

## Mutante lamivudino-resistente in paziente in profilassi con lamivudina in corso di chemioterapia antitumorale per linfoma non-Hodgkin: recupero clinico con terapia di associazione lamivudina e adefovir

*Ivan Gentile, Chiara Viola, Francesco Borrelli e Guglielmo Borgia*

*A.O.U. Federico II - DAS Malattie Infettive e Medicina Legale, Napoli*

### Introduzione

Più di 350.000.000 di persone nel mondo sono cronicamente infettate dal virus dell'epatite B (HBV)<sup>1</sup>. Nei pazienti con emopatie maligne la riattivazione di HBV a seguito di chemioterapia antitumorale è un evento comune, che si verifica nel 21-53% dei casi, e se non evidenziato precocemente è gravato da una prognosi grave<sup>2</sup>.

Lamivudina è il farmaco più utilizzato in questo *setting*. È ampiamente documentato come lamivudina, somministrata come terapia dell'epatite cronica B, sia gravata da una elevata probabilità di comparsa di mutazioni resistenti (14% dopo un anno e 69% dopo 5 anni di terapia). Poche sono invece le segnalazioni di comparsa di ceppi resistenti a lamivudina in pazienti che ricevono tale farmaco a scopo profilattico; ciò probabilmente sia a causa della relativamente breve durata della profilassi<sup>3</sup> che delle più basse viremie basali.

Descriveremo un caso di severa riattivazione da HBV in paziente sotto regime profilattico con lamivudina e il suo trattamento con terapia di associazione (lamivudina + adefovir).

### Caso clinico

Nel marzo 2007 afferiva per la prima volta presso il nostro Dipartimento una donna di 68 anni HBsAg positiva, che presentava malessere generalizzato, aumento della circonferenza addominale, nausea, astenia e vomito.

All'anamnesi familiare riferiva di due fratelli deceduti per complicanze di cirrosi epatica HBV positiva, e di un altro fratello ancora in vita ugualmente HBsAg positivo.

La paziente asseriva di essere giunta a conoscenza della positività per HBV circa 15 anni prima, in occasione di esami praticati per puntura accidentale. Era seguita presso un altro centro, dove non aveva mai praticato epatobiopsia né le era mai stata proposta alcuna terapia per la sua malattia. Al ricovero non esibiva alcuna documentazione a riguardo.

Circa 16 mesi prima del ricovero la paziente aveva ricevuto presso il reparto di Ematologia della nostra Azienda Ospedaliera diagnosi di linfoma non-Hodgkin B follicolare grado 1 stadio IV con multiple linfadenopatie sovra- e sotto-diaframmatiche, infiltrazione ossea e splenomegalia. A tale epoca risultava essere HBsAg positiva, anti-HBs negativa, HBeAg negativa, anti-HBe positiva, con HBV-DNA positivo a  $4 \times 10^2$  UI/mL, anti-HCV negativa, anti-HDV IgM e IgG negativa. La funzionalità epatica risultava buona e le transaminasi erano normali.

L'ematologo della paziente iniziava nel settembre 2005 profilassi con lamivudina 100 mg/die e dopo 20 giorni circa veniva iniziata chemioterapia, utilizzando fludarabina e mitoxantrone ogni 21 giorni per un totale di 6 cicli. La tolleranza era stata buona, senza che si sviluppasse tossicità epatica e con HBV-DNA persistentemente non determinabile. Nel febbraio 2006 la paziente veniva rivalutata, risultando libera da malattia a livello midollare ma presentando positività dell'esame PET/TC ai linfonodi sottodiaframmatici. Praticava quindi 4 somministrazioni di rituximab e successivamente nuovo trattamento con fludarabina e mitoxantrone ogni 21 giorni per 6 cicli. Veniva mantenuta la terapia con lamivudina, sempre con parametri di funzionalità epatica e transaminasi nella norma. Nel febbraio 2007, circa un mese dopo l'ultimo ciclo di chemioterapia, si sviluppava malessere generalizzato, aumento della circonferenza addominale, nausea, astenia e vomito.

Al ricovero la paziente si presentava itterica (bilirubina totale/diretta 7,36/4,31 mg/dL) e tachicardica. Era presente ascite in discreta quantità, che comportava addome batraciano con cicatrice ombelicale estroflessa, leggermente dolente alla palpazione con epato-spleno-megalia. Le transaminasi risultavano essere 20 volte la norma la AST, e 8 volte la norma la ALT, con ALP 2 volte la norma e GGT normale. Era presente leuco-piastrino-penia moderata, con formula leucocitaria indifferente, e tempo di protrombina 68%. Il profilo virale risultava HBsAg positivo, anti-HBs negativo, HBeAg negativo, anti-HBe positivo, anti-HCV negativo con HCV-RNA negativo, anti-HDV IgM e IgG negativa.

L'ecocolordoppler epatosplenico al ricovero mostrava: versamento liquido libero in cavità addominale; assenza di segni di ipertensione portale; flusso epatopeto a velo-

cità lievemente ridotta; vie biliari intra- ed extra-epatiche non dilatate; colecisti nella norma; milza in sede, aumentata di volume (diametro 14,6 cm) a ecostruttura omogenea, vena splenica non dilatata.

La paziente veniva sottoposta a paracentesi esplorativa, dalla quale non si evincevano segni di emorragia o infezione e, per tale motivo, data la funzionalità renale normale, veniva instaurata terapia diuretica con furosemide, canrenoato di potassio e albumina. L'HBV-DNA risultava essere  $8 \times 10^7$ , genotipo D, e il sequenziamento delle mutazioni delle regioni pol e s di HBV individuava mutazioni associate a resistenza a lamivudina tipo M204I (ATG>ATT), in assenza di mutazioni associate a resistenza ad adefovir ed entecavir. Per tale motivo, quindi, mantenendo la terapia antivirale con lamivudina, veniva aggiunto precocemente, al secondo giorno di ricovero, adefovir alla dose di 10 mg/die.

Durante la degenza si sviluppava una progressiva parziale compromissione dell'emostasi, con tendenza a progressivo allungamento del PT e piastrinopenia ingravescente, con progressiva riduzione dei livelli di antitrombina e segni di iperfibrinolisi secondaria. Si provvedeva dunque a terapia sostitutiva con antitrombina III per via endovenosa. Si rendeva inoltre necessaria terapia con filgrastim ed epoetina alfa.

Con la terapia instaurata si verificava un miglioramento della sintomatologia clinica, con diminuzione progressiva delle transaminasi, stabilità della funzionalità renale e miglioramento dei parametri dell'emostasi. Dopo 30 giorni, la AST era 3 volte la norma, la ALT 1,5 volte la norma, e l'HBV-DNA risultava essere  $5 \times 10^5$  U/mL. Dopo altri 30 giorni di terapia la ALT era normale, la AST 2 volte la norma e l'HBV-DNA  $5,3 \times 10^4$  U/mL.

La paziente veniva dimessa con diagnosi di "Riacutizzazione di infezione da HBV da mutante lamivudino-resistente (variante YMDD) con scompenso clinico (ascite e ittero), in soggetto portatore inattivo di infezione da HBV e affetto da linfoma non-Hodgkin B follicolare". È attualmente in discrete condizioni, mantiene la terapia combinata con lamivudina e adefovir e presenta carica virale al di sotto delle 50 U/mL.

## Discussione

Un recente studio italiano multicentrico ha mostrato come la prevalenza dei marcatori di infezione da HBV sia significativamente maggiore in una popolazione composta da casi di linfoma non-Hodgkin a cellule B (sia indolenti che aggressivi)

rispetto ai controlli non affetti da malattie emolinfoproliferative (8,5% vs 2,8%)<sup>4</sup>. Un'elevata prevalenza di infezione da HBV tra pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin è stata osservata, oltre che in Italia, anche in Corea, Giappone e Romania<sup>5-8</sup>.

Sulla base di tali studi si ritiene che HBV potrebbe essere co-responsabile dell'induzione dei linfomi non-Hodgkin. Nelle aree ad alta endemia l'infezione viene frequentemente acquisita in epoca perinatale, fornendo quindi una lunga fase di immunodeficienza predisponente alla linfomagenesi<sup>9</sup>. Tuttavia il problema di maggiore rilevanza clinica in questo contesto è rappresentato dalla riattivazione virale durante la chemioterapia antineoplastica<sup>9</sup>.

Il tasso di riattivazione dell'infezione da HBV in corso di chemioterapia oscilla tra il 20 e il 53%, e il tasso di mortalità tra questi pazienti è del 10-40%<sup>2,10</sup>.

Fludarabina, analogo nucleosidico usato in monoterapia o in terapia di combinazione per diverse neoplasie ematologiche, è molto efficace nella terapia dei linfomi indolenti. Essa esercita l'effetto citotossico penetrando nel DNA delle cellule in fase di replicazione, dove induce diverse mutazioni che distorcono l'elica e che non vengono più riparate. Tuttavia, l'efficacia dimostrata nei linfomi indolenti a basso tasso di replicazione indica il coinvolgimento anche di altri meccanismi, responsabili dell'induzione dell'apoptosi. Un ben noto effetto di fludarabina è una profonda immunosoppressione con diminuzione marcata dei linfociti CD4+ e CD8+, che predispone a infezioni opportunistiche. Più della metà dei casi di riattivazione si verifica nel periodo compreso tra la fine della chemioterapia e la completa immunoricostituzione. Mentre infatti durante la fase di immunosoppressione si verifica la diffusione del virus negli epatociti, la ristabilita funzionalità dei linfociti T causa una distruzione massiva degli epatociti stessi. L'immunosoppressione indotta da fludarabina dura per un prolungato periodo di tempo dopo la fine della terapia. Malgrado il danno epatocellulare indotto da HBV sia immunomediato (i linfociti CD8+ riconoscono e distruggono le cellule che espongono gli antigeni del virus B) anche meccanismi non citotossici sono necessari per l'eliminazione del virus. È stato osservato un maggiore tasso di mutazione genica nella popolazione virale dei pazienti sottoposti a terapia con fludarabina. È stato ipotizzato che essa possa entrare negli epatociti ed essere incorporata nel genoma virale durante la replicazione, grazie alla sua somiglianza con i nucleotidi purinici, portando quindi a errori che causerebbero a loro volta l'accumulo di mutazioni. L'immunosoppressione indotta dal farmaco potrebbe comunque essere essa stessa responsabile dell'aumentato tasso di replicazione virale, il che aumenta la probabilità di mutazioni spontanee<sup>11</sup>.

Rituximab ha dimostrato un effetto sinergico con altri chemioterapici in pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin che esprimono l'antigene CD20. Esso può indurre una marcata e duratura deplezione delle cellule B, con secondario deficit dell'immunità umorale ed aumento del rischio di riattivazioni virali. Nel caso dell'infezione da HBV, determina la diminuzione del titolo di HBsAb<sup>12</sup>.

In particolare nel caso dell'utilizzo di rituximab viene segnalata la necessità di iniziare profilassi anche se il paziente è solo anti-HBc positivo e di mantenerla a lungo termine poiché sono stati segnalati casi di riattivazione anche dopo 6-8 mesi dal completamento della terapia<sup>13</sup>. Conseguentemente, anche i rischi di comparsa di mutanti resistenti potrebbero aumentare con il prolungamento del periodo di profilassi<sup>12</sup>.

La profilassi con lamivudina nei pazienti con infezione da HBV sottoposti a chemioterapia è ormai effettuata di routine. Un recente trial randomizzato ha fornito evidenza che tale strategia profilattica è vantaggiosa rispetto a un atteggiamento di trattare i pazienti solo dopo l'elevazione delle transaminasi<sup>14</sup>. Nel suddetto studio, in 2 dei 26 pazienti che ricevevano profilassi con lamivudina è comparsa la mutazione YMDD, che rende il ceppo virale resistente al farmaco. Tuttavia nei casi su riportati la comparsa del ceppo resistente avveniva alla sospensione delle lamivudina, e il *flare* di transaminasi, peraltro modesto, scompariva spontaneamente<sup>14</sup>.

Nel nostro caso la diagnostica molecolare ha consentito di escludere la possibilità di altre infezioni virali, da HCV o da virus Delta, ed è stato possibile determinare le caratteristiche di sensibilità ad antivirali tramite il sequenziamento genomico.

La nostra paziente è stata correttamente sottoposta a profilassi prima dell'inizio della chemioterapia, ma l'andamento della sua patologia ematologica ha reso necessaria una lunga durata del trattamento antiblastico, e quindi di lamivudina, favorendo quindi lo sviluppo di resistenze. In epoca pre-chemioterapia presentava normalità degli indici di funzionalità epatica e delle transaminasi e bassa viremia. Tale situazione si associa a minore frequenza di riattivazione virale<sup>12</sup>. Sottolineiamo che non erano disponibili ulteriori informazioni sullo stato virologico della paziente nella sua lunga storia clinica.

## Conclusioni

Il caso presentato si presta ad alcune considerazioni:

La paziente ha sviluppato alla fine della chemioterapia una riattivazione dell'infezione da HBV malgrado la profilassi con lamivudina. Tale riattivazione, avvenuta per la selezione di un mutante resistente a lamivudina, era *life-threatening*, data la grave compromissione sia dei parametri ematologici che di quelli coagulativi.

L'evenienza di selezione di mutanti resistenti a lamivudina in pazienti sottoposti a regime profilattico è un evento assai raro a causa del periodo relativamente breve di somministrazione del farmaco, soprattutto se la viremia basale è bassa. Tuttavia va considerato che l'utilizzo di alcuni chemioterapici potrebbe associarsi a una più frequente comparsa di mutanti resistenti. È il caso di fludarabina, per la sua capacità di aumentare il tasso di mutazioni nel genoma virale e quindi rendere più probabile la comparsa di ceppi resistenti al farmaco, o di rituximab, che necessita di lunghi trattamenti profilattici.

Anche in questo contesto la strategia di utilizzare terapia combinata, scegliendo un antivirale appartenente a una categoria diversa (analogo nucleotidico) come adefovir piuttosto che la semplice sostituzione, sembra efficace nel sopprimere tutte le popolazioni virali infettanti e quindi sortire un successo sul piano clinico.

Raccomandiamo un'attenta sorveglianza virale anche durante la somministrazione di lamivudina a scopo profilattico, soprattutto se si utilizza fludarabina o rituximab e se la somministrazione è effettuata per lungo tempo. Solo in questo modo sarà possibile valutare il vantaggio, anche in questo contesto, di una terapia di combinazione instaurata precocemente, cioè prima che la riattivazione sia evidente sul piano biochimico e clinico.

## Bibliografia

- (1) Lavanchy D. *Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures*. Journal of Viral Hepatology 2004; 11: 97-107.
- (2) Yeo W, Chan PK, Ho WM, Zee B, Lam KC, Lpi IK, Chan ATC, Mok TSK, Lee JJ, Leung TWT, Zhong S & Johnson PJ. *Lamivudina for the prevention of hepatitis B virus reactivation in Hepatitis B s-antigen seropositive cancer patients undergoing cytotoxic chemotherapy*. Journal of Clinical Oncology 2004; 22: 927-934.
- (3) Lalazar G, Rund D, Shouval D. *Screening, prevention and treatment of viral hepatitis B reactivation in patients with haematological malignancies*. Br J Haematol 2007; 136: 699-712.
- (4) Marcucci F, Mele A, Spada E, Candido A, Bianco E, Pulsoni A, Chionne P, Madonna E, Cotichini R, Barbui A, De Renzo A, Dore F, Iannitto E, Liso V, Martino B, Montanaro M, Pagano L, Musto P, Rapicetta M. *High prevalence of hepatitis B virus infection in B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. Haematologica 2006 Apr;91(4):554-7.

- (5) Takai S, Tsurumi H, Ando K, et al. *Prevalence of hepatitis B and C virus infection in haematological malignancies and liver injury following chemotherapy*. Eur J Haematol 2005;74:158-65.
- (6) Kim JH, Bang YJ, Park BJ, et al. *Hepatitis B virus infection and B-cell non-Hodgkin's lymphoma in a hepatitis B endemic area: a case-control study*. Jpn J Cancer Res 2002;93:471-7.
- (7) Kuniyoshi M, Nakamuta M, Sakai H, et al. *Prevalence of hepatitis B or C virus infections in patients with non-Hodgkin's lymphoma*. J Gastroenterol Hepatol 2001;16:215-9.
- (8) Cucuianu A, Patiu M, Duma M, Basarab C, Soritau O, Bojan A, Vasilache A, Mates M, Petrov L. *Hepatitis B and C virus infection in Romanian non-Hodgkin's lymphoma patients*. Br J Haematol 1999;107:353-6.
- (9) Lim ST, Fei G, Quek R, Lim LC, Lee LH, Yap SP, Loong S, Tao M. *The relationship of hepatitis B virus infection and non-Hodgkin's lymphoma and its impact on clinical characteristics and prognosis*. Eur J Haematol 2007 Aug;79(2):132-7.
- (10) Wang F, Xu RH, Luo HY, Zhang DS, Jiang WQ, Huang HQ, Sun XF, Xia ZJ, Guan ZZ. *Clinical and prognostic analysis of hepatitis B virus infection in diffuse large B-cell lymphoma*. BMC Cancer 2008 Apr 23;8:115.
- (11) Picardi M, Pane F, Quintarelli C, De Renzo A, Del Giudice A, De Divitiis B, Persico M, Ciancia R, Salvatore F, Rotoli B. *Hepatitis B virus reactivation after fludarabine-based regimens for indolent non-Hodgkin's lymphomas: high prevalence of acquired viral genomic mutations*. Haematologica 2003 Nov;88(11):1296-303.
- (12) He YF, Li YH, Wang FH, Jiang WQ, Xu RH, Sun XF, Xia ZJ, Huang HQ, Lin TY et al. *The effectiveness of lamivudine in preventing hepatitis B viral reactivation in rituximab-containing regimen for lymphoma*. Ann Hematol 2008 Jun;87(6):481-5.
- (13) Dai MS, Chao TY, Kao WY, Shyu RY, Liu TM. *Delayed hepatitis B virus reactivation after cessation of preemptive lamivudine in lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP*. Ann Hematol 2004; 83: 769-774.
- (14) Hsu C, Hsiung CA, Su IJ, Hwang WS, Wang MC, Lin SF, Lin TH, et al. *A revisit of prophylactic lamivudine for chemotherapy-associated hepatitis B reactivation in non-Hodgkin's lymphoma: a randomized trial*. Hepatology 2008 Mar;47(3):844-53.