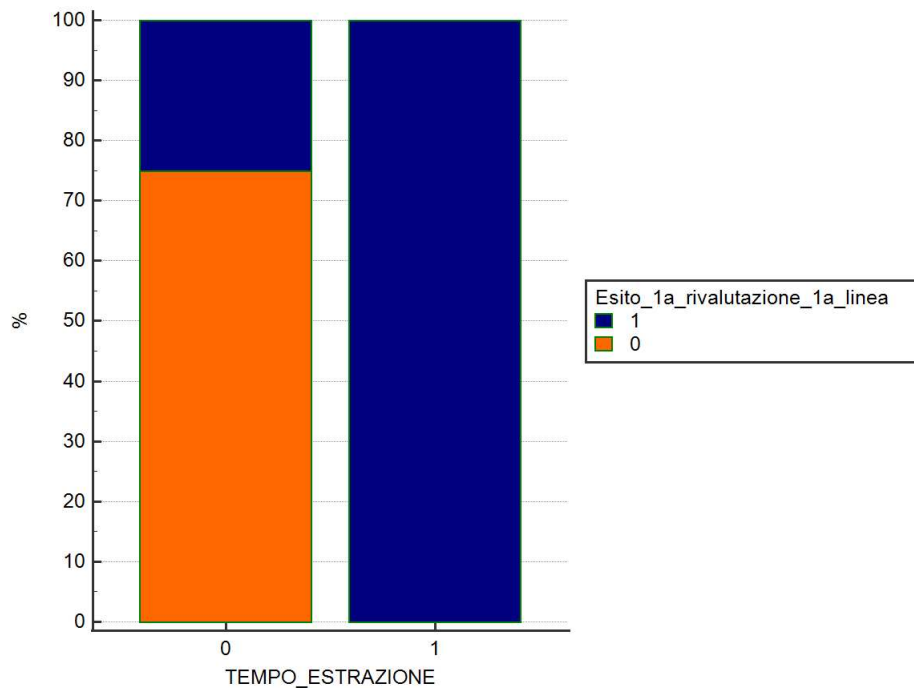


Figura 8 Grafico che mostra il rapporto tra il tempo di estrazione e il tasso di controllo della malattia (Disease control rate, DCR).

La probabilità di ottenere il controllo di malattia è stata valutabile nei 9 pazienti dei 14 totali di cui era disponibile la rivalutazione radiologica. Di questi 9 in 6 (66,7%) si è osservata o una stabilità di malattia o una risposta parziale/completa (valutata sec. Criteri RECIST) negli altri 3 (33,3%) si è osservata una progressione di malattia.

Dei 6 che hanno un buon controllo di malattia, 5 hanno un tempo di estrazione alto, cioè sopra la mediana, mentre l'unico restante ha un tempo di estrazione basso: questi corrispondono rispettivamente al 100% dei pazienti del gruppo con tempi di estrazione maggiore rispetto al 25% di quelli con tempi di estrazione più brevi. La differenza tra queste proporzioni è significativamente diversa al test esatto di Fisher ($p=0.047$).

Questo suggerisce che pazienti con tempi di estrazione più lunghi potrebbero avere maggior beneficio dal trattamento (e di converso che pazienti con tempi di estrazione più brevi potrebbero avere minore beneficio dal trattamento).

Anche se il tempo di follow-up è relativamente contenuto, si è osservato un comportamento analogo anche prendendo in considerazione le analisi di sopravvivenza.

Relativamente alla PFS, la stessa risulta essere inferiore nei pazienti che hanno mediana col tempo di estrazione più breve.

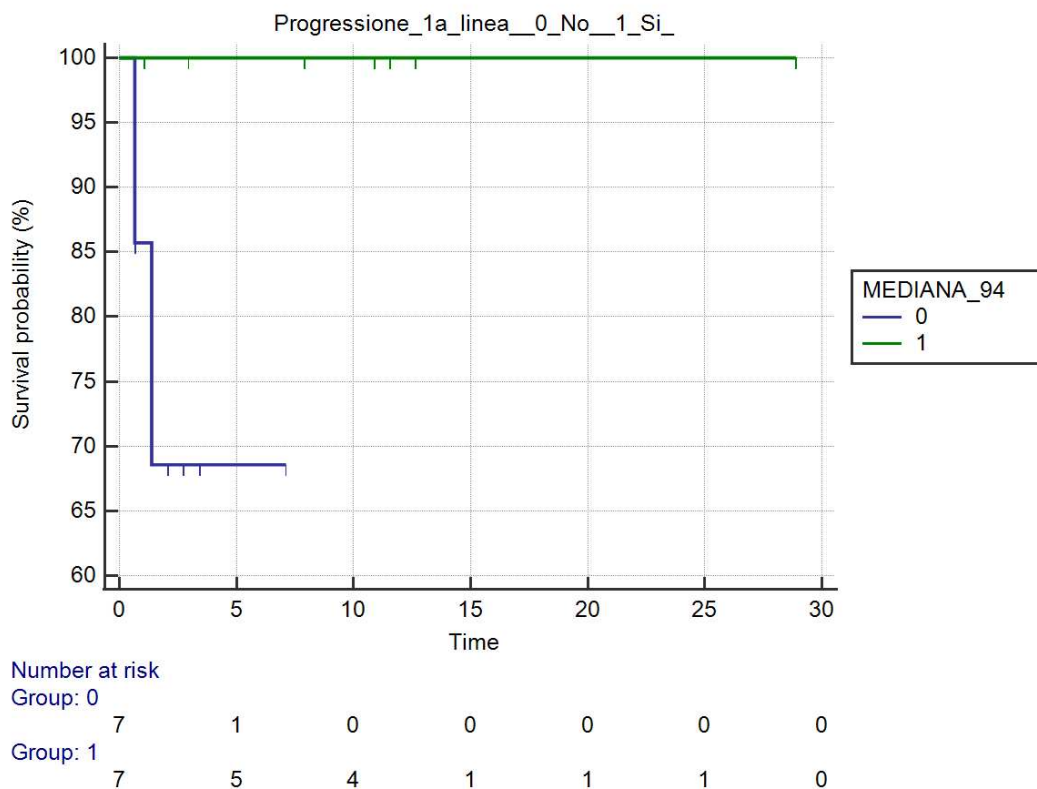


Figura 9. Curva di PFS per mediana e tempo di estrazione. Mostra che il gruppo 0 (quello sotto la mediana col tempo di estrazione più breve) risponde meno efficacemente al farmaco e sviluppa progressione di malattia più precocemente, con probabilità di sopravvivenza libera da progressione inferiore rispetto al gruppo 1.

I pazienti del gruppo 0 hanno una PFS media di 5,208 con un errore standard (SE) di 1,126 e un intervallo di confidenza (IC) del 95% tra 3,002 e 7,415; quelli del gruppo 1 invece hanno una PFS media di 28,885 con un SE di 0,000 e un IC del 95% da 28,885 a 28,885. Sul totale la media risulta essere di 24,547 con un SE di 2,835 e un IC del 95% tra 18,990 e 30,104

Anche per l'OS le curve che rappresentano la probabilità di sopravvivenza mostrano una sopravvivenza superiore nei pazienti con tempo di estrazione più lungo.

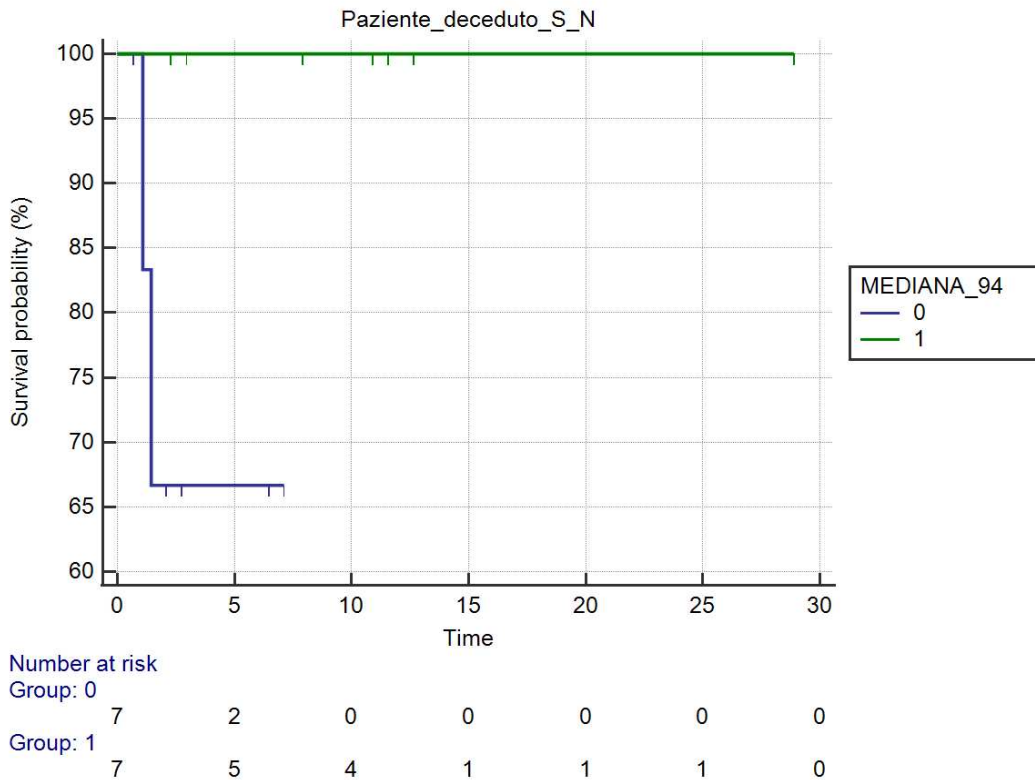


Figura 10. Curve di OS per mediana e tempo di estrazione. Il gruppo 1 (con un tempo di estrazione più lungo) ha una sopravvivenza superiore al gruppo 0 che ha un tempo di estrazione più breve.

I pazienti del gruppo 0 hanno una OS media di 5,164 con un errore standard (SE) di 1,127 e un intervallo di confidenza (IC) del 95% tra 2,955 e 7,373; quelli del gruppo 1 invece hanno una media di 28,885 con un SE di 0,000 e un IC del 95% da 28,885 a 28,885. Sul totale la media risulta essere di 24,636 con un SE di 2,764 e un IC del 95% tra 19,218 e 30,053.

Per entrambe le analisi il tempo di osservazione limitato ed il numero di eventi limitato non consente di trarre conclusioni circa la significatività statistica del trend di divergenza delle curve di sopravvivenza osservato.

6.DISCUSSIONE

Obiettivo dello studio era valutare se la stima della clearance del Bevacizumab abbia un ruolo nel predire la prognosi dei pazienti trattati con la combinazione Atezolizumab-Bevacizumab.

Analizzando i risultati e confrontandoli con le evidenze scientifiche già presenti in letteratura, quali gli studi di Jian-Feng Lu et al. [44] e di Kelong Han et al. [1], si evince che la clearance dovrebbe essere considerata come un fattore per valutare la prognosi di questi pazienti.

Tramite il rapporto tra la clearance del Bevacizumab e il suo volume di distribuzione è stato ricavato il tempo di estrazione del farmaco, in base alla mediana della distribuzione dei valori sono stati stratificati i pazienti in chi ha un tempo di estrazione ridotto e quindi sotto la mediana, e in chi ha un tempo di estrazione più lungo.

Tutto ciò ci ha poi condotto ad analizzare l'andamento di questi due gruppi di pazienti tramite tre parametri: infatti mediante i criteri RECIST modificati sono state valutate le risposte obiettive e con il metodo di Kaplan-Meier sono state calcolate PFS e OS. Queste misure di attività ed efficacia del trattamento sono state messe in correlazione con i tempi di estrazione del Bevacizumab maggiori o minori della mediana.

In particolare, è emerso che i pazienti con tempi di estrazione maggiori hanno anche maggiori probabilità di controllo di malattia e di sopravvivenza libera da progressione e globale.

Nel complesso, i nostri dati suggeriscono che i pazienti che presentano una clearance più rapida del farmaco hanno un beneficio inferiore rispetto a coloro che hanno una clearance più lenta suggerendo che la clearance del Bevacizumab possa rappresentare un fattore importante da considerare in termini di prognosi.

E' importante sottolineare che le formule per il calcolo dei parametri farmacocinetici che abbiamo utilizzato nell'analisi, si riferiscono a studi retrospettivi condotti su pazienti trattati con Bevacizumab sia in altri setting tumorali [45] ma anche con farmaco diverso: nello studio di Kelong Han infatti i pazienti avevano ricevuto tutti Bevacizumab "originator", mentre i nostri dati che sembrerebbero confermare una possibile applicabilità della stima delle misure farmacocinetiche del Bevacizumab nell'influenzare la prognosi dei pazienti trattati con Atezolizumab+Bevacizumab, sono stati condotti in una popolazione di pazienti trattati con Bevacizumab biosimilare (Brand VIATRIS), di cui al momento mancano studi di confronto nel setting del trattamento dell'epatocarcinoma.

I limiti della nostra analisi sono rappresentati dal numero di pazienti inclusi (che è in aumento dato che lo studio è ancora in corso) e dal tempo di follow-up relativamente esiguo che pertanto non consente di valutare in maniera statisticamente significativa se esista differenza anche in sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale, oltre che in termini di “disease control rate” tra i pazienti con tempi di estrazione del Bevacizumab maggiori o minori. In particolare, abbiamo stimato che se si considera che nello studio IMBRAVE150 che ha impiegato la combinazione di Atezolizumab+Bevacizumab in 1° linea di trattamento, circa il 67% dei pazienti sono risultati vivi ad un anno dall’inizio della terapia, se ipotizziamo che i pazienti a migliore predizione prognostica (clearance del Bevacizumab ridotta) abbiano 75% di probabilità di essere vivi ad 1 anno dall’inizio della terapia e che circa il 40% siano vivi nel gruppo a predizione prognostica sfavorevole (che rappresenta la probabilità di sopravvivenza ad un anno dei pazienti nello studio SHARP che avevano ricevuto il solo placebo), con alfa pari a 0.05 e Beta pari a 0.90, sono necessari almeno 114 pazienti per rigettare l’ipotesi nulla. Se si considera l’attuale andamento delle curve di sopravvivenza della popolazione finora arruolata a 5 mesi dall’inizio dell’osservazione risultano vivi il 100% dei pazienti con tempi di estrazione maggiori contro solo il 60% dei pazienti con tempi di estrazione più brevi.

Quindi nel complesso questo studio può essere considerato un tassello di un puzzle molto più grande nel quale viene valutato se i valori di alcuni esami di laboratorio (PCR, conta neutrofili e linfociti, albumina e fosfatasi alcalina) possano influenzare la sopravvivenza dei pazienti che hanno ricevuto Atezolizumab+Bevacizumab a finalità palliative.

Inoltre, il contributo informativo derivante da tutte queste analisi potrà a sua volta essere importante per stimare il vantaggio in outcome dato dai singoli farmaci della suddetta combinazione.

Infatti proprio le novità in termini di trattamento di questa patologia per la quale fino ad ora era stato impiegato Sorafenib come prima linea, portano anche alla necessità di studiare ed analizzare le combinazioni di antiangiogenici e di immunoterapici al fine di individuare dati oggettivi per orientare i clinici, sia per quanto riguarda il trattamento finalizzato ad allungare la sopravvivenza, sia per ridurre il più possibile la tossicità laddove il labile equilibrio tra questa e il beneficio derivante dal trattamento si sbilancia a favore della prima.

Nel trattamento di prima linea per HCC troviamo anche Lenvatinib, ma diversi studi mostrano come la combinazione di Atezolizumab+Bevacizumab sia più efficace di Lenvatinib da solo: quindi dimostrano che l'associazione dell'immunoterapico all'antiangiogenico sta dando effettivamente dei risultati migliori. Tra questi ricordiamo lo studio di Hiraoka et al. [48] nel quale viene confrontata l'efficacia terapeutica tra Atezolizumab più Bevacizumab e il trattamento con Lenvatinib (figura 11) somministrato come terapia di prima linea per il carcinoma epatocellulare non resecabile per quanto riguarda la sopravvivenza globale (OS). Sebbene le risposte tumorali non abbiano mostrato differenze significative tra i due gruppi, il gruppo Atezo-Beva ha mostrato tassi di OS migliori dopo l'aggiustamento con probabilità inversa IPW (0,5-1-1,5 anni: 89,6%/67,2%/58,1% vs. 77,8%/66,2%/52,7%, $p = 0,002$). Il gruppo in trattamento con la

combinazione ha mostrato una migliore OS come trattamento di prima linea rispetto al gruppo Lenvatinib.

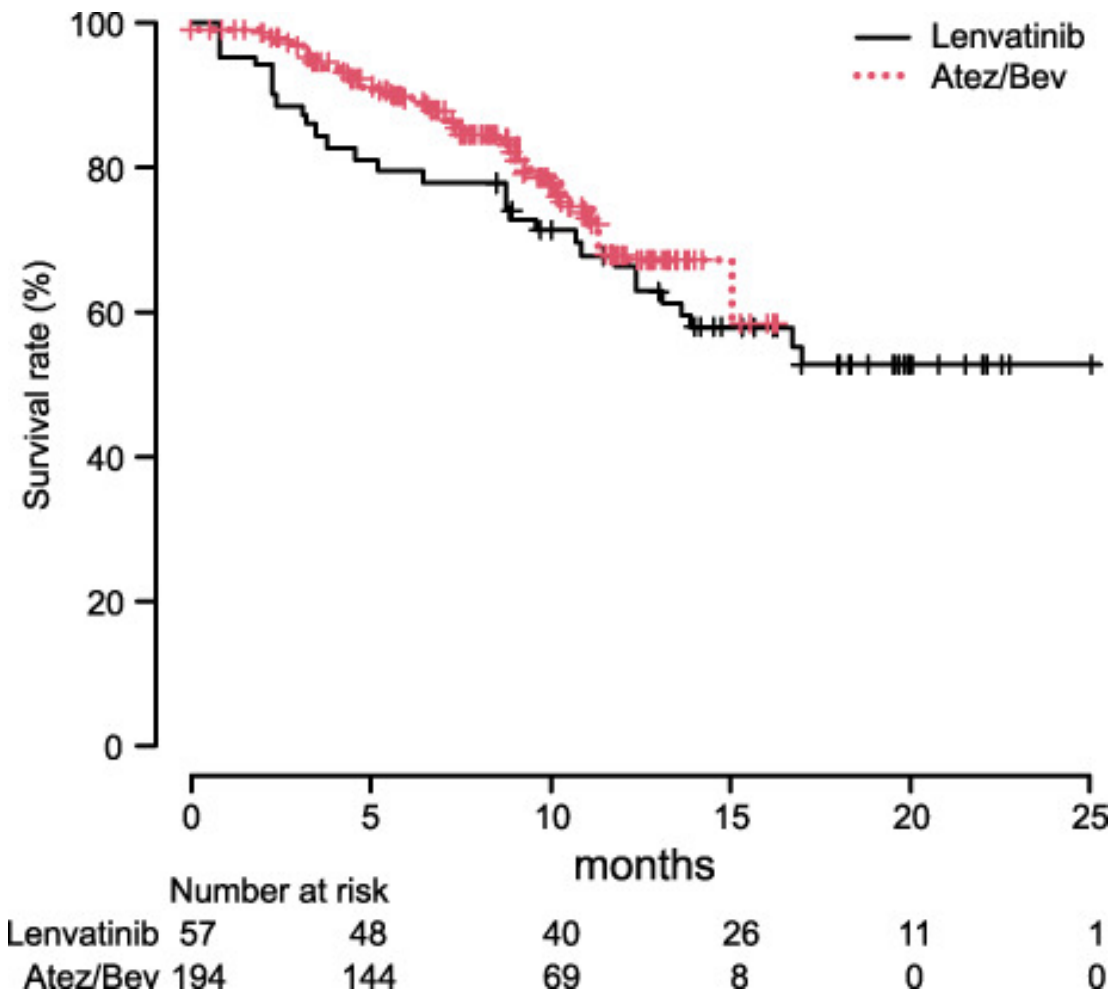


Fig. 11 Hiraoka *et al.*, «Does first-line treatment have prognostic impact for unresectable HCC ?—Atezolizumab plus bevacizumab versus lenvatinib», *Cancer Med.*, vol. 12, fasc. 1, pp. 325–334, gen. 2023, doi: 10.1002/cam4.4854 [8].

I presupposti pre-clinici di un possibile effetto sinergico dei due farmaci sono legati all'evidenza che, in seguito all'effetto antiangiogenico mediato da Bevacizumab si osserva un aumento di espressione di PD-L1 che rappresenta con l'asse PD-L1/PD-1 il bersaglio della terapia a base di Atezolizumab.

Alcuni studi come il LEAP-02 mettono però in discussione tale ipotesi: nonostante sia basato su una combinazione di farmaci diversa, ovvero Pembrolizumab+Lenvatinib, non si è mostrato un vantaggio statisticamente significativo dall'impiego concomitante di immunoterapia+antiangiogenico rispetto alla sola terapia con antiangiogenico (il Lenvatinib) [17]. Quindi questo effetto sinergico che è stato documentato nel caso di Bevacizumab e che ci ha portato a ipotizzare che si realizzasse anche con gli altri antiangiogenici, ipotesi che LEAP-02 ha confutato, ci fa invece presupporre che sia osservabile solo se l'effetto antiangiogenico viene mediato da Bevacizumab.

Il Bevacizumab viene eliminato dal sistema reticoloendoteliale (sistema fagocitario mononucleare), ovvero un sistema funzionale dell'organismo facente parte del sistema immunitario, privo di una sede anatomica ben definita: ciò significa che non è eliminato primariamente dal fegato come altri farmaci; il presente studio evidenzia, infatti, l'importanza della clearance, quindi della sua eliminazione renale come possibile fattore prognostico. Questa diversa farmacocinetica può far sì che in questa patologia l'impiego di questo farmaco determini degli effetti migliori rispetto ad altri farmaci della stessa categoria ma con una farmacocinetica differente, come ad esempio Sorafenib o Lenvatinib per i quali l'azione del fegato ha un ruolo cruciale. Per cui sembrerebbe che cambiando il meccanismo di eliminazione cambi anche l'impatto del farmaco sulla malattia.

Lo studio Leap-02, confronta la combinazione Pembrolizumab+Lenvatinib contro la sola terapia con Lenvatinib [17] e, come sopra citato, non conferma l'efficacia terapeutica della combinazione di immunoterapia+antiangiogenico; questo studio è però condotto

con Pembrolizumab che è un immunoterapico che nell'HCC ha un'importanza ridimensionata [49] rispetto a quello che ha negli altri tumori, per esempio nella prostata [50], elemento da tenere in considerazione per fare delle opportune valutazioni circa l'efficacia della combinazione tra immunoterapico+antiangiogenico

Quindi, da queste valutazioni emerge che nell'epatocarcinoma l'impiego di farmaci diversi, seppur della stessa categoria, sembra avere poi un esito e un impatto differente: stessa categoria ma farmaci differenti, con risultati differenti.

7. CONCLUSIONI

In conclusione, i nostri dati evidenziano che chi presenta una clearance più rapida di Bevacizumab potrebbe avere un beneficio inferiore dalla combinazione rispetto a chi la presenta più lenta, suggerendone il possibile ruolo prognostico nei pazienti affetti da HCC.

ICONOGRAFIA

[1] Fig.1 Robbins e Cotran, *Atlante di Anatomia Patologica*. Losi, Lorena, 2016.

[2] Fig.2 Maria Reig, Alejandro Forner, Jordi Rimola, Joana Ferrer-Fàbrega, Marta Burrel, Ángeles Garcia-Criado, Robin K. Kelley, Peter R. Galle, Vincenzo Mazzaferro, Riad Salem, Bruno Sangro, Amit G. Singal, Arndt Vogel, Josep Fuster, Carmen Ayuso, Jordi Bruix: BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *In: Journal of Hepatology*, vol. 76, no 3, pp. 681 – 693, 2022, ISSN: 01688278, (Cited by: 118; All Open Access, Bronze Open Access).

- [3] Fig.3 R. S. Finn *et al.*, «Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma», *N. Engl. J. Med.*, vol. 382, fasc. 20, pp. 1894–1905, mag. 2020, doi: 10.1056/NEJMoa1915745
- [4] Fig. 4 G. K. Abou-Alfa *et al.*, «Tremelimumab plus Durvalumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma», *NEJM Evid.*, vol. 1, fasc. 8, lug. 2022, doi: 10.1056/EVIDoa2100070.
- [5] Fig.5 L. Faloppi *et al.*, «Angiogenesis Genotyping and Clinical Outcomes in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma Receiving Sorafenib: The ALICE-2 Study», *Target. Oncol.*, vol. 15, fasc. 1, pp. 115–126, feb. 2020, doi: 10.1007/s11523-020-00698-x.
- [6] Fig. 6 L. Faloppi *et al.*, «Lactate Dehydrogenase in Hepatocellular Carcinoma: Something Old, Something New», *BioMed Res. Int.*, vol. 2016, pp. 1–7, 2016
- [7] Fig.7 Controllo predittivo visivo corretto per la previsione dei profili concentrazione sierica-tempo di Bevacizumab utilizzando il modello finale in pazienti adulti affetti da cancro. Previsione della popolazione; la figura a destra è la parte della figura a sinistra durante i primi 2 mesi dopo la dose. K. Han *et al.*, «Population pharmacokinetics of bevacizumab in cancer patients with external validation», *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 78, fasc. 2, pp. 341–351, ago. 2016, doi: 10.1007/s00280-016-3079-6.
- [8] Fig.11 Hiraoka *et al.*, «Does first-line treatment have prognostic impact for unresectable HCC ?—Atezolizumab plus bevacizumab versus lenvatinib», *Cancer Med.*, vol. 12, fasc. 1, pp. 325–334, gen. 2023, doi: 10.1002/cam4.4854.

BIBLIOGRAFIA

- [1] K. Han *et al.*, «Population pharmacokinetics of bevacizumab in cancer patients with external validation», *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 78, fasc. 2, pp. 341–351, ago. 2016, doi: 10.1007/s00280-016-3079-6.
- [2] «Linee Guida AISF-AIOM 2023 (LG97_AISF-AIOM_Epatocarcinoma)».
- [3] «Linee Guida AIOM 2019 (2019_LG_AIOM_Epatocarcinoma)».
- [4] «AIOM-ARTIUM. I numeri del cancro in Italia 2022».
- [5] G. Kim, S.-Y. Jang, C. M. Nam, e E. S. Kang, «Statin use and the risk of hepatocellular carcinoma in patients at high risk: A nationwide nested case-control study», *J. Hepatol.*, vol. 68, fasc. 3, pp. 476–484, mar. 2018, doi: 10.1016/j.jhep.2017.10.018.
- [6] J. Hirosumi *et al.*, «A central role for JNK in obesity and insulin resistance», *Nature*, vol. 420, fasc. 6913, pp. 333–336, nov. 2002, doi: 10.1038/nature01137.
- [7] P. Nahon, M. Allaire, J.-C. Nault, e V. Paradis, «Characterizing the mechanism behind the progression of NAFLD to hepatocellular carcinoma», *Hepatic Oncol.*, vol. 7, fasc. 4, p. HEP36, dic. 2020, doi: 10.2217/hep-2020-0017.
- [8] Robbins e Cotran, *Atlante di Anatomia Patologica*. Losi, Lorena, 2016.
- [9] Bruix, J. and M. Sherman, «Management of hepatocellular carcinoma», *Hepatology*, 2006.
- [10] Llovet, J.M., M.I. Real, X. Montana, et al., «Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial.», *Lancet*, 2002.
- [11] Sala, M., A. Forner, M. Varela, et al., «Prognostic prediction in patients with

hepatocellular carcinoma.», *Semin Liver Dis.*

[12] P. R. Galle *et al.*, «EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma», *J. Hepatol.*, vol. 69, fasc. 1, pp. 182–236, lug. 2018, doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.019.

[13] P. Kamath, «A model to predict survival in patients with end-stage liver disease», *Hepatology*, vol. 33, fasc. 2, pp. 464–470, feb. 2001, doi: 10.1053/jhep.2001.22172.

[14] V. Mazzaferro *et al.*, «Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis», *Lancet Oncol.*, vol. 10, fasc. 1, pp. 35–43, gen. 2009, doi: 10.1016/S1470-2045(08)70284-5.

[15] J. M. Llovet *et al.*, «Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma», *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, fasc. 4, pp. 378–390, lug. 2008, doi: 10.1056/NEJMoa0708857.

[16] T. Yamashita *et al.*, «REFLECT—a phase 3 trial comparing efficacy and safety of lenvatinib to sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: an analysis of Japanese subset», *J. Gastroenterol.*, vol. 55, fasc. 1, pp. 113–122, gen. 2020, doi: 10.1007/s00535-019-01642-1.

[17] R. S. Finn e M. Kudo P.Merle, «Primary results from the phase III LEAP-002 study: Lenvatinib plus pembrolizumab versus lenvatinib as firstline (1L) therapy for advanced hepatocellular carcinoma (aHCC)», *LBA34*.

[18] R. S. Finn *et al.*, «Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma», *N. Engl. J. Med.*, vol. 382, fasc. 20, pp. 1894–1905, mag. 2020, doi: 10.1056/NEJMoa1915745.

- [19] G. K. Abou-Alfa *et al.*, «Tremelimumab plus Durvalumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma», *NEJM Evid.*, vol. 1, fasc. 8, lug. 2022, doi: 10.1056/EVIDoa2100070.
- [20] J. Bruix *et al.*, «Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial», *The Lancet*, vol. 389, fasc. 10064, pp. 56–66, gen. 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(16)32453-9.
- [21] G. K. Abou-Alfa *et al.*, «Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma», *N. Engl. J. Med.*, vol. 379, fasc. 1, pp. 54–63, lug. 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1717002.
- [22] A. X. Zhu *et al.*, «Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased α -fetoprotein concentrations (REACH-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial», *Lancet Oncol.*, vol. 20, fasc. 2, pp. 282–296, feb. 2019, doi: 10.1016/S1470-2045(18)30937-9.
- [23] D. Ciardiello *et al.*, «Final results of the CAVE trial in RAS wild type metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab plus avelumab as rechallenge therapy: Neutrophil to lymphocyte ratio predicts survival», *Clin. Colorectal Cancer*, vol. 21, fasc. 2, pp. 141–148, giu. 2022, doi: 10.1016/j.clcc.2022.01.005.
- [24] M. Scartozzi *et al.*, «VEGF and VEGFR genotyping in the prediction of clinical outcome for HCC patients receiving sorafenib: The ALICE-1 study: VEGF and VEGFR genotyping in HCC patients», *Int. J. Cancer*, vol. 135, fasc. 5, pp. 1247–1256, set. 2014, doi: 10.1002/ijc.28772.
- [25] D. Ruggiero *et al.*, «Genetics of VEGF Serum Variation in Human Isolated

Populations of Cilento: Importance of VEGF Polymorphisms», *PLoS ONE*, vol. 6, fasc. 2, p. e16982, feb. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0016982.

[26] H. H. Al-Habboubi, N. Mahdi, T. M. Abu-Hijleh, F. M. Abu-Hijleh, M. S. Sater, e W. Y. Almawi, «The relation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms on VEGF levels and the risk of vasoocclusive crisis in sickle cell disease», *Eur. J. Haematol.*, vol. 89, fasc. 5, pp. 403–409, nov. 2012, doi: 10.1111/ejh.12003.

[27] L. Faloppi *et al.*, «Angiogenesis Genotyping and Clinical Outcomes in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma Receiving Sorafenib: The ALICE-2 Study», *Target. Oncol.*, vol. 15, fasc. 1, pp. 115–126, feb. 2020, doi: 10.1007/s11523-020-00698-x.

[28] G. Pages e J. Pouyssegur, «Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene? a concert of activating factors», *Cardiovasc. Res.*, vol. 65, fasc. 3, pp. 564–573, feb. 2005, doi: 10.1016/j.cardiores.2004.09.032.

[29] L. Faloppi *et al.*, «Lactate Dehydrogenase in Hepatocellular Carcinoma: Something Old, Something New», *BioMed Res. Int.*, vol. 2016, pp. 1–7, 2016, doi: 10.1155/2016/7196280.

[30] C. L. Markert, «Lactate Dehydrogenase Isozymes: Dissociation and Recombination of Subunits», *Science*, vol. 140, fasc. 3573, pp. 1329–1330, giu. 1963, doi: 10.1126/science.140.3573.1329.

[31] G. L. Semenza, «Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1», *Biochem. Pharmacol.*, vol. 64, fasc. 5–6, pp. 993–998, set. 2002, doi: 10.1016/S0006-2952(02)01168-1.

- [32] G. L. Semenza, «HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia», *J. Appl. Physiol.*, vol. 88, fasc. 4, pp. 1474–1480, apr. 2000, doi: 10.1152/jappl.2000.88.4.1474.
- [33] P. H. Maxwell *et al.*, «Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, fasc. 15, pp. 8104–8109, lug. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.15.8104.
- [34] G. L. Semenza, «Regulation of Mammalian O₂ Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1», *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 15, fasc. 1, pp. 551–578, nov. 1999, doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.551.
- [35] Y. Kolev, H. Uetake, Y. Takagi, e K. Sugihara, «Lactate Dehydrogenase-5 (LDH-5) Expression in Human Gastric Cancer: Association with Hypoxia-Inducible Factor (HIF-1 α) Pathway, Angiogenic Factors Production and Poor Prognosis», *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 15, fasc. 8, pp. 2336–2344, ago. 2008, doi: 10.1245/s10434-008-9955-5.
- [36] on behalf of the Italian Group for the Study of Digestive Tract Cancer (GISCAD) *et al.*, «The value of lactate dehydrogenase serum levels as a prognostic and predictive factor for advanced pancreatic cancer patients receiving sorafenib», *Oncotarget*, vol. 6, fasc. 33, pp. 35087–35094, ott. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.5197.
- [37] M. Scartozzi *et al.*, «Pre-treatment lactate dehydrogenase levels as predictor of efficacy of first-line bevacizumab-based therapy in metastatic colorectal cancer patients», *Br. J. Cancer*, vol. 106, fasc. 5, pp. 799–804, feb. 2012, doi: 10.1038/bjc.2012.17.
- [38] M. Del Prete *et al.*, «Prognostic clinical factors in pretreated colorectal cancer patients receiving regorafenib: Implications for clinical management», *Oncotarget*, vol.

6, fasc. 32, pp. 33982–33992, ott. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.5053.

[39] Z.-X. Wang, C.-P. Jiang, Y. Cao, G. Zhang, W.-B. Chen, e Y.-T. Ding, «Preoperative serum liver enzyme markers for predicting early recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma», *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, vol. 14, fasc. 2, pp. 178–185, apr. 2015, doi: 10.1016/S1499-3872(15)60353-8.

[40] Hu, W. J., et al., «“The prognostic value of serum LDH levels in patients with hepatocellular carcinoma after hepatic resection.” *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* (2015).».

[41] C.-M. Lo *et al.*, «Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma», *Hepatology*, vol. 35, fasc. 5, pp. 1164–1171, mag. 2002, doi: 10.1053/jhep.2002.33156.

[42] C. B. O’Suilleabhain, R. T. P. Poon, J. L. Yong, G. C. Ooi, W. K. Tso, e S. T. Fan, «Factors predictive of 5-year survival after transarterial chemoembolization for inoperable hepatocellular carcinoma», *Br. J. Surg.*, vol. 90, fasc. 3, pp. 325–331, feb. 2003, doi: 10.1002/bjs.4045.

[43] M. Scartozzi *et al.*, «The Role of LDH Serum Levels in Predicting Global Outcome in HCC Patients Undergoing TACE: Implications for Clinical Management», *PLoS ONE*, vol. 7, fasc. 3, p. e32653, mar. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0032653.

[44] J.-F. Lu, R. Bruno, S. Eppler, W. Novotny, B. Lum, e J. Gaudreault, «Clinical pharmacokinetics of bevacizumab in patients with solid tumors», *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 62, fasc. 5, pp. 779–786, ott. 2008, doi: 10.1007/s00280-007-0664-8.

- [45] R. Bruno, C. B. Washington, J.-F. Lu, G. Lieberman, L. Banken, e P. Klein, «Population pharmacokinetics of trastuzumab in patients With HER2+ metastatic breast cancer», *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 56, fasc. 4, pp. 361–369, ott. 2005, doi: 10.1007/s00280-005-1026-z.
- [46] M. Dostalek, I. Gardner, B. M. Gurbaxani, R. H. Rose, e M. Chetty, «Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Physiologically-Based Pharmacokinetic Modelling of Monoclonal Antibodies», *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 52, fasc. 2, pp. 83–124, feb. 2013, doi: 10.1007/s40262-012-0027-4.
- [47] T. R. Vetter, «Fundamentals of Research Data and Variables: The Devil Is in the Details», *Anesth. Analg.*, vol. 125, fasc. 4, pp. 1375–1380, ott. 2017, doi: 10.1213/ANE.0000000000002370.
- [48] A. Hiraoka *et al.*, «Does first-line treatment have prognostic impact for unresectable HCC ?—Atezolizumab plus bevacizumab versus lenvatinib», *Cancer Med.*, vol. 12, fasc. 1, pp. 325–334, gen. 2023, doi: 10.1002/cam4.4854.
- [49] R. S. Finn *et al.*, «Pembrolizumab As Second-Line Therapy in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma in KEYNOTE-240: A Randomized, Double-Blind, Phase III Trial», *J. Clin. Oncol.*, vol. 38, fasc. 3, pp. 193–202, gen. 2020, doi: 10.1200/JCO.19.01307.
- [50] C. Gratzke *et al.*, «KEYNOTE-991: pembrolizumab plus enzalutamide and androgen deprivation for metastatic hormone-sensitive prostate cancer», *Future Oncol.*, vol. 18, fasc. 37, pp. 4079–4087, dic. 2022, doi: 10.2217/fon-2022-0776.

RINGRAZIAMENTI

Ho il piacere di dedicare questo spazio del mio elaborato alle persone che hanno contribuito, con il loro supporto, alla realizzazione dello stesso.

Un ringraziamento alla mia relatrice, la Prof.ssa Rossana Berardi, per la disponibilità dimostratami nella stesura di questo studio, ma soprattutto per aver suscitato per prima in me l'interesse per l'ambito oncologico, per avermi dato la possibilità di frequentare il reparto di Oncologia dell'AOU Ospedali Riuniti Ancona Torrette che è stato estremamente stimolante e mi ha permesso di comprendere quale fosse il campo più adatto a me per la realizzazione di questo elaborato.

Un grande grazie al Prof. Riccardo Giampieri, per avermi proposto questo interessante studio, seguendomi con grande pazienza durante tutto l'anno, sia nella stesura della Tesi sia coinvolgendomi nelle attività di reparto, ambulatoriali e di ricerca, permettendomi quindi di affacciarmi al mondo dell'Oncologia gastroenterologica con entusiasmo e curiosità.

Grazie alla mia famiglia, che ogni giorno mi spinge a cercare di migliorarmi, che gioisce con me e più forte di me nei successi e mi sostiene quando ne ho bisogno offrendomi un valoroso supporto. A mio fratello Alessandro, che è parte della mia famiglia ma che è anche un medico, da sempre rappresenta per me un esempio da seguire, da sempre riesce a offrirmi un valido confronto quando lo necessito, e stupendomi con il suo meraviglioso percorso mi ricorda che tutto è possibile, tutto si può fare con la buona volontà.

Grazie ai miei amici di Fano, che da sempre fanno il tifo per me e mi sostengono, con i quali mi diverto e ricarico le batterie, senza di voi non sarebbe stata la stessa cosa.

Infine, un grande grazie a tutti i miei colleghi di Università, che con gioia ho potuto sempre chiamare prima di tutto amici. Non mi avete mai lasciata indietro, mi avete sempre coinvolta facendomi sentire parte di qualcosa di molto bello che è andato al di là di ogni mia aspettativa: siete stati dei valorosissimi compagni con cui arrivare in cima alla montagna e, per quanto sia stata dura questa scalata, giorno dopo giorno da ognuno di voi ho avuto modo di imparare tanto, mi avete rallegrato anche le giornate più impegnative e posso sinceramente dire che al vostro fianco è stato tutto più produttivo ma anche più leggero e più piacevole. Spero di aver contribuito anche io a rendere belli i vostri percorsi tanto quanto avete fatto voi con me.

Siete stati la conferma, che come sempre, l'unione fa la forza.