

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BRESCIA



**SUL RAZIONALE DEL RICORSO A ETOPOSIDE NEI TUMORI GINECOLOGICI
IN STADIO AVANZATO
MECCANISMO D'AZIONE E POTENZIALE UTILIZZO IN AMBITO CLINICO**

Autori:

**Chiar.mo Prof. Enrico Sartori, Prof.ssa Angela Gambino, Dr.ssa Mariachiara Eusebi, Dr.ssa
Cornelli Benedetta**

INDICE

Introduzione.....p. 4

CAPITOLO I

ETOPOSIDE FOSFATO

1. Meccanismo d'azione.....p. 8
2. Assorbimento/distribuzione.....p. 9
3. Metabolismo/escrezione.....p. 9
4. Somministrazione.....p. 10
5. Effetti indesiderati.....p. 10

CAPITOLO II

TOPOISOMERASI

1. La topologia del DNA.....p. 12
2. Classificazione.....p. 14
3. Inibitori delle topoisomerasi.....p. 15

CAPITOLO III

ANGIOGENESI

1. Angiogenesi derivante da vasi preesistenti.....p. 18
2. Angiogenesi derivante da precursori delle cellule endoteliali.....p. 18
3. Angiogenesi tumorale.....p. 19
4. Fattori di modulazione dell'angiogenesi: proteine della matrice extracellulare....p. 21
5. Fattori di modulazione dell'angiogenesi: fattori di crescita e recettori.....p. 21

CAPITOLO IV

SISTEMA IMMUNITARIO E TUMORI

1. Caratteristiche generali dell'immunità ai tumori.....	p. 24
2. Antigeni tumorali.....	p. 24
3. Risposta immunitaria ai tumori.....	p. 26
4. Evasione della risposta immunitaria da parte dei tumori.....	p. 28
5. La chemioterapia metronomica.....	p. 29

CAPITOLO V

CASISTICA DELLO STUDIO E CONCLUSIONI

1. Materiali e metodi
 - 1.1 Metodi statistici utilizzati
2. Risultati
 - 2.1 Età alla diagnosi del tumore primitivo
 - 2.2 Istologia del tumore primitivo
 - 2.3 Stadio alla presentazione
 - 2.4 Grado di differenziazione
 - 2.5 OS
 - 2.6 Etoposide vs Etoposide + Megestil
 - 2.7 Linee terapeutiche
 - 2.8 Intervallo di tempo tra la diagnosi e l'inizio dell'Etoposide
 - 2.9 Tollerabilità individuale all'Etoposide
 - 2.10 Ca125 nelle pazienti con neoplasia ovarica
 - 2.11 DFS
 - 2.12 Sensibilità al platino
3. Conclusioni

Bibliografia

Introduzione

Da oltre mezzo secolo, la terapia sistemica per i tumori è caratterizzata dalla somministrazione dei farmaci chemioterapici. La maggior parte di questi ha lo scopo di inibire o eliminare le cellule in rapida divisione.

Il razionale del ricorso a tali farmaci prevede di utilizzare la “*dose massima tollerata*” (MDT) dal paziente al minimo intervallo possibile tra due somministrazioni. La durata di questo intervallo dipende molto dal tipo di farmaco usato, dai tempi di recupero, dalla tossicità dei tessuti sani e dalla reazione soggettiva del paziente al principio attivo.

Nonostante l'elevato numero di chemioterapici in uso e il gran numero di studi clinici intrapresi, i progressi risultano limitati in termini di guarigione o di prolungamento significativo dell'intervallo libero da malattia. I farmaci antineoplastici, infatti, manifestano un'azione limitata nel tempo a seguito dell'attivazione di meccanismi di farmacoresistenza con selezione di cloni cellulari resistenti (instabilità genetica propria soprattutto del tumore ovarico), per cui è sovente necessario ricorrere a ulteriori linee chemioterapiche.

Inoltre, i progressi osservati nel trattamento di alcuni tipi di neoplasia si accompagnano spesso alla comparsa di effetti collaterali tossici, che limitano l'uso prolungato dei chemioterapici tradizionali. Spesso, pertanto, vengono loro associati farmaci di supporto, fattori di crescita ematopoietici e farmaci anti-nausea, somministrati per ridurre la tossicità indotta. Farmaci i quali, oltre ad avere propri effetti collaterali, comportano un onere finanziario non indifferente.

Una possibile e già sperimentata strategia terapeutica diversa nei confronti delle malattie oncologiche è costituita dalla cosiddetta *chemioterapia metronomica*, il cui razionale consiste nell'utilizzare dosi di farmaco nettamente inferiori al dosaggio standard, ma somministrate in maniera continuativa nel tempo e non rispettando il break di 3-4 settimane richiesto per somministrazioni a dosaggio pieno.

Questa modalità di somministrazione dei farmaci chemioterapici è denominata *chemioterapia continua a basse dosi, chemioterapia anti-angiogenica o chemioterapia metronomica*, che attiene, dunque, alla frequente, talvolta quotidiana, somministrazione di chemioterapici a dosi significativamente al di sotto della MDT, senza interruzioni tra i vari cicli.

Questo regime terapeutico ha grandi vantaggi come il basso costo, la bassa tossicità e la possibilità di essere attuato anche per via orale dagli stessi pazienti, senza bisogno di accessi venosi o lunghe infusioni.

Simile strategia si fonda sul presupposto per cui i tumori solidi hanno continuo bisogno di mantenere efficiente il microambiente che li circonda e, in particolare, di reclutare nuovi vasi sanguigni in grado di garantire ossigeno e nutrienti essenziali alla cellula neoplastica. Per questo motivo l'oncologia moderna spinge verso l'utilizzo di farmaci idonei a neutralizzare fattori di crescita proangiogenici e di farmaci idonei a promuovere fattori inibitori dell'angiogenesi.

Di fatto molti dei comuni chemioterapici hanno insita la capacità antiangiogenica in quanto le cellule endoteliali dei capillari che nutrono un tumore manifestano un rapido turnover mitotico. Il problema è che in un regime a massima dose tollerata l'intervallo tra una dose e la successiva permette al tumore di far ripartire il meccanismo di neovascolarizzazione. Il potenziale antiangiogenico viene tuttavia potenziato se si annullavano gli intervalli tra le varie dosi. Questo nuovo tipo di target, riferito alle cellule endoteliali, ha diversi potenziali vantaggi: le cellule endoteliali normali, infatti, hanno grande stabilità genetica rispetto alle cellule tumorali e difficilmente sono in grado di indurre chemioresistenza.

La chemioterapia metronomica sembra inibire la crescita tumorale attraverso diversi meccanismi:

1. Effetto citotossico diretto nei confronti delle cellule tumorali
2. Eradicazione e distruzione delle cellule staminali tumorali (CSCs)
3. Effetto citotossico nei confronti delle cellule endoteliali attraverso uno squilibrio tra fattori proangiogenici e antiangiogenici a vantaggio di questi ultimi; stimolazione dei fattori antiangiogenici (trombospondina 1 – TSP1) e soppressione dei fattori proangiogenici (vascular endothelial growth factor – VEGF, platelet derived growth factor – PDGF, ipoxia inducible factor 1 – HIF1). Questo effetto nei confronti delle cellule endoteliali avveniva già a dosaggi dell'ordine delle picomoli (gli stessi effetti tossici in cellule non endoteliali si avevano con dosaggi da 10 a 100.000 volte superiori).
4. Blocco della mobilizzazione delle cellule progenitrici endoteliali del midollo osseo: sono state identificate nel midollo osseo delle cellule progenitrici endoteliali capaci di migrare in risposta a stimoli proangiogenici e di contribuire attivamente alla formazione di una neovascolarizzazione. Queste cellule sono state quindi considerate un valido "target" per la terapia antiangiogenica. Bisogna dire, però, che queste cellule sarebbero sensibili anche a un regime di massima dose tollerata. Il problema risiede tuttavia nel fenomeno di "rebound" compensatorio durante la fase di break in cui tali cellule hanno tempo e risorse per ripristinare il loro numero e le loro capacità. Questo *rebound* compensatorio appare

superabile, invece, riducendo, con un regime metronomico, gli intervalli di somministrazione e intensificando, pertanto, l'esposizione delle cellule al farmaco.

5. Modificazione della risposta immunitaria in senso anti-neoplastico: la chemioterapia metronomica aumenta l'immunogenicità del tumore (la maggior parte dei tumori sono poco immunogenici o non immunogenici) attraverso diversi meccanismi di cui il più importante è la soppressione delle cellule T regolatorie (Treg) e l'attivazione delle cellule T citotossiche e NK.

Lo studio intrapreso ai fini della problematica affrontata nel presente lavoro ha considerato pazienti con neoplasia ginecologica (ovarica, endometriale e cervicale) trattate con Etoposide a regime metronomico al fine di acquisire conoscenze sulle dinamiche evolutive della patologia in esame e di ipotizzare miglioramenti nelle strategie terapeutiche soprattutto nelle fasi più avanzate di malattia laddove sussistono esigui spazi di cura.

A fronte del razionale sovraesposto, in letteratura non ci sono conferme cliniche scientificamente provate. Si tratta infatti del primo studio sull'Etoposide somministrato a regime metronomico nelle pazienti con neoplasia ginecologica.

CAPITOLO I

ETOPOSIDE FOSFATO

L'Etoposide fosfato (VP-16) è un inibitore dell'enzima Topoisomerasi II; è utilizzato come antineoplastico, spesso in combinazione con altri farmaci, in patologie quali il sarcoma di Ewing, il carcinoma polmonare a piccole cellule, il carcinoma embrionale del testicolo, il linfoma maligno e la leucemia acuta. L'Etoposide è utilizzato inoltre durante il regime di condizionamento prima di un trapianto di cellule staminali emopoietiche ¹.

Il suo principio attivo, la podofillotossina, è ricavato dalla pianta della mandragola *Podophyllum peltatum* (Fig. 1) Essa veniva utilizzata dagli Indiani d'America per i suoi effetti emetici, catartici ed antielmintici.



Fig. 1 *Podophyllum peltatum*

Sono stati sviluppati due glicosidi semisintetici del principio attivo denominati Etoposide e Teniposide (Fig. 2) ².

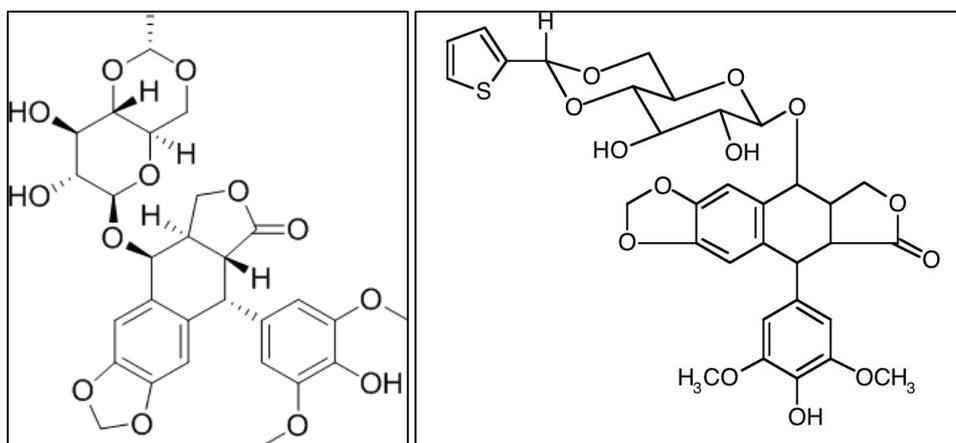


Fig. 2 Struttura chimica Etoposide e Teniposide

1. MECCANISMO D'AZIONE

L'Etoposide provoca il blocco del ciclo cellulare in due specifici punti: arresta il passaggio tra l'ultima divisione e l'inizio della replicazione del DNA (fase G1) e inibisce la replicazione del DNA (fase S). Funziona inibendo la topoisomerasi II, enzima necessario nella fase di replicazione del DNA. Quando l'enzima è bloccato dall'Etoposide, il DNA della cellula resta in forma superavvolta cosicchè non può più fungere da stampo per la sintesi dei neofilamenti³.

La podofilottossina, il principio attivo da cui sono derivati i glicosidi Etoposide e Teniposide, si lega alla tubulina in regioni diverse da quelle utilizzate dagli alcaloidi della vinca. Etoposide e Teniposide non hanno effetti sulla struttura o funzione dei microtubuli ma formano un complesso ternario con la topoisomerasi II e il DNA. La formazione del complesso provoca la rottura del DNA; il passaggio e la richiusura della catena che normalmente fa seguito al legame della topoisomerasi al DNA sono inibiti dal farmaco. L'enzima resta legato all'estremità libera del DNA tagliato con accumulo dei frammenti di DNA e morte cellulare programmata⁴.

Il suo principale effetto sembra manifestarsi durante la fase G1 del ciclo cellulare. Si possono manifestare due effetti dose dipendenti; a concentrazioni elevate (pari o superiori a 10 g/ml) si nota una lisi delle cellule che iniziano la mitosi; a basse concentrazioni (0,3-10 g/ml) è inibita la profase cellulare. L'effetto macromolecolare predominante sembra essere l'inibizione della sintesi del DNA (Fig. 3).

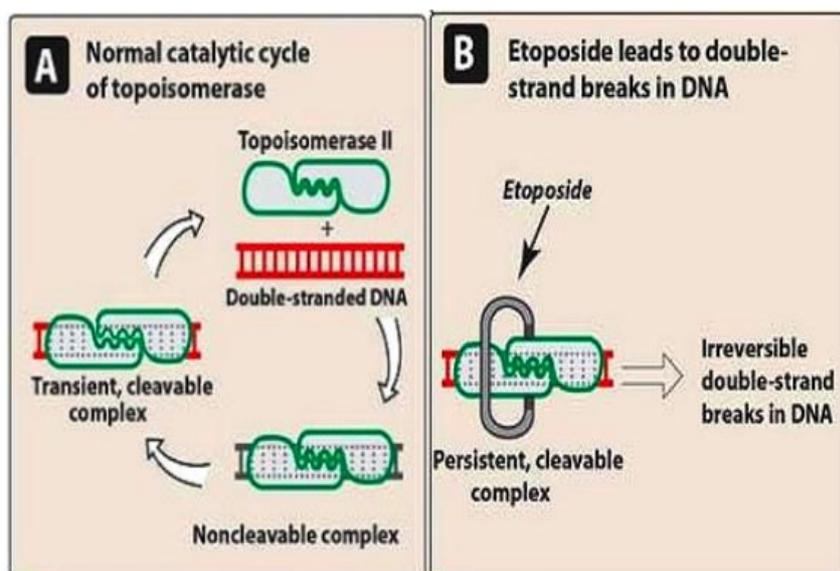


Fig. 3 Meccanismo d'azione dell'Etoposide

2. ASSORBIMENTO/DISTRIBUZIONE

Somministrato per via endovenosa, l'eliminazione di Etoposide è un processo bifasico con un'emivita di distribuzione di circa 1,5 ore e un'emivita d'eliminazione terminale compresa tra 4 e 11 ore. I valori di clearance totale sono compresi tra 33 e 48 ml/minuto così come l'emivita d'eliminazione terminale sono indipendenti dalla dose. L'area sottesa alle curve di concentrazione plasmatica – tempo (AUC) e i valori di concentrazione massima nel plasma (Cmax) aumentano linearmente con l'aumentare della dose. L'Etoposide non si accumula nel plasma dopo somministrazione endovenosa giornaliera di 100 mg/m² per 4-5 giorni. Dopo infusione endovenosa i valori di Cmax e AUC presentano una marcata variabilità fra soggetti e nell'ambito del medesimo soggetto.

I volumi medi di distribuzione in condizioni di steady-state sono compresi tra 18 e 29 litri. Sebbene l'Etoposide sia rilevabile a livello del liquor cerebrospinale e nei tumori intracerebrali, le concentrazioni raggiunte in queste sedi sono inferiori a quelle rilevabili nei tumori extracerebrali e nel plasma. Le concentrazioni di Etoposide sono maggiori nel polmone normale rispetto alle metastasi polmonari e sono simili nei tumori primari e nei tessuti normali del miometrio. In vitro l'Etoposide ha un elevato legame (97%) con le proteine plasmatiche. Nei bambini è stata evidenziata una relazione inversa fra i livelli di albumina del plasma e la clearance renale ⁵.

3. METABOLISMO/ESCREZIONE

Meno del 50% di una dose endovenosa di Etoposide è escreta nell'urina come Etoposide con una media di recupero della dose del 35% entro le 24 ore (circa 55% nei bambini). Per dosi comprese tra 80 e 600 mg/m² la clearance renale media varia fra 7 e 10 ml/minuto/m² ed è di circa il 35% della clearance totale. L'Etoposide è eliminato sia per via renale che per via non renale cioè per metabolismo epatico con escrezione biliare.

Solo il 6% o meno di una dose endovenosa di Etoposide si ritrova invariata nella bile. La maggior parte della clearance non renale è determinata dal metabolismo epatico. Il principale metabolita urinario è l'idrossiacido. Il 5-22% della dose somministrata di Etoposide è escreta nelle urine sotto forma coniugata a glucoronide o solfato.

Negli adulti la clearance totale di Etoposide è correlata alla clearance della creatinina, alla

concentrazione dell'albumina plasmatica e alla clearance non renale. Nei bambini, livelli elevati di ALT nel siero sono associati a una ridotta clearance totale del farmaco. Nei bambini un precedente trattamento con Cisplatino può causare una riduzione della clearance totale di Etoposide ⁶.

4. SOMMINISTRAZIONE

L'Etoposide viene somministrato per via endovenosa o per via orale (sotto forma di capsule disponibili da 50 e da 100 mg). Se somministrato per via orale produce un assorbimento corrispondente a circa il 50% della dose somministrata. Se somministrato per via endovenosa viene utilizzata un'infusione lenta (30-60 minuti); l'iniezione rapida provoca infatti ipotensione e broncospasmo.

5. EFFETTI INDESIDERATI

Le reazioni alla chemioterapia variano da individuo a individuo e possono variare se il trattamento è effettuato con una combinazione di chemioterapici anziché con un solo farmaco.

Effetti collaterali:

- Tossicità ematologica (leucopenia, anemia, trombocitopenia, fino ad arrivare alle leucemie)
L'Etoposide può causare anemia, tendenza a sviluppare ecchimosi o emorragie e infezioni. La ridotta funzionalità del midollo osseo può manifestarsi circa sette giorni dopo la somministrazione del farmaco, raggiungendo usualmente i valori minimi 10-14 giorni dopo la chemioterapia. Quindi il conteggio delle cellule ematiche ricomincia a salire costantemente e di solito si normalizza entro 21-28 giorni.
- Tossicità gastrointestinale
La nausea e il vomito sono facilmente contrastabili con l'utilizzo di antiemetici.
- Stomatite/mucosite
- Disfunzione epatica
- Alopecia
I capelli cominciano a cadere di solito dopo tre-quattro settimane dall'inizio della terapia, ma la caduta può evidenziarsi anche prima. I capelli possono diradarsi o cadere

completamente, anche le sopracciglia, le ciglia e gli altri peli corporei si diradano e quindi cadono. Si tratta di un effetto collaterale temporaneo: i capelli ricresceranno una volta che il trattamento si sarà concluso.

- Dermatologici

L'orticaria con o senza prurito.

- Neurotossicità

Una depressione del sistema nervoso centrale è stata osservata in pazienti che ricevono dosi più alte di quelle raccomandate.

- Ipotensione

Ipotensione transitoria soprattutto dopo somministrazione endovenosa di Etoposide.

Morte improvvisa a causa di aritmia.

Effetti collaterali meno frequenti:

- Dolore e ulcere del cavo orale

A causa di una maggiore sensibilità delle mucose ai processi infiammatori e infettivi.

- Diarrea

A causa dell'interferenza con il normale processo mitotico degli enterociti e atrofia dei villi.

- Modificazioni della cute

L'Etoposide può causare un rash cutaneo, che può dare anche prurito. Le aree precedentemente irradiate possono irritarsi e risultare dolenti. La cute può scurirsi per l'eccessiva produzione di pigmento. La cute tornerà normale nel giro di qualche mese dalla fine del trattamento.

- Insonnia, cefalea e stato confusionale

Si tratta di effetti collaterali molto rari, che si verificano solo se il dosaggio è molto elevato.

- Reazioni allergiche

Segni di reazione allergica sono lo sviluppo di un'eruzione cutanea accompagnata da prurito, rialzo termico, brividi, rossore localizzato al volto, senso di vertigini, cefalea, mancanza di respiro, ansia e aumento della minzione.

- Dolore o bruciore nell'area di somministrazione intravenosa ⁷

CAPITOLO II

TOPOISOMERASI

L'integrità fisica e l'organizzazione del DNA devono essere mantenute per assicurare la sopravvivenza delle cellule. Processi vitali quali la replicazione, la trascrizione, la ricombinazione, l'associazione del duplex con gli istoni e con altre proteine portano il DNA a superavvolgersi. In particolare, la separazione dei due filamenti dell'elica genera tensioni ed altri effetti topologici che devono essere risolti, affinché i processi metabolici del DNA possano essere completati. Tali problemi sono superati grazie ad una serie di enzimi ubiquitari che prendono il nome di DNA topoisomerasi.

1. LA TOPOLOGIA DEL DNA

In vivo l'asse dell'elica di DNA è solitamente incurvato, in modo che molecole di DNA, di lunghezza compresa tra pochi millimetri e diversi centimetri, possano essere contenute in cellule, le cui dimensioni sono dell'ordine dei micrometri. Nelle cellule eucariotiche il DNA si avvolge intorno a strutture proteiche chiamate istoni, mentre nei procarioti l'intero genoma, solitamente di struttura circolare, esiste in una forma estremamente compatta, nella quale l'asse dell'elica non giace sul piano. Questo "impacchettamento" determina un aumento dell'energia della molecola, la quale può essere successivamente utilizzata in processi di srotolamento della doppia elica, durante la replicazione e la trascrizione.

Un eccesso di energia immagazzinata sotto questa forma non è, però, vantaggioso in quanto il DNA diventa soggetto a notevoli forze di stiramento e deformazione. In natura tale problema viene superato mediante il superavvolgimento della molecola di DNA, in altre parole l'asse dell'elica si curva in una spirale. Il superavvolgimento non è casuale, ma è finemente regolato dalla cellula, in particolare ogni cellula esibisce un proprio caratteristico grado di superavvolgimento.

La tipologia e il livello di superavvolgimento nelle molecole di DNA circolare possono essere descritti dall'equazione:

$$Lk = Tw + Wr$$

Lk o "*linking number*" indica il numero totale di volte in cui i due scheletri fosfodiesterici della

doppia elica di DNA si avvolgono l'uno intorno all'altro. Caratteristica del *linking number* è di essere un'invariante topologica, ossia non può cambiare qualunque sia la conformazione topoisomerica della molecola, a meno che, la stessa, non sia tagliata e risaldata. I topoisomeri sono, infatti, isomeri topologici, ovvero molecole identiche, che differiscono esclusivamente per il proprio stato di superavvolgimento. Il *linking number* è sempre un numero intero, in quanto i due filamenti devono passare l'uno intorno all'altro un numero intero di volte, prima della saldatura delle due estremità per formare la molecola circolante.

T_w o "*twisting number*" è una proprietà della doppia elica e rappresenta la rotazione di una catena sull'altra, corrisponde al numero dei giri d'elica del duplex ed è determinato dal numero delle coppie di basi per giro.

W_r o "*writhing number*" indica le volte in cui l'asse dell'elica del DNA gira attorno all'asse della superelica.

Il *twisting number* e il *writhing number* non sono necessariamente numeri interi, ma la loro somma è sempre la loro somma, essendo questa il *linking number*.

Se potessimo srotolare e allineare il DNA contenuto in una sola nostra cellula, otterremmo un filamento lungo circa 2 metri. Il DNA è però ripiegato su se stesso in modo così efficiente da occupare uno spazio un milione di volte più piccolo, il nucleo della cellula, che ha un diametro di circa 2 micron.

Il DNA è costituito da due filamenti avvolti su se stessi per formare una struttura chiamata doppia elica che deve essere svolta per rendere disponibili le informazioni genetiche. Le cellule sintetizzano una serie di enzimi diversi chiamati topoisomerasi che srotolano e rilassano i filamenti di DNA.

Le topoisomerasi sono una categoria di enzimi appartenenti alla classe delle isomerasi che regolano il metabolismo del DNA. In particolare determinano un aumento o una diminuzione del grado di superavvolgimento. Tali enzimi svolgono un ruolo fondamentale nell'impacchettamento e nella replicazione del DNA. Più in dettaglio, essi sono in grado di introdurre una rottura del singolo o del doppio filamento di DNA in modo temporaneo.

2. CLASSIFICAZIONE

Esistono due classi di topoisomerasi:

1. Le topoisomerasi I (o DNA topoisomerasi propriamente dette) rompono transitoriamente una sola delle catene del DNA, la ruotano attorno a quella integra e infine riuniscono le estremità interrotte, modificando il numero di legame Lk (*linking number*, ossia il numero di volte che la seconda catena del DNA ruota attorno alla prima perforandone la superficie immaginaria) con incrementi positivi di 1. Dal momento che il DNA è superavvolto in senso destrogiro, un incremento positivo di Lk porta in effetti ad un rilassamento della propria elica, un processo termodinamicamente favorevole. Il cambiamento del numero di legame topologico è di un'unità per volta.

Le topoisomerasi di classe I risolvono il problema della tensione causato dall'avvolgimento e dallo svolgimento del DNA. Questo enzima si avvolge attorno al DNA e fa un taglio in uno dei due filamenti. Poi, mentre resta aggrappato al punto appena tagliato, l'enzima permette all'elica di girare, per svolgere gli avvolgimenti in eccesso o in difetto. Quando il DNA si è rilassato, la topoisomerasi riconnette il filamento rotto, ripristinando il DNA a doppia elica.

La topoisomerasi I è quindi un monomero in grado di tagliare un singolo filamento del duplex di DNA e non richiede cofattori energetici.

2. Le topoisomerasi II (DNA topoisomerasi idrolizzanti l'ATP), invece, rompono entrambe le catene di DNA e modificano Lk con incremento negativo di 2; dal momento che introduce un ulteriore stress topologico nella doppia elica, questa reazione necessita di energia, prodotta attraverso l'idrolisi di una molecola di ATP. Esse permettono di cambiare il numero di legami topologici di due unità per volta ⁸.

Le topoisomerasi II sono quindi specializzate nel districare il DNA nel nucleo. Per esempio, quando una cellula si sta dividendo, ha bisogno di separare le due copie di ciascun cromosoma. Durante questo processo, porzioni dei due cromosomi omologhi si possono attorcigliare tra loro, attaccandosi insieme e ostacolando la separazione. La topoisomerasi II risolve questo problema permettendo ad un'elica di DNA di passare attraverso l'altra. Taglia entrambi i filamenti di un DNA a doppia elica, mantenendo una presa fissa su entrambe le metà. Poi, passa l'altro filamento di DNA attraverso l'apertura, risolvendo il groviglio. Infine, riduce insieme i terminali che aveva tagliato, ripristinando il DNA.

La topoisomerasi II, al contrario della topoisomerasi I, agisce come dimero, taglia entrambi i filamenti del DNA ed è ATP dipendente (Fig. 4).

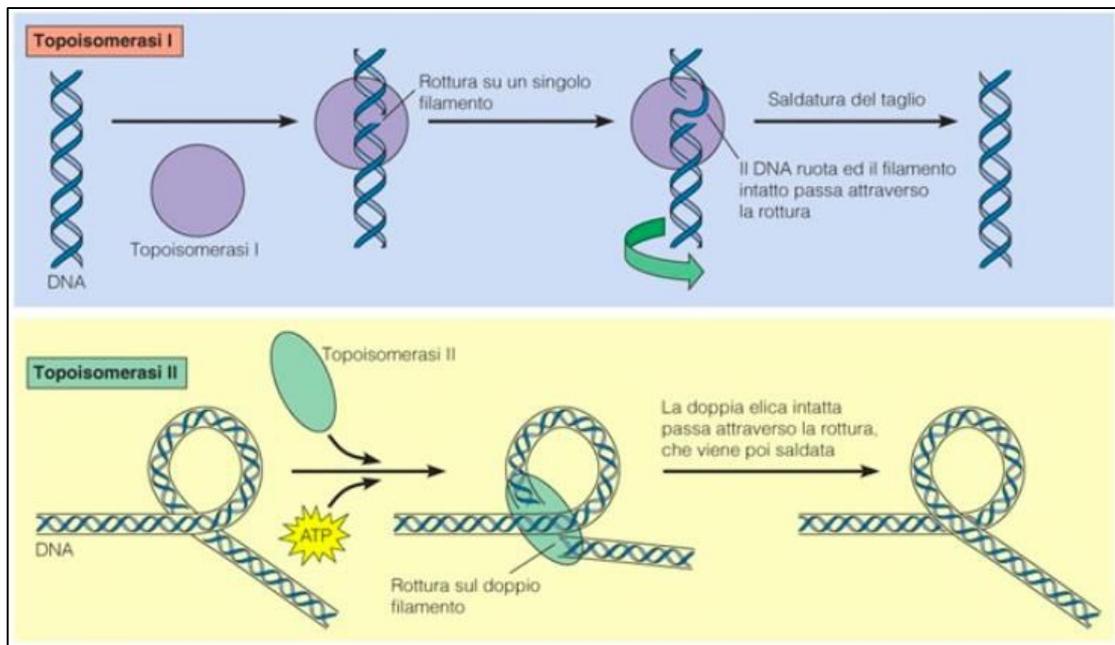


Fig. 4 Meccanismo d'azione delle topoisomerasi

3. INIBITORI DELLE TOPOISOMERASI

Questi processi di rilassamento e districamento sono essenziali per la corretta manutenzione del DNA, quindi le topoisomerasi sono obiettivi ideali per i farmaci antitumorali. Se le topoisomerasi vengono bloccate, la cellula incontra dei problemi durante la trascrizione del DNA e durante la divisione cellulare.

La chemioterapia sfrutta questo fatto, usando farmaci che bloccano le topoisomerasi per uccidere le cellule cancerose che si dividono rapidamente.

Tra i farmaci antineoplastici più utilizzati rientrano tutta una serie di composti in grado di formare un complesso ternario con il DNA e la topoisomerasi (stabilizzando quindi il cosiddetto "cleavable complex") e di ostacolare una fase specifica del processo catalitico che consiste nella rigiunzione del DNA precedentemente tagliato.

I composti che inibiscono la topoisomerasi I agiscono principalmente durante la fase replicativa del ciclo cellulare (fase S), invece le lesioni causate dagli inibitori della topoisomerasi II sono associate alla fase di trascrizione dell'RNA ed avvengono quindi durante quasi tutto il ciclo

cellulare (fase G2/M).

Nelle cellule umane i due enzimi non sono espressi allo stesso modo: la topoisomerasi I è molto abbondante nei tessuti tumorali del colon, invece la topoisomerasi II predomina a livello della mammella e delle ovaie.

Le topoisomerasi esplicano la loro azione mediante un residuo tirosinico che dà attacco nucleofilo ad un fosfato della catena desossiribonucleica; il filamento di DNA resta ancorato all'enzima mediante legame fosfotirosinico fin quando, eliminata la tensione dovuta ai superavvolgimenti, una reazione inversa alla precedente ristabilirà il legame fosfodiesterico e libererà l'enzima.

Inibitori della topoisomerasi I:

- NSC 314622: rimasto nel campo di ricerca di laboratorio
- Necatorone: efficace in alcuni sarcomi
- Camptotecina e i suoi derivati (Topotecano, Irinotecano, Gimatecano): usati correntemente della terapia di alcuni carcinomi umani (in particolare il carcinoma del colon-retto e dell'ovaio) e di certi linfomi; l'ultimo derivato chiamato Edotecarin sembra dare risultati promettenti nei tumori epatici, della laringe, della prostata, dello stomaco e del polmone.

Inibitori della topoisomerasi II:

- Lucantone: è stato usato per i tumori maligni del sangue
- Actinomicina D: antitumorale usato soprattutto in passato, ora soppiantato da farmaci più efficaci
- Adriamicina: uno dei farmaci antitumorali più usati negli schemi di chemioterapia per i tumori solidi (in particolare il carcinoma della mammella e i sarcomi) ed ematologici (leucemie mieloidi, sarcomi)
- Mitoxantrone: antrachinonico efficace nelle emopatie maligne e sensibilizzante agli effetti delle radiazioni
- I derivati della epipodofillotossina Etoposide (VP-16) e Teniposide (VM-26): diffusamente usati per la cura dei carcinomi
- Amsacrina: usata nelle leucemie refrattarie alla terapia convenzionale

CAPITOLO III

ANGIOGENESI

I vasi ematici si formano durante lo sviluppo embrionale per vasculogenesi, durante la quale viene costituita una rete vascolare primitiva a partire dai precursori delle cellule endoteliali detti angioblasti. Il processo di formazione dei vasi sanguigni nell'adulto è noto come angiogenesi o neovascolarizzazione e, fino a poco tempo fa, si pensava dipendesse solo dalla ramificazione e dall'estensione dei vasi preesistenti. Recenti lavori hanno dimostrato che l'angiogenesi può verificarsi anche tramite il reclutamento dei precursori delle cellule endoteliali (*Endothelial Progenitor Cells, EPC*) dal midollo osseo⁹ (Fig. 5).

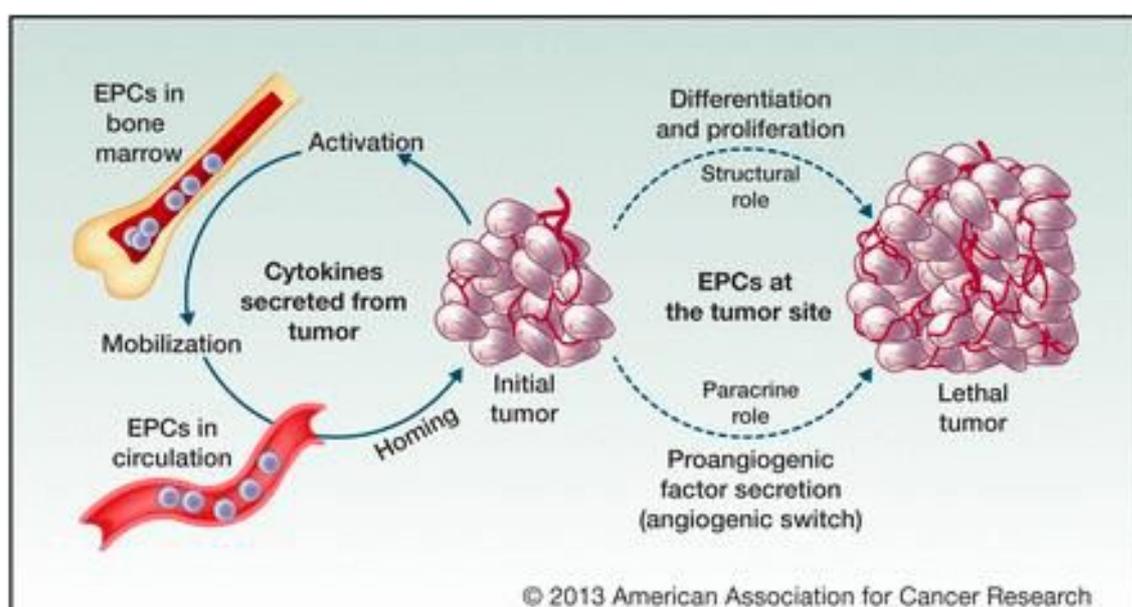


Fig. 5 Gli EPC vengono mobilizzati dal midollo osseo e possono migrare verso la sede di una lesione o di un tumore in crescita. In tali sedi gli EPC si differenziano e formano una rete ben organizzata legandosi con i vasi esistenti. Nell'angiogenesi che avviene a partire da vasi preesistenti le cellule endoteliali presenti in questi vasi diventano mobili e proliferano per formare abbozzi di capillari.

L'angiogenesi è essenziale nel caso di infiammazione cronica e fibrosi, nella crescita tumorale e nella vascolarizzazione dei tessuti ischemici. Pertanto, sono stati compiuti grandi sforzi per comprendere i meccanismi angiogenici e per scoprire i potenziali effetti terapeutici associati agli agenti proangiogenici (per aumentare i vasi sanguigni, quando necessario) e antiangiogenici (per arrestare l'angiogenesi patologica)¹⁰.

1. ANGIOGENESI DERIVANTE DAI VASI PREESISTENTI

In questo tipo di angiogenesi vi sono vasodilatazione e aumento della permeabilità dei vasi esistenti, degradazione della matrice extracellulare e migrazione delle cellule endoteliali.

I passaggi principali sono i seguenti:

- vasodilatazione in risposta a ossido nitrico e aumento della permeabilità dei vasi preesistenti indotta dal VEGF
- degradazione proteolitica della membrana basale del vaso preesistente a opera delle metalloproteinasi e distruzione dei contatti tra le cellule endoteliali del vaso da parte dell'attivatore del plasminogeno
- migrazione delle cellule endoteliali verso lo stimolo angiogenico
- proliferazione delle cellule endoteliali, subito di seguito al fronte delle cellule migranti
- maturazione delle cellule endoteliali, che comprende l'inibizione della crescita e il rimodellamento dei capillari
- reclutamento di cellule periendotheliali (compresi i periciti per piccoli capillari e le cellule muscolari lisce per i vasi più grandi) allo scopo di fornire il sostegno alle strutture endoteliali e formare i vasi maturi ¹¹

2. ANGIOGENESI DERIVANTE DAI PRECURSORI DELLE CELLULE ENDOTELIALI

Le formazioni dei sistemi emopoietico e vascolare sono strettamente correlate durante lo sviluppo embrionale ¹². I due sistemi condividono un comune precursore, l'emangioblasto, che può generare cellule staminali emopoietiche e angioblasti, le cellule che danno vita al sistema vascolare ¹³.

Gli angioblasti proliferano, migrano verso siti periferici e si differenziano in cellule endoteliali che formano le arterie, le vene e i vasi linfatici ¹⁴. Possono anche generare i periciti e le cellule muscolari lisce della parete vascolare (cellule periendotheliali). I precursori delle cellule endoteliali (EPC) si riscontrano nel midollo osseo degli organismi adulti e possono essere reclutate nei tessuti per dare inizio all'angiogenesi ¹⁵. La natura del meccanismo di *homing* è incerta ¹⁶. Angioblasti circolanti e derivanti dal midollo, o cellule EPC negli adulti, esprimono i marcatori delle cellule staminali emopoietiche, nonché specifici marcatori endoteliali quali caderine endoteliali vascolari,

E-selectine e il recettore Tie2. Le EPC partecipano alla sostituzione delle cellule endoteliali perse, alla riendotelizzazione di strutture vascolari, alla neovascolarizzazione di strutture vascolari e alla neovascolarizzazione di organi ischemici, ferite cutanee e tumori (Fig. 6)

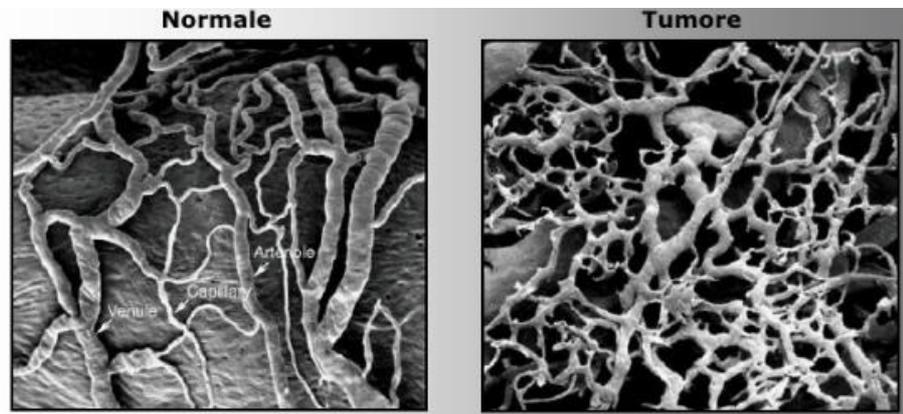


Fig. 6 Rispetto ai normali vasi ematici (a sinistra), i vasi del tumore sono tortuosi e di forma irregolare. Il sistema vascolare del tumore è formato da precursori di cellule endoteliali circolanti e da vasi esistenti dell'ospite. Al contrario della rete stabile di vasi del tessuto normale, le reti vascolari formate dai vasi tumorali sono instabili e mal definite. Mentre arteriole, capillari e vene sono chiaramente distinguibili nel sistema vascolare normale in un tumore i vasi sono disorganizzati e non identificabili.

3. ANGIOGENESI TUMORALE

L'angiogenesi risulta di fondamentale importanza durante lo sviluppo embrionale e la crescita di un individuo. Nell'adulto, in condizioni normali, il sistema microvascolare è quiescente e può tuttavia essere rapidamente attivato per brevi periodi in risposta a determinate esigenze dell'organismo. L'angiogenesi può essere osservata in numerose affezioni oftalmologiche (retinopatia diabetica proliferativa), dermatologiche (psoriasi), immunologiche e infiammatorie (artrite reumatoide) o degenerative (placche aterosclerotiche) ¹⁷.

L'angiogenesi più intensa e significativa è quella che riguarda la neovascolarizzazione tumorale, dal momento che essa è di fondamentale importanza per la sopravvivenza stessa della massa tumorale e per la sua attività metastatica. Nel 1984 Folkman scriveva *“una volta che il tumore si è sviluppato, ogni aumento della popolazione cellulare tumorale può essere preceduto da un incremento nel numero di nuovi capillari che si dirigono verso il tumore”*; espressione che riassume perfettamente la diretta dipendenza della crescita tumorale dall'angiogenesi ¹⁸.

L'angiogenesi è inoltre necessaria sia all'inizio che alla fine dello sviluppo di una metastasi. Infatti, nel tumore primario durante il processo di formazione della nuova rete vascolare, le pareti

delle neovenule risultano altamente permeabili, il che facilita il passaggio in circolo di cellule metastatiche.

Una efficace attività angiogenica è poi indispensabile a livello del focolaio metastatico la cui crescita si arresterebbe ad un volume massimo di 2 mm, dal momento che la massima distanza tra una cellula tumorale ed il letto capillare neoformato può essere 150/200 μm , distanza che permette ancora la diffusione dell'ossigeno¹⁹. Il limite di 2 mm rappresenta la massima distanza attraverso la quale l'ossigeno e le sostanze nutritive possono diffondere dai vasi ematici. Oltre questo limite il tumore non riesce ad aumentare di volume senza vascolarizzazione a causa della morte cellulare indotta dall'ipossia. La neovascolarizzazione ha un effetto duplice sulla crescita tumorale: la perfusione fornisce sostanze nutritive e ossigeno e le cellule endoteliali neoformatesi stimolano la crescita delle cellule tumorali adiacenti secernendo fattori di crescita polipeptidici, come i fattori di crescita insulino-simili e PDGF²⁰. L'angiogenesi è anche un requisito necessario per la formazione delle metastasi. Senza l'accesso ai vasi, le cellule tumorali non potrebbero facilmente diffondere a distanza.

Sebbene un'aumentata produzione di fattori angiogenici sia necessaria, essa non è tuttavia sufficiente a far acquisire al tumore un fenotipo angiogenico. Contemporaneamente, infatti, si deve avere una diminuzione dei fattori che modulano negativamente la sintesi di nuovi vasi.

L'angiogenesi tumorale è stata quindi considerata come un target promettente per la terapia anticancro²¹. La modalità d'azione sembra spiegarsi dall'interazione degli agenti chemioterapici con la proliferazione delle cellule endoteliali nel processo di angiogenesi tumorale²² (Fig. 7).



Fig. 7 Fasi dell'angiogenesi tumorale

4. FATTORI DI MODULAZIONE DELL'ANGIOGENESI: PROTEINE DELLA MATRICE EXTRACELLULARE

I meccanismi coinvolti nell'acquisizione dell'attività angiogenica di una neoplasia sono molteplici e tuttora non ben conosciuti, diversi tipi di fattori sono infatti in grado di modulare tale processo. Componenti chiave dell'angiogenesi sono la mobilità e la migrazione delle cellule endoteliali necessarie per la formazione dei nuovi vasi sanguigni. Questi processi sono controllati da varie classi di proteine ²³:

- le integrine, essenziali per la formazione e il mantenimento dei vasi sanguigni neoformati ²⁴.
- le proteine matricellulari, comprese la trombospondina 1 ²⁵, SPARC e la tenascina C che destabilizzano le interazioni tra cellula e matrice promuovendo così l'angiogenesi ²⁶. La sintesi della trombospondina è alterata durante il processo di crescita tumorale ²⁷. Infatti, quando le cellule tumorali diventano angiogeniche, esse producono solo il 4-5% della trombospondina prodotta dai tessuti normali da cui originano ²⁸. Nei fibroblasti umani questo inibitore dell'angiogenesi è normalmente sotto il controllo dell'antioncogene p53. Recentemente è stato caratterizzato un nuovo fattore antiangiogenico, l'angiostatina, inibitore specifico della proliferazione delle cellule endoteliali, che si accumula in circolo in presenza di un tumore primario e scompare quando il tumore è rimosso ²⁹.
- le proteasi, come gli attivatori del plasminogeno e le metalloproteasi della matrice, importanti nel rimodellamento dei tessuti durante l'invasione endoteliale. Le proteasi possono anche rilasciare inibitori come l'endostatina, un piccolo frammento del collagene che inibisce la proliferazione endoteliale e l'angiogenesi ³⁰.

5. FATTORI DI MODULAZIONE DELL'ANGIOGENESI: FATTORI DI CRESCITA E RECETTORI

Fra essi sono compresi fattori di crescita, quali il Transforming Growth Factor beta (TGF β), il Platelet Derived Growth Factor (PDGF), il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e i due Fibroblast Growth Factors (FGF), acido e basico, o possono esserci peptidi a basso peso molecolare, quali l'angiogenina ³¹.

Il VEGF viene secreto da molte cellule mesenchimali e stromali, mentre VEGFR-2, il recettore (tirosina-chinasico) più importante nell'angiogenesi, è strettamente circoscritto alle cellule

endoteliali e ai loro precursori. Nell'angiogenesi che deriva dai precursori delle cellule endoteliali, il VEGF, che agisce tramite VEGFR-2, stimola la mobilitazione dei precursori delle cellule endoteliali dal midollo osseo e facilita la proliferazione cellulare e il differenziamento di queste cellule nella sede dell'angiogenesi. Le cellule endoteliali derivate da questi progenitori inizialmente formano un delicato plesso capillare, che evolve poi in una rete capillare matura. Nell'angiogenesi che origina da vasi locali preesistenti, il VEGF stimola sia la proliferazione sia la mobilità delle cellule endoteliali, iniziando quindi a dar vita a nuovi capillari. La proliferazione, il differenziamento e la migrazione delle cellule endoteliali possono essere incrementati da FGF ³².

Indipendentemente dal processo che porta alla formazione del capillare, i vasi di recente formazione sono fragili e necessitano di una maggiore "stabilità". La stabilizzazione richiede il reclutamento di periciti e cellule muscolari lisce, nonché la deposizione delle proteine della matrice extracellulare. Le Angiopietine 1 e 2 (Ang1 e Ang2), il PDGF e il TGFb partecipano al processo di stabilizzazione. Ang1 interagisce con un recettore posto sulla superficie delle cellule endoteliali detto Tie2 per reclutare le cellule periendotheliali. Il PDGF partecipa al reclutamento delle cellule muscolari lisce, mentre il TGFb stabilizza i vasi di recente formazione incrementando la produzione delle proteine della ECM. L'interazione Ang1/Tie2 media la maturazione dei vasi a partire dalle strutture endoteliali semplici fino alle strutture vascolari più elaborate e aiuta a mantenere quiescenti le cellule endoteliali. Ang2, al contrario, interagendo anche con Tie2, svolge l'effetto opposto, rendendo più labili le cellule endoteliali che diventano così più sensibili alla stimolazione dei fattori di crescita come il VEGF e che, in assenza di VEGF, diventano più sensibili agli inibitori dell'angiogenesi. Il fenotipo angiogenico compare quando accanto all'aumentata produzione di questi fattori, si osserva una diminuzione dei modulatori negativi ³³.

La maggior parte dei tumori solidi umani sono caratterizzati da una prima fase non vascolarizzata, durante la quale il numero di cellule è troppo piccolo perché il tumore possa essere evidenziato, né sono presenti metastasi. Vi è poi la seconda fase, quella vascolare, generalmente accompagnata da una rapida crescita del tumore primario e regolata da molteplici meccanismi biochimici e genetici. Non solo le cellule neoplastiche producono peptidi angiogenici, ma anche le cellule endoteliali possono produrre fattori di crescita e citochine che stimolano le cellule tumorali a proliferare. Inoltre, i macrofagi presenti nella massa tumorale, attivati dalle stesse cellule neoplastiche, secernono fattori capaci di stimolare l'angiogenesi in vitro e in vivo. Infine, la liberazione di alcuni enzimi da parte delle cellule tumorali permette la liberazione dalla matrice di fattori di crescita per le cellule endoteliali ³⁴.

CAPITOLO IV

SISTEMA IMMUNITARIO E TUMORI

I tumori originano dalla proliferazione incontrollata di cloni di cellule trasformate e dalla loro diffusione (metastatizzazione) nell'organismo. La crescita dei tumori maligni è condizionata in larga misura dalla capacità delle cellule tumorali di proliferare e invadere i tessuti dell'ospite metastatizzando in siti distanti dal luogo di origine; le neoplasie maligne sembrano inoltre in grado di sfuggire ai meccanismi di difesa dell'ospite. La possibilità di ottenere l'eradicazione dei tumori tramite risposte immunitarie specifiche ha dato origine a una branca a sé stante dell'immunologia, l'immunologia dei tumori. Il concetto di *immunosorveglianza* proposto da Burnet negli anni '50 prevede che una delle funzioni fisiologiche del sistema immunitario sia quella di riconoscere e distruggere i cloni di cellule trasformate prima che esse possano crescere e formare tumori, nonché di uccidere i tumori una volta che essi si siano generati (Fig. 8)^{35 36}.

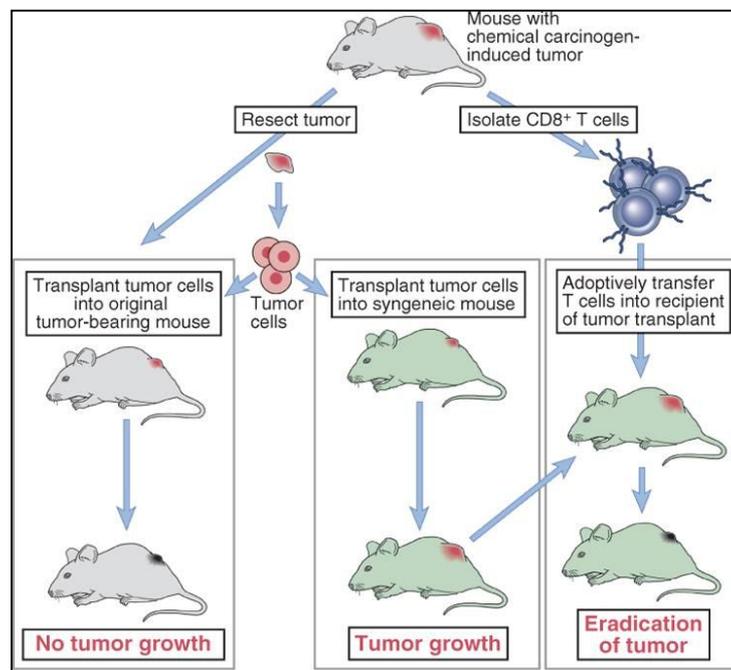


Fig. 8 Topi a cui è stato asportato un tumore indotto chimicamente rigettano il successivo trapianto dello stesso tumore. Il tumore trapiantato in un topo normale cresce. Il tumore viene rigettato da topi normali a cui sono stati trasferiti linfociti T del topo da cui è stato prelevato il tumore.

1. CARATTERISTICHE GENERALI DELL'IMMUNITA' AI TUMORI

- I tumori esprimono antigeni riconosciuti come estranei dal sistema immunitario del paziente portatore di neoplasia. I tumori, pur originando dalle cellule dell'ospite, sono in grado di evocare una risposta immunitaria.
- Le risposte immunitarie spesso non riescono a prevenire la crescita dei tumori. I motivi per cui il sistema immunitario non è capace di eliminare le cellule trasformate possono essere molteplici.

In primo luogo, le cellule tumorali derivano da cellule normali dell'ospite e somigliano quindi ad esse sotto molti aspetti: la maggior parte dei tumori esprime solo pochi antigeni riconoscibili come non-*self* e tende quindi ad essere scarsamente immunogenica. In generale, i tumori che evocano una vigorosa risposta immunitaria sono quelli che esprimono antigeni estranei o forme mutate di proteine autologhe.

In secondo luogo, la rapida crescita e diffusione del tumore può travolgere le capacità di difesa del sistema immunitario: il controllo di un tumore richiede infatti che tutte le cellule neoplastiche vengano eliminate.

Infine, molti tumori manifestano una singolare capacità di sfuggire alla risposta immunitaria dell'ospite.

- Il sistema immunitario può essere stimolato in modo tale da divenire capace di uccidere efficacemente le cellule neoplastiche ed eradicare il tumore. Questo concetto ha aperto nuovi orizzonti terapeutici, il cui obiettivo è il potenziamento della risposta immunitaria dell'ospite verso gli antigeni espressi dal tumore ³⁷.

2. ANTIGENI TUMORALI

Nell'uomo sono stati identificati molti antigeni tumorali, riconosciuti da linfociti T e B. Gli antigeni espressi su cellule tumorali e non su cellule normali vengono chiamati antigeni tumore-specifici (TSA); gli antigeni tumorali espressi anche su cellule normali vengono chiamati tumore-associati (TAA) ³⁸.

Esistono diverse classi di antigeni tumorali (Fig. 9):

- Prodotti di oncogeni e di geni oncosoppressori mutati
Alcuni antigeni tumorali sono prodotti da forme oncogene mutate di normali geni cellulari. Molti tumori esprimono geni necessari per la trasformazione maligna o per il mantenimento del fenotipo neoplastico; questi geni vengono spesso prodotti a seguito di mutazioni puntiformi, delezioni, traslocazioni cromosomiche o inserzione di geni virali a carico di proto-oncogeni o di geni oncosoppressori, dando così origine a geni oncogeni il cui prodotto possiede un'attività trasformante.
- Prodotti di altri geni mutati
Antigeni tumorali possono derivare dalla mutazione di geni il cui prodotto non è correlato al fenotipo trasformato e la cui funzione è sconosciuta.
- Proteine cellulari normali espresse in maniera aberrante
Gli antigeni tumorali possono essere rappresentati da proteine cellulari normali espresse sulle cellule tumorali in maniera eccessiva o aberrante. Alcuni antigeni tumorali sono in realtà proteine prodotte dalle cellule normali a livello molto basso ed iperespresse nelle cellule tumorali. Altri antigeni tumorali possono derivare da geni non espressi nei tessuti normali, o espressi solo nelle prime fasi dello sviluppo e poi deregolati a seguito della trasformazione maligna della cellula. La trasformazione neoplastica si può accompagnare a un'espressione genica aberrante: geni normali vengono così espressi in tessuti in cui non dovrebbero essere espressi, o in un momento in cui dovrebbero essere silenti.
- Antigeni tumorali codificati dal genoma di virus oncogeni
I prodotti di virus oncogeni si comportano da antigeni tumorali ed evocano una risposta T specifica che può servire all'eradicazione del tumore.
- Antigeni oncofetali
Gli antigeni oncofetali sono proteine espresse a livelli elevati su cellule tumorali e su tessuti normali durante la loro ontogenesi, ma non nell'età adulta. I due antigeni oncofetali meglio caratterizzati sono il CEA e l'AFP.
- Antigeni glicolipidici e glicoproteici alterati
La maggior parte dei tumori esprime livelli maggiori del normale di alcune glicoproteine o glicolipidi di superficie, che possono essere sfruttati come marcatori diagnostici o bersagli dell'immunoterapia.

- Antigeni tessuto-specifici di differenziamento

I tumori esprimono molecole normalmente presenti sulle cellule da cui essi derivano. Tali antigeni sono definiti “antigeni di differenziamento” in quanto specifici di particolari stadi o di un certo stadio di differenziamento ³⁹.

		Examples
Normal host cell displaying multiple MHC-associated self antigens	Normal self protein	No T cell response
	Mutated self protein	Various mutant proteins in carcinogen or radiation induced animal tumors; various mutated proteins in melanomas
Tumor cells expressing different types of tumor antigens	Product of oncogene or mutated tumor suppressor gene	Oncogene products: mutated Ras, Bcr/Abl fusion proteins Tumor suppressor gene products: mutated p53 protein
	Overexpressed or aberrantly expressed self protein	Overexpressed: tyrosinase, gp100, MART in melanomas. Aberrantly expressed: Cancer/testis antigens (MAGE, BAGE)
	Oncogenic virus	Human papilloma virus E6, E7 proteins in cervical carcinoma; EBNA proteins in EBV-induced lymphomas

Fig. 9 Antigeni associati a tumori

3. RISPOSTE IMMUNITARIE AI TUMORI

Linfociti T

Il principale meccanismo di immunità ai tumori è rappresentato dall’uccisione delle cellule neoplastiche da parte dei CTL CD8 (linfociti T citotossici). Il ruolo svolto dai linfociti T helper CD4 nell’immunità antitumorale è invece meno chiaro; è possibile che essi siano coinvolti nella risposta contro i tumori producendo citochine in grado di permettere lo sviluppo di effettori CTL. I linfociti T helper specifici per gli antigeni tumorali possono inoltre secernere citochine, quali TNF e INF-gamma, capaci di potenziare l’espressione di molecole MHC da parte delle cellule tumorali, e quindi la loro sensibilità alla lisi da parte dei CTL.

E’ verosimile che le cellule tumorali siano catturate dalle APC dell’ospite e che gli antigeni tumorali vadano a processazione all’interno di queste ultime: i peptidi da essi derivati verrebbero così presentati in associazione a molecole MHC di classe I, permettendone il riconoscimento da parte delle cellule T CD8 (Fig. 10)⁴⁰.

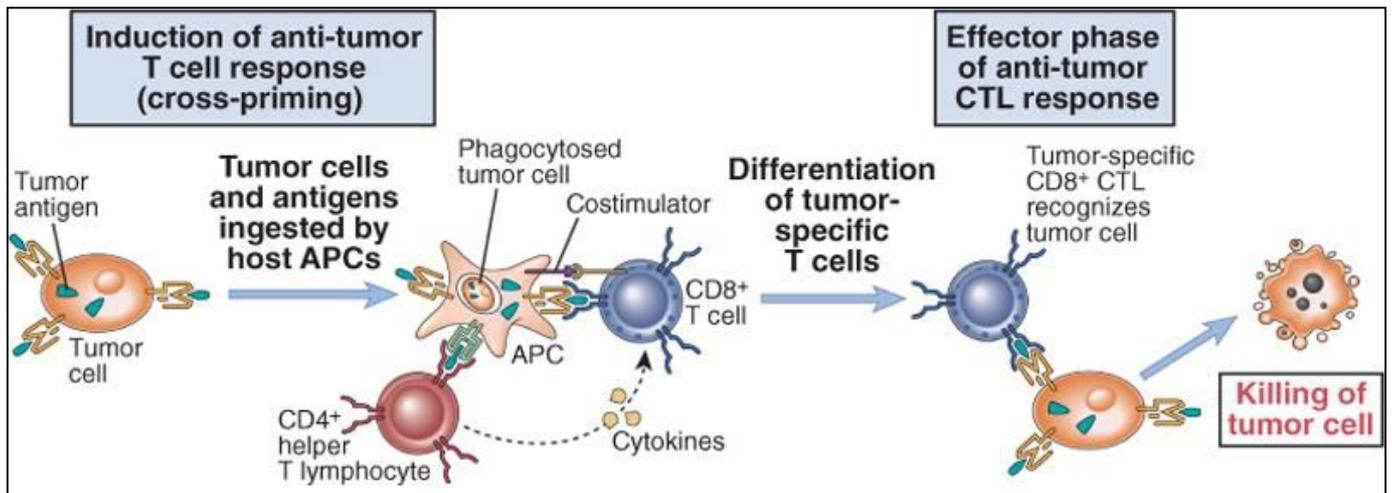


Fig. 10 La risposta dei linfociti T CD8 ai tumori può essere indotta attraverso un meccanismo di cross-priming (cross-presentazione), in cui le cellule tumorali o antigeni del tumore sono internalizzati, processati e presentati alle cellule T dalle cellule presentanti l'antigene (APC). Le APC possono anche stimolare i linfociti T CD4 che forniscono segnali per lo sviluppo dei CTL

Anticorpi

Individui portatori di tumore possono produrre anticorpi contro vari antigeni tumorali. Tali anticorpi possono uccidere le cellule tumorali attivando il complemento o grazie a un fenomeno di citotossicità cellulare mediata da anticorpi (ADCC), sfruttando il legame della porzione Fc degli anticorpi ai relativi recettori espressi da macrofagi o cellule NK.

Cellule NK

Le cellule NK uccidono un'ampia gamma di cellule tumorali, in particolare cellule con ridotta espressione di molecole MHC di classe I che possono sfuggire alla lisi mediata da CTL. La capacità tumoricida delle cellule NK è potenziata da citochine quali gli interferoni, l'IL-1 e l'IL-12.

Macrofagi

Il ruolo svolto dai macrofagi nell'immunità antitumorale è in gran parte suggerito dal fatto che i macrofagi attivati sono capaci di uccidere in vitro molti tipi di cellule tumorali con efficienza molto maggiore di quanto essi non siano capaci di uccidere cellule normali: non è tuttavia noto come i macrofagi possano essere attivati dai tumori. I macrofagi possono uccidere un bersaglio tumorale mediante la liberazione di enzimi lisosomiali, di intermedi reattivi dell'ossigeno e di ossido nitrico. Producono anche TNF che è in grado di uccidere cellule tumorali, ma non cellule normali ⁴¹.

4. EVASIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA DA PARTE DEI TUMORI

I tumori maligni possono sviluppare meccanismi che consentono loro di sfuggire o resistere alla risposta immunitaria dell'ospite. Uno dei principali obiettivi dell'immunologia dei tumori è quello di comprendere le vie attraverso cui le cellule tumorali riescono a sottrarsi alla distruzione da parte del sistema immunitario, nella speranza di individuare strategie atte ad aumentare l'immunogenicità dei tumori e la risposta dell'ospite. Il processo di evasione della risposta immunitaria può essere il risultato di numerosi meccanismi ⁴²:

- L'espressione delle molecole MHC di classe I può essere diminuita sulle cellule tumorali, così da precluderne il riconoscimento da parte dei CTL.
- I tumori perdono l'espressione degli antigeni in grado di evocare risposte immunitarie.
- I tumori possono non riuscire a evocare una risposta CTL, dato che la maggior parte delle cellule tumorali non esprime costimolatori o molecole MHC di classe II.
- Fattori prodotti dalle cellule tumorali possono sopprimere le risposte immunitarie dirette contro le neoplasie (IL-10, VEGF, TGFbeta, PGE2)
- Gli antigeni tumorali possono indurre una tolleranza immunologica specifica (Fig. 11)^{43 44}.

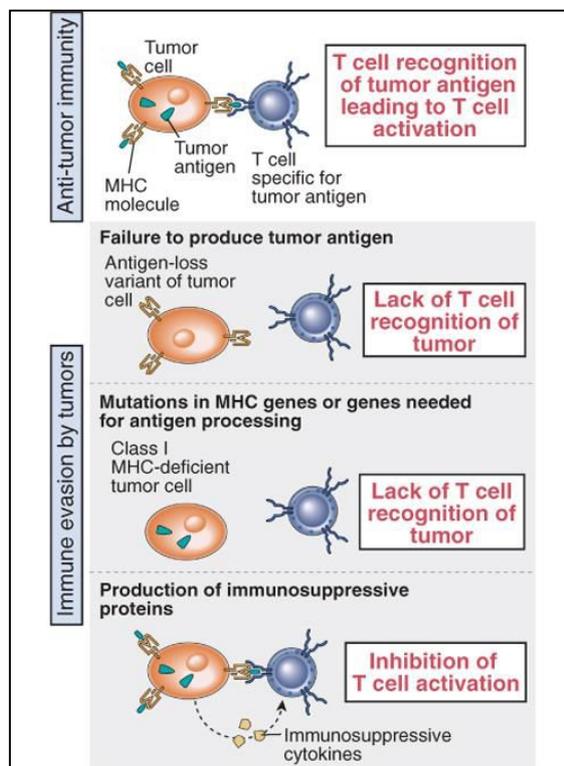


Fig. 11 Evasione della risposta immunitaria

Esistono almeno tre traguardi che devono essere raggiunti spontaneamente o con una terapia per avere una risposta immune efficiente contro il tumore:

- Presentazione degli antigeni tumorali da parte delle cellule dendritiche
- Promuovere un'adeguata risposta delle cellule T protettive (CD8 con attività citotossica)
- Superare l'immunosoppressione indotta dal tumore (Fig. 12)

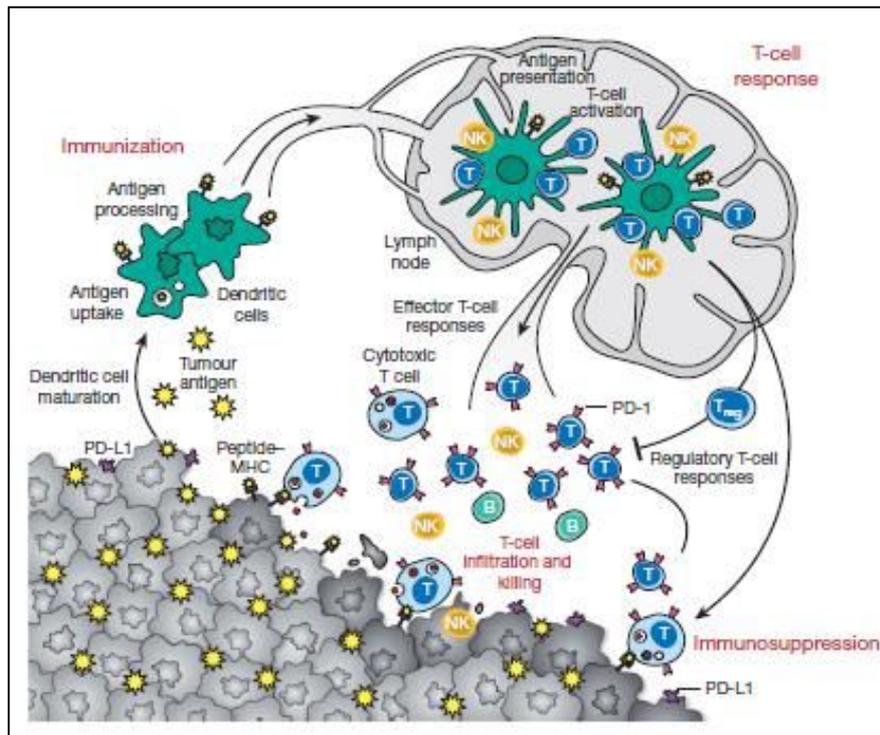


Fig. 12 Sistema immunitario e tumori

5. LA CHEMIOTERAPIA METRONOMICA

I protocolli standard di chemioterapia si basano sulla massima dose di farmaco tollerata dal paziente. Necessitano quindi di un certo tempo tra un ciclo e l'altro per permettere ai tessuti sani di recuperare dall'effetto citotossico.

La chemioterapia basata sulla massima dose tollerata è caratterizzata da alta tossicità (anche sui tessuti sani), da effetti collaterali importanti che possono influenzare la vita del paziente e, spesso, è seguita dallo sviluppo di resistenza verso il farmaco utilizzato. Nel caso dei tumori solidi essa è in grado di uccidere le cellule tumorali sensibili lasciando le cellule chemioresistenti pronte a ricolonizzare poi il letto tumorale. Per far fronte a ciò, una strategia è stata quella di sviluppare

dei regimi terapeutici aggressivi caratterizzati dalla combinazione di più farmaci, nella speranza di eradicare più cellule tumorali possibili (secondo la filosofia del *more must be better*).

Negli ultimi anni, gli studi non hanno più avuto come obiettivo la citotossicità del farmaco bensì la modificazione del microambiente tumorale. Hanno puntato quindi a una risposta prolungata piuttosto che a una regressione tumorale a breve termine, che non si traduce necessariamente in un aumento della sopravvivenza del paziente.

Una possibile e già sperimentata strategia terapeutica diversa nei confronti delle malattie oncologiche è costituita dalla cosiddetta *chemioterapia metronomica*^{45 46}, il cui razionale consiste nell'utilizzare dosi di farmaco nettamente inferiori al dosaggio standard^{47 48 49}, ma somministrate in maniera continuativa nel tempo e non rispettando il break di 3-4 settimane richiesto per somministrazioni a dosaggio pieno (Fig. 13)^{50 51 52 53}.

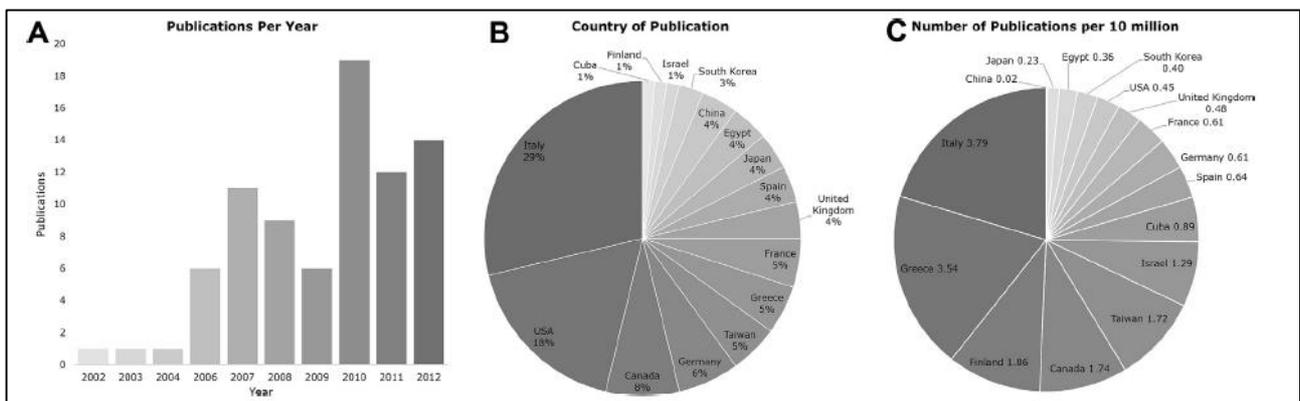


Fig. 13 Studi sulla chemioterapia metronomica dal 2002 all'aprile 2012 per anno (A), per nazione (B) e per 10 milioni di persone (C)

Questa modalità di somministrazione dei farmaci chemioterapici è denominata *chemioterapia continua a basse dosi*, *chemioterapia anti-angiogenica* o *chemioterapia metronomica*, che attiene, dunque, alla frequente, talvolta quotidiana, somministrazione di chemioterapici a dosi significativamente al di sotto della MDT^{54 55}, senza interruzioni tra i vari cicli^{56 57 58}.

Questo regime terapeutico ha grandi vantaggi come il basso costo, la bassa tossicità e la possibilità di essere attuato anche per via orale dagli stessi pazienti⁵⁹, senza bisogno di accessi venosi o lunghe infusioni^{60 61}.

Simile strategia si fonda sul presupposto per cui tumori solidi hanno continuo bisogno di mantenere efficiente il microambiente che li circonda e, in particolare, di reclutare nuovi vasi sanguigni in grado di garantire ossigeno e nutrienti essenziali alla cellula neoplastica⁶². Il tumore è infatti composto sia dalle cellule tumorali che dal suo microambiente costituito dalle cellule

endoteliali tumore associate, dalle cellule stromali (fibroblasti, periciti e cellule infiammatorie) e dalle cellule immunitarie. Attaccare le cellule del microambiente tumorale sembra quindi essere la strategia migliore a lungo termine.

Per questo motivo l'oncologia moderna spinge verso l'utilizzo di farmaci idonei a neutralizzare fattori di crescita proangiogenici e di farmaci idonei a promuovere fattori inibitori dell'angiogenesi^{63 64}. Di fatto molti dei comuni chemioterapici hanno insita la capacità antiangiogenica in quanto le cellule endoteliali dei capillari che nutrono un tumore manifestano un rapido turnover mitotico. Il problema è che in un regime a massima dose tollerata l'intervallo tra una dose e la successiva permette al tumore di far ripartire il meccanismo di neovascolarizzazione. Il potenziale antiangiogenico viene tuttavia potenziato se si annullavano gli intervalli tra le varie dosi. Questo nuovo tipo di target, riferito alle cellule endoteliali, ha diversi potenziali vantaggi: le cellule endoteliali normali, infatti, hanno grande stabilità genetica rispetto alle cellule tumorali e difficilmente sono in grado di indurre chemioresistenza.

Se viene analizzata la curva dose-risposta per le cellule tumorali e le cellule endoteliali tumorali si può addirittura notare che queste ultime vengono eliminate con un dosaggio di farmaco molto più basso (dosaggio metronomico) rispetto a quello necessario per eliminare le cellule tumorali. Danneggiare quindi le cellule endoteliali significa danneggiare le cellule tumorali, prevenendo però la selezione per cloni cellulari resistenti (Fig. 14).

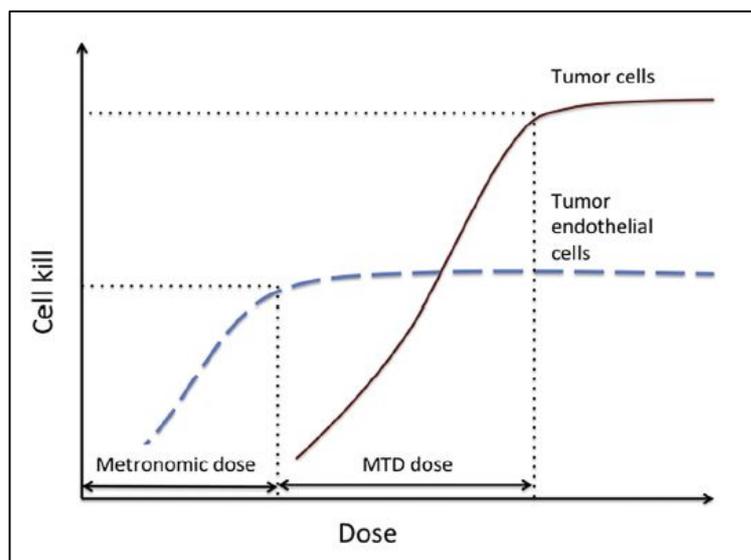


Fig. 14 Curva dose-risposta per le TC e le TECs

La chemioterapia basata sulla massima dose tollerata induce una regressione tumorale precoce e a breve termine, seguita spesso da una recidiva di malattia. La somministrazione di una

chemioterapia a dosaggio metronomico ha un effetto antitumorale ritardato; inizialmente può mantenere il tumore stazionario o, in certi casi, addirittura farlo crescere, successivamente però si ha una lenta, ma persistente diminuzione della massa tumorale (superiore *outcome* a lungo termine) ⁶⁵ (Fig. 15).

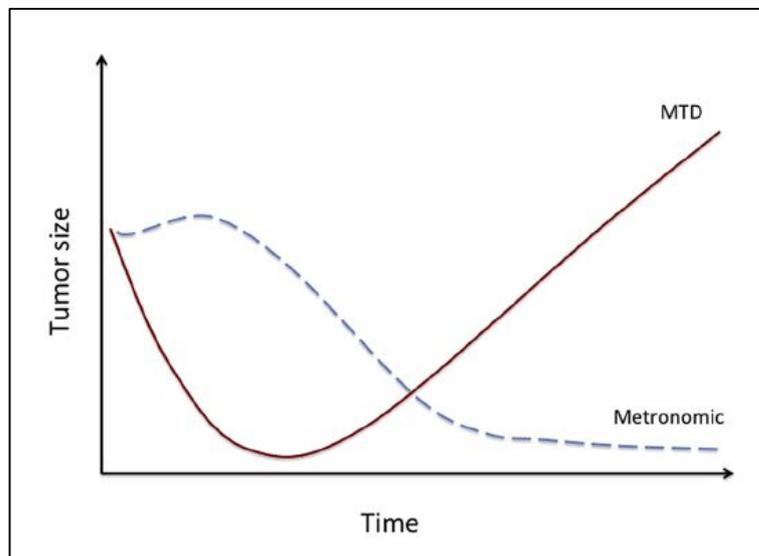


Fig.15 Risposta chemioterapia MDT vs chemioterapia metronomica

La chemioterapia metronomica sembra inibire la crescita tumorale attraverso diversi meccanismi ⁶⁶:

1. Effetto citotossico diretto nei confronti delle cellule tumorali
2. Eradicazione e distruzione delle cellule staminali tumorali (CSCs)
3. Effetto citotossico nei confronti delle cellule endoteliali attraverso uno squilibrio tra fattori proangiogenici e antiangiogenici a vantaggio di questi ultimi; stimolazione dei fattori antiangiogenici (trombospondina 1 – TSP1) e soppressione dei fattori proangiogenici (vascular endothelial growth factor – VEGF, platelet derived growth factor – PDGF, ipoxia inducible factor 1 – HIF1). Questo effetto nei confronti delle cellule endoteliali avveniva già a dosaggi dell'ordine delle picomoli ⁶⁷(gli stessi effetti tossici in cellule non endoteliali si avevano con dosaggi da 10 a 100.000 volte superiori) ^{68 69 70 71}.
4. Blocco della mobilizzazione delle cellule progenitrici endoteliali del midollo osseo: sono state identificate nel midollo osseo delle cellule progenitrici endoteliali capaci di migrare in risposta a stimoli proangiogenici e di contribuire attivamente alla formazione di una neovascolarizzazione. Queste cellule sono state quindi considerate un valido *“target”* per la terapia antiangiogenica. Bisogna dire, però, che queste cellule sarebbero sensibili anche a un regime di massima dose tollerata. Il problema risiede tuttavia nel fenomeno di

“rebound” compensatorio durante la fase di break in cui tali cellule hanno tempo e risorse per ripristinare il loro numero e le loro capacità. Questo *rebound* compensatorio appare superabile, invece, riducendo, con un regime metronomico, gli intervalli di somministrazione e intensificando, pertanto, l’esposizione delle cellule al farmaco (Fig. 16).

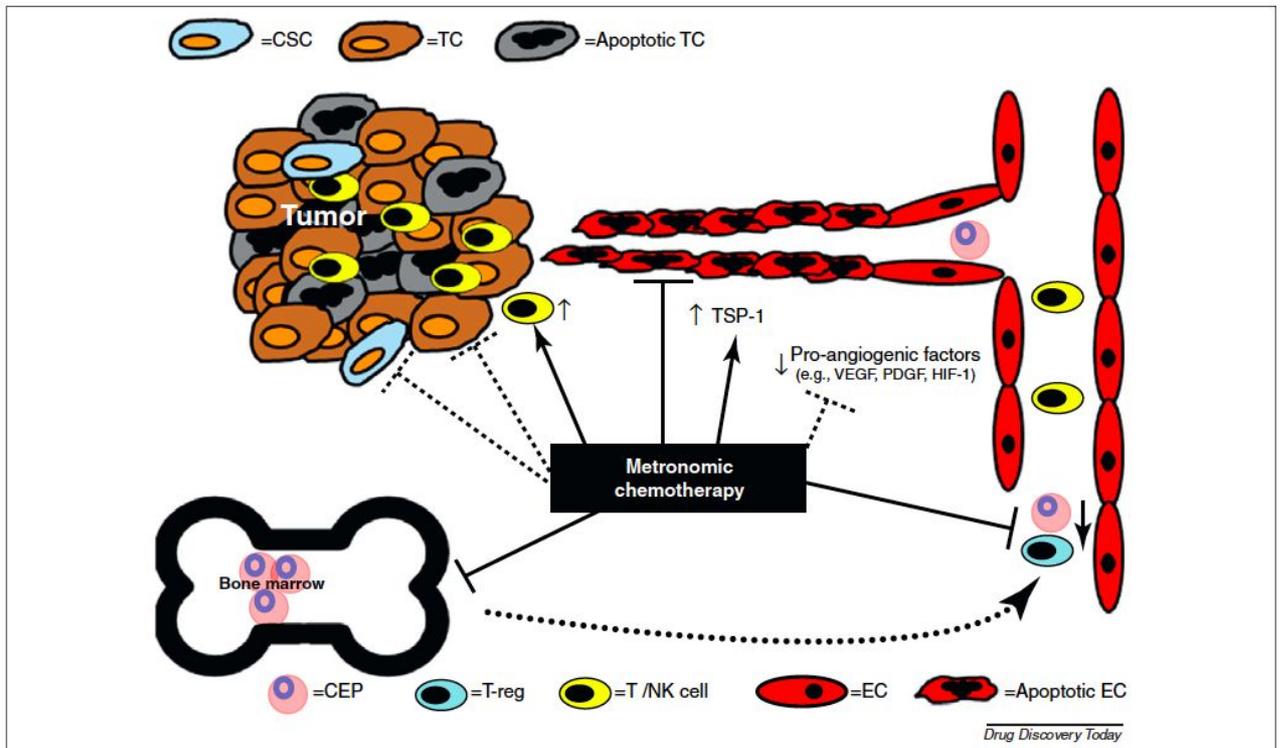


Fig. 16 Meccanismi d’azione della chemioterapia metronomica ⁷²

5. Modificazione della risposta immunitaria in senso anti-neoplastico: la chemioterapia metronomica aumenta l’immunogenicità del tumore (la maggior parte dei tumori sono poco immunogenici o non immunogenici) attraverso diversi meccanismi ⁷³:

- soppressione delle cellule T regolatorie (Treg) e attivazione delle cellule T citotossiche e NK
- inibizione delle cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC)
- aumento della funzione delle cellule dendritiche (DC)
- aumento dell’espressione degli antigeni associati al tumore e delle molecole presentanti l’antigene (APC)
- induzione dell’esposizione della calreticulina (CRT), proteina legante il calcio localizzata nel lume del reticolo endoplasmatico, nel nucleo e nel citoplasma. Essa è essenziale nel riconoscimento delle cellule tumorali da parte delle DC.
- Stimolo del rilascio di segnali di pericolo endogeni all’interno delle cellule tumorali,

come l'*high-mobility group box 1* (HMGB1) e l'adenosina trifosfato (ATP)

- Promozione dell'esposizione delle *heat shock proteins* (HSP). La loro espressione a livello della membrana è immunostimolatrice.
- Induzione dell'espressione del ligando per le cellule NK (Fig. 17) ⁷⁴

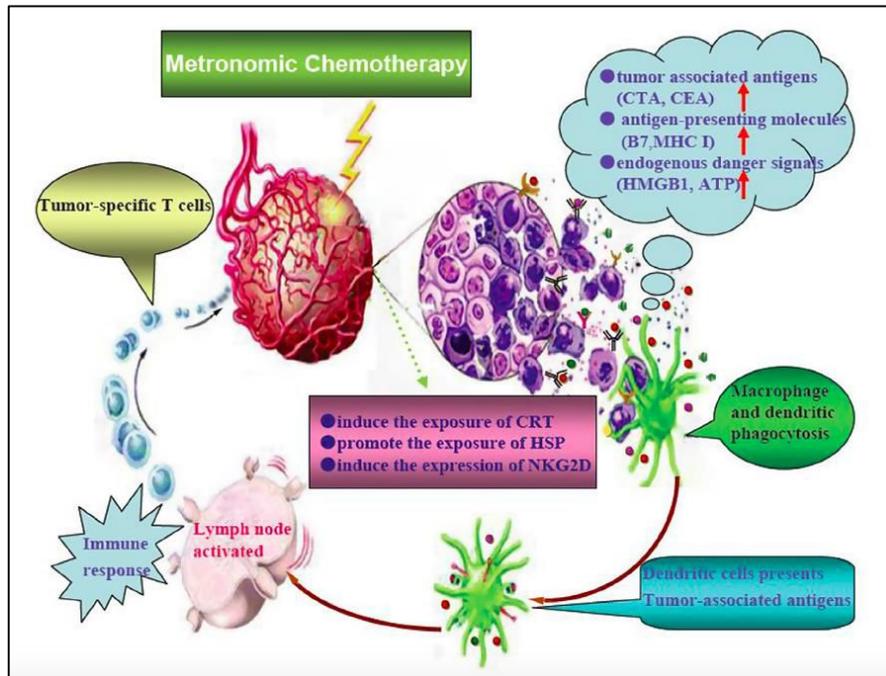


Fig. 17 Chemioterapia metronomica e immunoregolazione

I farmaci più utilizzati in senso metronomico sono:

Metronomic drugs.	
Metronomic drug	Number of regimens used (%) N = 107
Cyclophosphamide	46 (43.0)
Capecitabine	15 (14.0)
Etoposide	15 (14.0)
Vinorelbine	15 (14.0)
Methotrexate	12 (11.2)
Temozolomide	9 (8.4)
Tegafur and uracil (UFT)	6 (5.6)
Trofosamide	5 (4.7)
Procarbazine	3 (2.8)
5-Fluorouracil (5-FU)	2 (1.9)
Carboplatin	2 (1.9)
Irinotecan (CPT-11)	2 (1.9)
Docetaxel	2 (1.9)
Paclitaxel	2 (1.9)
Vinblastine	2 (1.9)
Carboplatin	1 (0.9)
Doxifluridine	1 (0.9)
Mitomycin C	1 (0.9)

Table 1 Immunoregulatory properties of metronomic chemotherapy.	
Mechanism	Chemotherapy drugs
Decrease Tregs number or function	5-FU, CTX, cisplatin, doxorubicin, fludarabine, gemcitabine, paclitaxel and temozolomide
Selectively inhibit MDSCs	5-FU, cisplatin, docetaxel, gemcitabine, paclitaxel
Induce DC maturation and enhance DC function	CTX, doxorubicin, docetaxel, deoxycytidine, etoposide, methotrexate, paclitaxel, mitomycin-C and vinblastine
Increase the expression of tumor associated antigens and antigen-presenting molecules	5-FU, cytarabine, decitabine, deoxycytidine, gemcitabine, melphalan, mitomycin and paclitaxel
Promote the expression of carcinoembryonic antigen and cancer-testis antigens	5-FU, decitabine, gemcitabine and deoxycytidine
Increase expression of cell surface B7-1 and B7-2	Cytarabine, melphalan and mitomycin
Promote the expression of MHC class I molecules	CTX, doxorubicin, gemcitabine, paclitaxel
Increase the expression of calreticulin	CTX, gemcitabine, doxorubicin, oxaliplatin, paclitaxel
Stimulate the release of HMGB1 and ATP	CTX, doxorubicin, gemcitabine, oxaliplatin
Increase release of uric acid	CTX, 5-FU
Promote the upregulation of FAS and TLR4	CTX, doxorubicin, etoposide
Induce the exposure of heat shock proteins	Anthracyclines
Induce the expression of NKG2D ligands	CTX, dacarbazine, cisplatin, doxorubicin

L'Etoposide inibisce il VEGF e il FGF2 (fibroblast growth factor 2), induce la maturazione delle cellule dendritiche e promuove la regolazione di TLR4 (toll like receptor 4).

CAPITOLO V

STATISTICA DELLO STUDIO E CONCLUSIONI

1. MATERIALI E METODI

Lo studio intrapreso ai fini della problematica affrontata nel presente lavoro ha considerato pazienti con neoplasia ginecologica trattate con Etoposide al fine di acquisire conoscenze sulle dinamiche evolutive della patologia in esame e di ipotizzare miglioramenti nelle strategie terapeutiche soprattutto nelle fasi più avanzate di malattia laddove sussistono esigui spazi di cura.

Sono state quindi esaminate le pertinenti cartelle cliniche della Divisione di Ginecologia Oncologica degli Spedali Civili di Brescia. Sono stati reperiti, in tal modo, 252 casi di pazienti con neoplasia a primitività ginecologica trattate con Etoposide, di cui 166 pazienti con tumore ovarico, 46 pazienti con tumore endometriale, 32 pazienti con tumore cervicale, 5 pazienti con tumore vulvare, 2 pazienti con tumore vaginale e una paziente con tumore sincrono ovarico ed endometriale.

Lo studio è riferito, circa il trattamento con Etoposide, a uno spazio temporale di 9 anni e 5 mesi, da gennaio 2007 a maggio 2016 (1942 numeri oncologici). I tassi di incidenza sono stati calcolati sulle pazienti in cura, mediante chemioterapia, presso la Divisione di Ginecologia Oncologica degli Spedali Civili di Brescia.

Tra gennaio 2007 e maggio 2016 sono state trattate presso l'ambulatorio di chemioterapia della Divisione di Ginecologia Oncologica degli Spedali Civili di Brescia 391 pazienti con tumore ovarico, 94 pazienti con tumore endometriale e 49 pazienti con tumore cervicale (in totale, 534 pazienti). Fra queste, 244 pazienti (45,7%) sono state trattate con Etoposide e vengono prese in considerazione ai fini di questo studio; in dettaglio, 166 donne (68%) presentavano una neoplasia primitiva ovarica, 46 donne (19%) una neoplasia primitiva endometriale e 32 donne (13%) una neoplasia primitiva cervicale.

La ricerca ha tenuto conto di numerosi parametri, fra cui l'età della paziente all'epoca della diagnosi del tumore primitivo, il tipo di tumore, l'istotipo, il grado e lo stadio della neoplasia ginecologica, la sensibilità al platino e il *disease free survival* (DFS).

Si sono inoltre considerati, ovviamente, molteplici dati concernenti il trattamento con Etoposide, fra i quali l'intervallo di tempo intercorso fra la diagnosi del tumore primitivo e quella

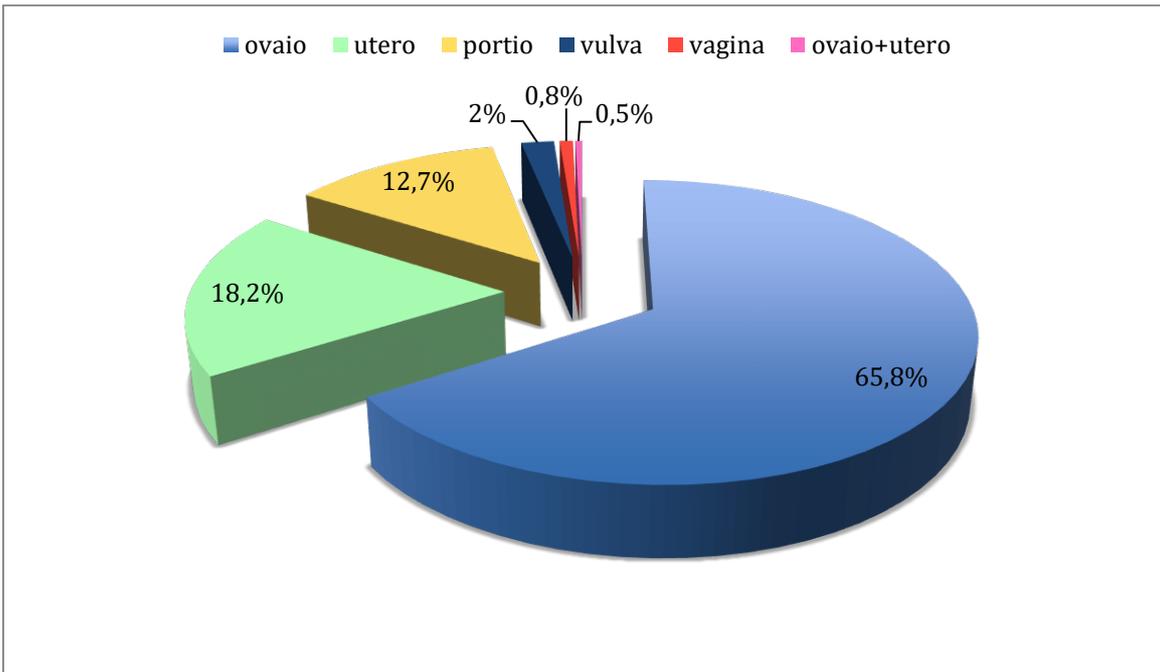
dell'inizio del farmaco, il numero totale di linee di chemioterapia eseguite, il numero di linee di chemioterapia precedenti l'Etoposide, l'utilizzo singolo o in associazione ad altri chemioterapici, il numero di cicli eseguiti, il valore del marcatore tumorale Ca125 all'inizio dell'assunzione del farmaco e dopo 6 mesi nelle pazienti con neoplasia ovarica e la tollerabilità individuale.

1.1 Metodi statistici utilizzati

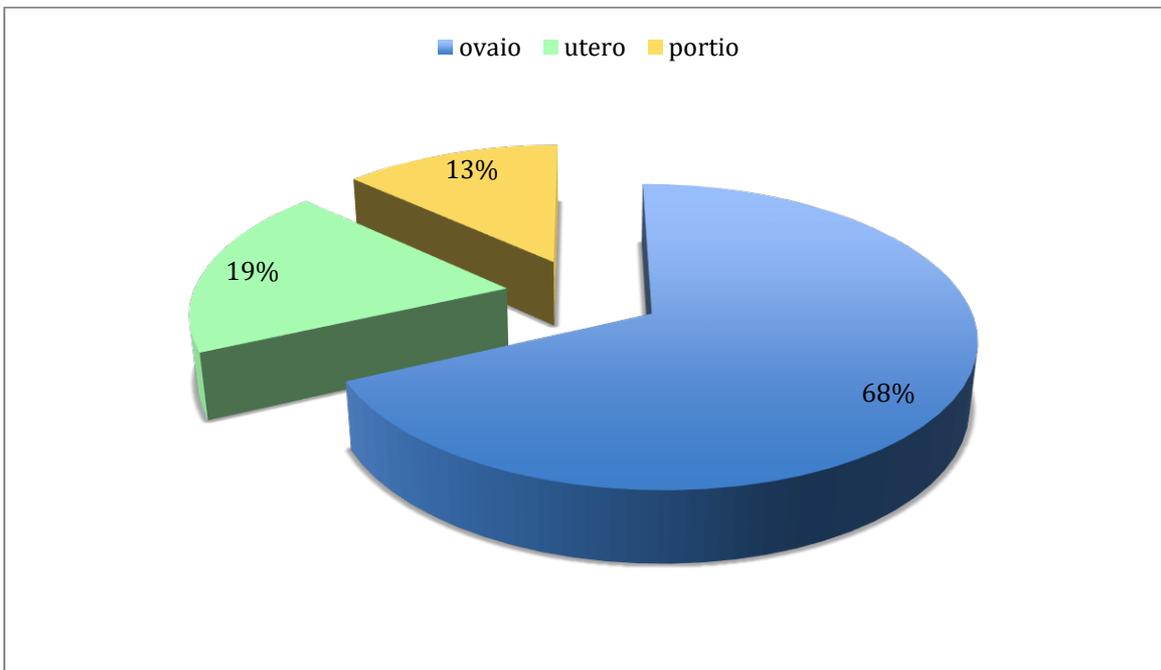
Le analisi statistiche di questo studio sono state eseguite con il programma SPSS 22.0 per Windows utilizzando metodi di regressione logistica. La comparazione tra due variabili continue è stata analizzata con il test non parametrico Mann Whitney; la comparazione tra più variabili continue con il test non parametrico Kruskal Wallis. L'influenza dei parametri prognostici sulla sopravvivenza è stata studiata sia con l'analisi univariata sia con quella multivariata. Le curve di sopravvivenza delle pazienti, calcolate fino alla data dell'exitus o dell'ultimo contatto, sono state eseguite con il metodo Kaplan-Meier e valutate con il test di Log-rank. L'analisi multivariata è stata eseguita con il metodo semi-parametrico di Cox. Le correlazioni sono state studiate con il Spearman Rho test. Il limite di significatività scelto è stato quello usuale del 5% ($p < 0,05$).

2. RISULTATI

Da gennaio 2007 a maggio 2016 sono state trattate con Etoposide presso l'ambulatorio di chemioterapia della Divisione di Ginecologia Oncologica degli Spedali Civili di Brescia 252 pazienti, di cui 166 pazienti (65,8%) con tumore ovarico, 46 pazienti (18,2%) con tumore endometriale, 32 pazienti (12,7%) con tumore cervicale, 5 pazienti (2%) con tumore vulvare, 2 pazienti (0,8%) con tumore vaginale e una paziente (0,5%) con tumore sincrono ovarico ed endometriale.



In considerazione dello scarso numero di pazienti con neoplasia vulvare, vaginale e sincrona ovarica ed endometriale sono state prese in considerazione ai fini dello studio solo le pazienti con neoplasia ovarica (166 pazienti, 68%), endometriale (46 pazienti, 19%) e cervicale (32 pazienti, 13%), per un totale di 244 pazienti.



La sopravvivenza mediana è stata di 34 mesi (Q1=21; Q3=52,75).

2.1 Età alla diagnosi del tumore primitivo

	Nr. pazienti	ETÀ		
		Percentile 25	Mediana	Percentile 75
Ovaio	166	52	62	70
Portio	32	50	53	65
Utero	46	59	63	69

Il Kruskal Wallis test (test non parametrico per la valutazione di più variabili indipendenti) mostra significative differenze in età mediana tra i 3 diversi gruppi ($p=0,020$). L'età mediana alla diagnosi del tumore primitivo ginecologico risulta di 62 anni (range 52-69 anni); se invece viene considerata solo la neoplasia ovarica risulta di 62 anni ($Q1=52$; $Q3=70$), se solo quella cervicale di 53 anni ($Q1=50$; $Q3=65$), se solo quella endometriale di 63 anni ($Q1=59$; $Q3=69$).

Il Mann Whitney test mostra significative differenze in età mediana tra pazienti con neoplasia ovarica e pazienti con neoplasia cervicale ($p=0,015$) e tra pazienti con neoplasia cervicale e pazienti con neoplasia endometriale ($p=0,004$). Non ci sono invece significative differenze in età mediana tra pazienti con neoplasia ovarica e pazienti con neoplasia endometriale ($p=0,54$).

2.2 Istologia del tumore primitivo

	Istologia	Nr. pazienti	Percentuale %
Ovaio	sieroso	155	93,4
	endometriode	10	6
	cellule chiare	1	0,6
Portio	squamoso	28	87,5
	sieroso	2	6,3
	endometriode	1	3,1
	cellule chiare	1	3,1
Utero	endometriode	37	80,5
	sarcoma	5	10,8
	squamoso	3	6,5
	sieroso	1	2,2

Per quanto riguarda l'istologia del tumore iniziale, il 93,4% delle pazienti presentava un tumore ovarico sieroso papillifero, il 6% un tumore ovarico endometriode e lo 0,6% un tumore ovarico a cellule chiare. L'87,5% delle pazienti presentava un tumore squamoso della portio, il 6,3% un tumore sieroso della portio, il 3,1% un tumore endometriode della portio e il 3,1% un tumore della portio a cellule chiare. L'80,5% delle pazienti presentava un tumore dell'utero endometriode, il 10,8% un sarcoma dell'utero, il 6,5% un tumore squamoso dell'utero e il 2,2% un tumore sieroso dell'utero.

2.3 Stadio alla presentazione

	Nr. pazienti	STADIO		
		Percentile 25	Mediana	Percentile 75
Ovaio	166	3,00	3,03	3,00
Portio	32	2,00	2,71	3,00
Utero	46	2,00	2,69	3,00

Se valutiamo le differenze in stadio le pazienti con neoplasia endometriale presentavano uno stadio alla diagnosi di tumore primitivo significativamente minore delle pazienti con neoplasia ovarica ($p=0,001$), ma non delle pazienti con neoplasia cervicale (Mann Whitney test).

2.4 Grado di differenziazione

	Grado	Nr. pazienti	Percentuale %
Ovaio	G1	1	0,6
	G2	20	12
	G3	145	87,4
Portio	G1	0	0
	G2	10	31,2
	G3	22	68,8
Utero	G1	2	4,3
	G2	11	23,9
	G3	33	71,8

Per la maggior parte dei casi si trattava di tumori scarsamente differenziati. I tumori relativi alle donne affette da neoplasia ovarica apparivano per l'87,4% scarsamente differenziati, per il 12% moderatamente differenziati e per lo 0,6% ben differenziati. I tumori relativi alle donne affette da neoplasia della portio apparivano per il 68,8% scarsamente differenziati e per il 31,2% moderatamente differenziati. I tumori relativi alle donne affette da neoplasia dell'utero apparivano per il 71,8% scarsamente differenziati, per il 23,9% moderatamente differenziati e per il 4,3% ben differenziati.

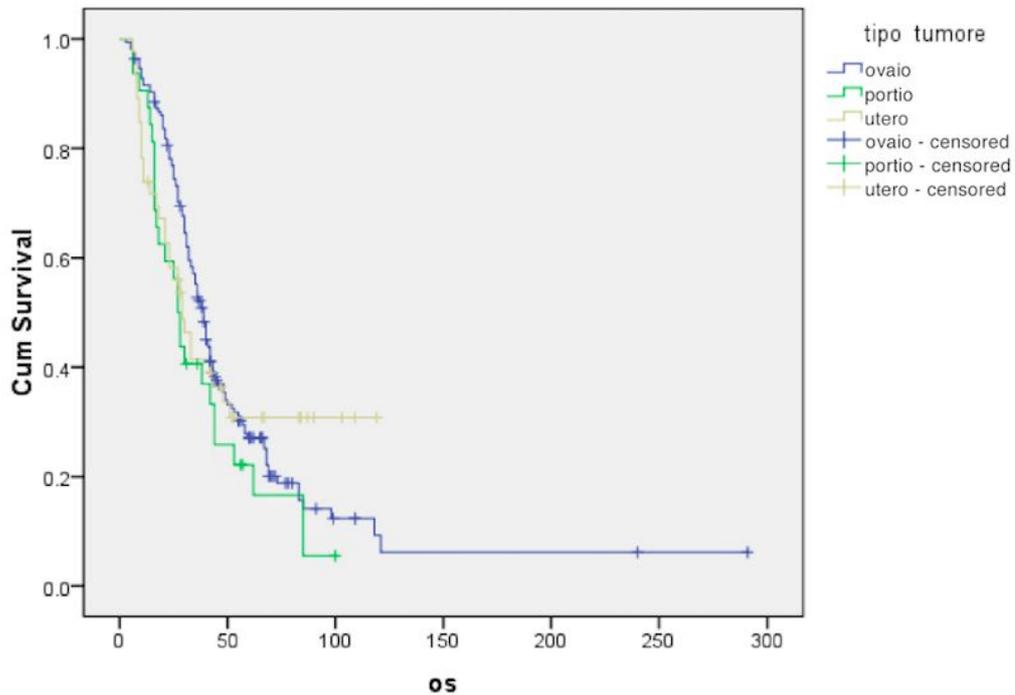
2.5 OS (*overall survival*)

	Nr. pazienti	OS		
		Percentile 25	Mediana	Percentile 75
Ovaio	166	25	37	55
Portio	32	16	28	44
Utero	46	11	28	51

L'OS (*overall survival*), calcolata con il *log rank test*, non è statisticamente differente nei 3 diversi gruppi ($p=0,253$).

Una serie di bias non permette di verificare l'effettivo impatto dell'OS perché l'utilizzo dell'Etoposide viene riservato a pazienti in avanzata fase di malattia, ma in condizioni cliniche ancora discrete con l'intento di contenerne l'evoluzione a fronte di scarsi effetti collaterali. Vero è che si tratta di sopravvivenze effettivamente di lunga durata.

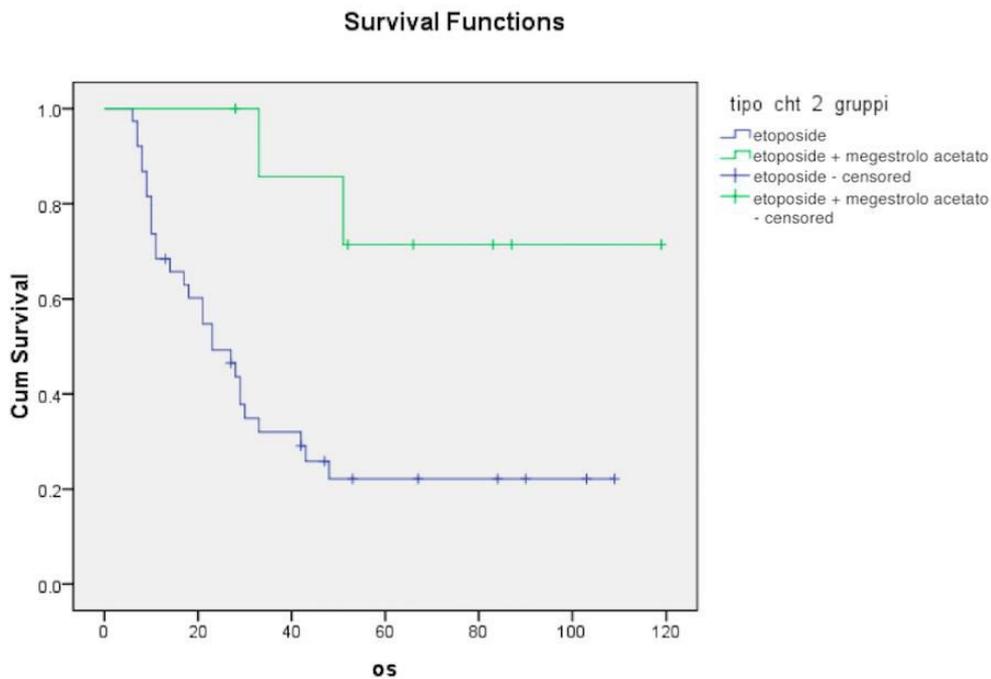
Survival Functions



2.6 Etoposide vs Etoposide + Megestil

Tutte le pazienti sono state trattate con Etoposide o con Etoposide associato a Megestil. In questi due gruppi non troviamo differenze per quanto riguarda l'età e lo stadio; non troviamo differenze nemmeno se selezioniamo solo le pazienti con neoplasia ovarica o solo le pazienti con neoplasia cervicale. Se prendiamo in considerazione, invece, solo le pazienti con neoplasia endometriale troviamo una differenza statisticamente significativa nell'OS (*overall survival*); le pazienti trattate solo con Etoposide avevano un'OS minore rispetto alle pazienti trattate con Etoposide associato a Megestil ($p=0,002$). Conferma del log rank test ($p=0,008$) e COX regression ($HR=0,125$ $Q1=0,028$; $Q3=0,554$ $p=0,006$). Ciò è sicuramente dovuto alla presenza dei

recettori per gli estrogeni nel tumore dell'utero (80,5% con istotipo endometriode).



Analisi multivariata: COX regression Etoposide vs Etoposide + Megestil nel K endometrio

	HR	95.0% CI for Exp(B)		p
		Lower	Upper	
E vs E+M	0,125	0,028	0,554	0,006
stadio_	2,574	1,164	5,692	0,020
età	1,013	0,952	1,078	0,684
grado	1,053	0,444	2,496	0,906

2.7 Linee terapeutiche

Nelle pazienti con neoplasia ovarica l'Etoposide era in media la quarta linea terapeutica, nelle pazienti con neoplasia endometriale e cervicale era in media la terza linea terapeutica.

In dettaglio possiamo affermare che tra le pazienti con neoplasia ovarica e cervicale troviamo una differenza statisticamente significativa ($p < 0,000$); ciò significa che le pazienti con neoplasia cervicale assumevano l'Etoposide più precocemente delle pazienti con neoplasia ovarica.

Troviamo una differenza statisticamente significativa ($p < 0,000$) anche tra le pazienti con neoplasia ovarica e le pazienti con neoplasia endometriale; ciò significa che le pazienti con neoplasia endometriale assumevano l'Etoposide più precocemente delle pazienti con neoplasia ovarica. Dal punto di vista clinico possiamo infatti affermare che le pazienti con neoplasia endometriale e le pazienti con neoplasia cervicale che assumevano Etoposide erano quelle con tumore primitivo in stadio più avanzato e in condizioni generali peggiori.

Non troviamo, invece, nessuna differenza tra le pazienti con neoplasia endometriale e le pazienti con neoplasia cervicale.

		linee cht tot				linee cht pre eto			linee post eto			numero linea eto
		nr. pazienti	Percentile 25	Mediana	Percentile 75	Percentile 25	Mediana	Percentile 75	Percentile 25	Mediana	Percentile 75	Mediana
tipo tumore	ovaio	166	4	5	6	2	3	3	1	2	2	4
	portio	32	3	3	4	1	2	2	1	2	2	3
	utero	46	3	3	5	1	2	2	1	1	2	3

Queste differenze ci sono nonostante poi non ci sia alcuna differenza in termini di *overall survival* nei tre diversi gruppi. Ciò significa che le pazienti con neoplasia ovarica hanno una sopravvivenza complessiva simile alle pazienti con neoplasia endometriale e cervicale, ma, nello stesso tempo, sono sottoposte a molte più linee chemioterapiche ($p < 0,0001$) (Kruskal wallis).

Le pazienti con neoplasia ovarica sono sottoposte a molte più linee terapeutiche prima dell'Etoposide ($p < 0,0001$). Nei tre gruppi le terapie che si fanno dopo l'Etoposide risultano identiche cioè non statisticamente differenti ($p = 0,457$).

Possibile meccanismo dell'eto è quello di entrare nel mecc di letalità sintetica contestuale.

DOMANDA: Che rapporto c'è con la platino sensibilità soprattutto riferito a O e P?

Letalità contestuale: pz mutate (qsto non si può dire perche usato alla fine)

Cmq blocca il ricombinante omologo!!!!!!! Paola1

2.8 Intervallo di tempo tra la diagnosi e l'inizio dell'Etoposide

		Tempo diagnosi- inizio Etoposide		
	Nr. pazienti	Percentile 25	Mediana	Percentile 75
Ovaio	166	16	26	36
Portio	32	8	20	33
Utero	46	7	18	30

La mediana del tempo tra la diagnosi del tumore primitivo e l'inizio dell'Etoposide era per le pazienti con neoplasia ovarica di 26 mesi, per le pazienti con neoplasia cervicale di 20 mesi e per le pazienti con neoplasia uterina di 18 mesi.

Dal punto di vista statistico il tempo libero da Etoposide non è maggiore nelle pazienti con neoplasia ovarica rispetto alle pazienti con neoplasia cervicale ($p=0,096$); è tuttavia maggiore nelle pazienti con neoplasia ovarica rispetto alle pazienti con neoplasia uterina ($p=0,010$).

Ciò significa che l'Etoposide si inizia nello stesso momento nelle pazienti con neoplasia ovarica e nelle pazienti con neoplasia cervicale. Si inizia invece sensibilmente dopo nelle pazienti con neoplasia ovarica rispetto alle pazienti con neoplasia uterina.

2.9 Tollerabilità individuale all'Etoposide

		TOLLERABILITA'			
		NO		SI	
		Nr. pazienti	%	Nr. pazienti	%
tipo_tumore	Ovaio	0	0%	166	100.0%
	Utero	1	2.2%	45	97.8%
	Portio	1	3.1%	31	96.9%

Il tasso di tolleranza all'Etoposide nelle pazienti con neoplasia ovarica è del 100%, nelle pazienti con neoplasia endometriale del 97,8% e nelle pazienti con neoplasia cervicale del 96,9%.

La paziente con neoplasia dell'endometrio ha avuto diagnosi di tumore primitivo nell'agosto del 2006 all'età di 60 anni, ha eseguito 3 linee di chemioterapia di cui la seconda con Etoposide (72 mesi in totale, da luglio 2007 a luglio 2013). Il farmaco è stato interrotto dopo 72 mesi per la comparsa di leucemia mieloide acuta post chemio-radioterapia. Ha iniziato poi un trattamento chemioterapico secondo schema ICE con raggiungimento di remissione citogenetica e molecolare, ha poi proseguito con Citarabina e successivo autotrapianto di cellule staminali. Ha eseguito poi terza linea terapeutica con Acido Zoledronico fino a luglio 2014. La paziente è attualmente viva in buone condizioni generali.

La paziente con neoplasia della portio ha avuto diagnosi di tumore primitivo nel dicembre del 2010 all'età di 32 anni, ha eseguito 3 linee di chemioterapia di cui l'ultima con Etoposide (38 mesi in totale, da agosto 2011 ad ottobre 2014). Il farmaco è stato interrotto dopo 38 cicli per la

comparsa di leucemia mieloide acuta. Ha iniziato poi.....La paziente è attualmente viva in buone condizioni generali.

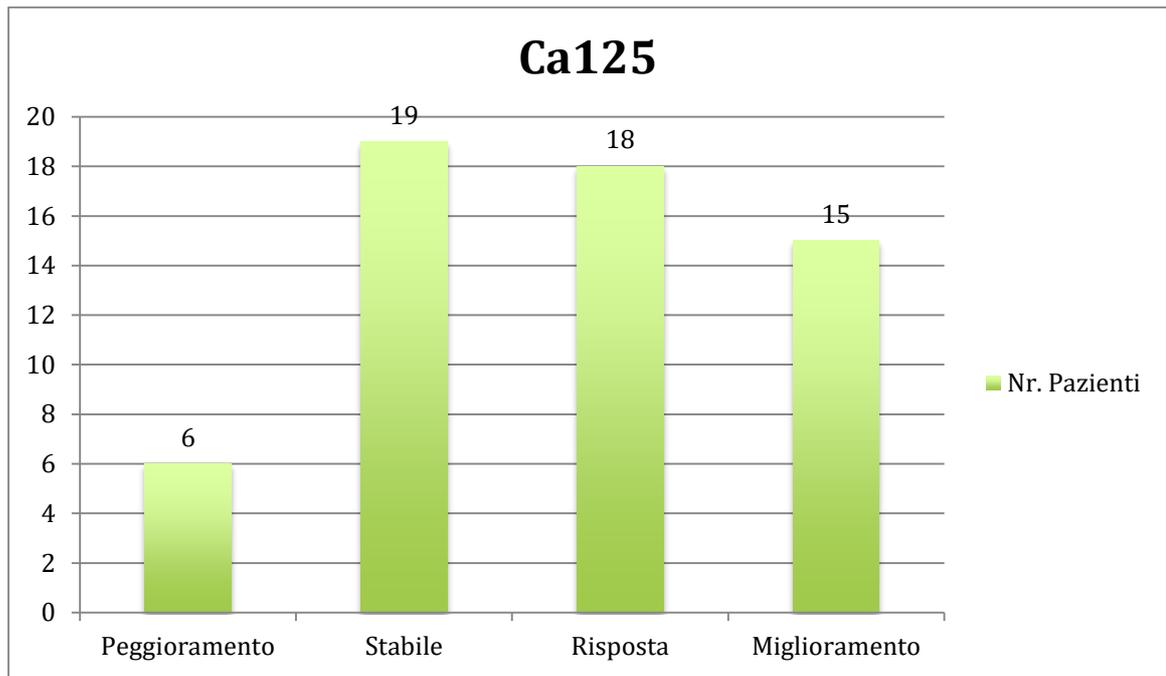
2.10 Ca125 nelle pazienti con neoplasia ovarica

Risposta	Nr. pazienti	%
Peggioramento	6	10,3
Stabile	19	32,8
Risposta	18	31
Miglioramento	15	25,9

Nelle pazienti con neoplasia ovarica è stato anche valutato il valore del marcatore tumorale Ca125 al momento dell'inizio della terapia con Etoposide e dopo 6 cicli. Su 166 pazienti con neoplasia ovarica 58 erano state sottoposte ad almeno 6 cicli di Etoposide.

La risposta all'Etoposide è stata così valutata dopo 6 cicli:

- Peggioramento: se il Ca125 aumentava di più del 30% del suo valore al momento dell'inizio con Etoposide
- Stabile: se il Ca125 aumentava di meno del 30% o diminuiva di meno del 30% del suo valore al momento dell'inizio con Etoposide
- Risposta: se il Ca125 diminuiva per un valore superiore al 30% ed inferiore al 70% del suo valore al momento dell'inizio con Etoposide
- Miglioramento: se il Ca125 diminuiva per un valore superiore al 70% del suo valore al momento dell'inizio con Etoposide



Su 58 pazienti con neoplasia ovarica che erano state sottoposte ad almeno 6 cicli di chemioterapia con Etoposide 6 (10,3%) erano peggiorate, 19 stabili (32,8%), 18 (31%) avevano avuto una risposta e 15 (25,9%) erano migliorate.

Partendo dal presupposto che la chemioterapia con Etoposide viene eseguita nelle fasi avanzate dei tumori ginecologici dove sussistono esigui spazi di cura e dove l'intento è quello di cronicizzare il più possibile la malattia a fronte di una buona qualità di vita possiamo considerare come positiva una risposta stabile, una risposta propriamente detta e una risposta in miglioramento. Troviamo quindi 52 pazienti su 58 con una risposta positiva all'Etoposide dopo 6 cicli di terapia.

2.11 DFS (*disease free survival*)

Il DFS nei tre tipi di tumore non differiva significativamente nei tre gruppi (kruskal wallis e log-rank test). Mediana DFS 12 mesi.

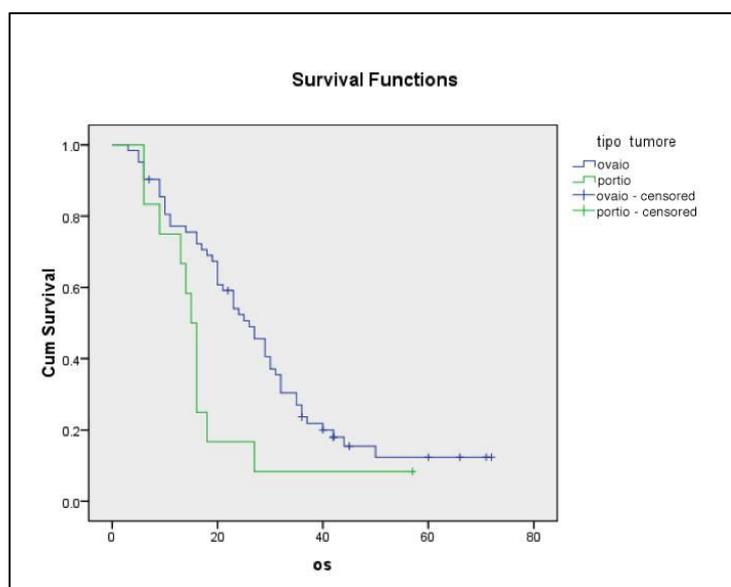
		DFS		
		Percentile 25	Mediana	Percentile 75
tipo tumore	ovaio	9	12	16
	portio	7	13	20
	utero	6	11	16

2.12 Sensibilità al platino

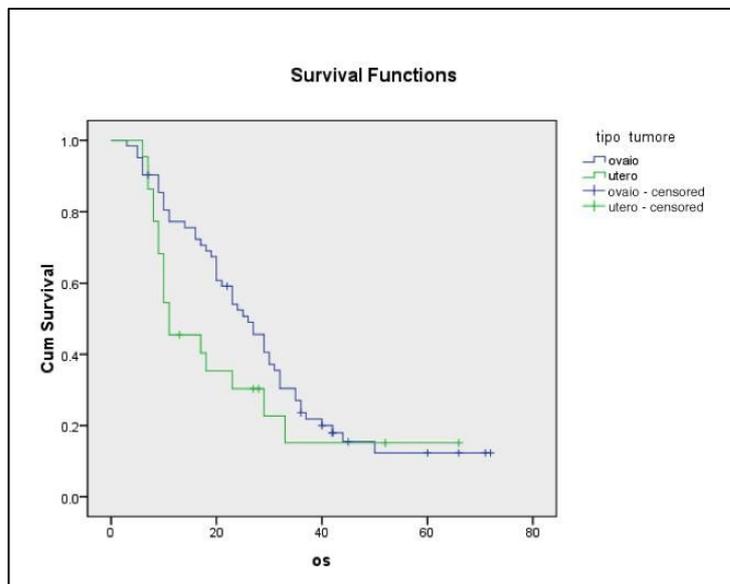
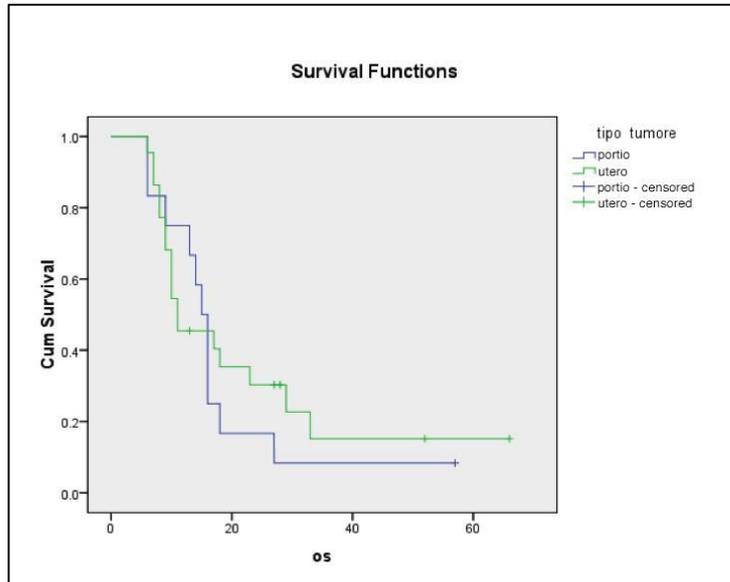
Le pazienti platino sensibili avevano, nella maggior parte dei casi, un intervallo di tempo maggiore tra la diagnosi del tumore primitivo e l'inizio del trattamento con Etoposide rispetto alle pazienti platino resistenti o refrattarie (mediana neoplasia ovarica 33 mesi, neoplasia cervicale e neoplasia endometriale 30 mesi).

				numero linea eto		t diagnosi e inizio eto		
				nr. pazienti	Mediana	Percentile 25	Mediana	Percentile 75
tipo tumore	ovaio	plat sensibilità	sensibile	104	4	25	33	41
			resistente	47	3	10	14	22
			refrattario	15	2	4	5	17
	portio	plat sensibilità	sensibile	20	3	24	30	44
			resistente	5	2	9	10	12
			refrattario	7	3	4	5	7
	utero	plat sensibilità	sensibile	24	3	22	30	50
			resistente	14	3	7	9	13
			refrattario	8	2	5	5	6

Se selezioniamo solo le pazienti platino resistenti e le pazienti platino refrattarie possiamo notare che le pazienti con neoplasia ovarica vivono di più rispetto alle pazienti con neoplasia cervicale ($p=0,026$).



Non ci sono, tuttavia, differenze statisticamente significative, se confrontiamo le pazienti con neoplasia cervicale e neoplasia endometriale ($P=0,616$) e le pazienti con neoplasia ovarica e neoplasia endometriale ($p=0,146$).



Cicli Etoposide in relazione a platino sensibilità:

		num cicli eto gruppi									
		1-3 mesi		4-6 mesi		7-12 mesi		13-24 mesi		> 24 mesi	
		nr. pazienti	Row N %	nr. pazienti	Row N %	nr. pazienti	Row N %	nr. pazienti	Row N %	nr. pazienti	Row N %
plat sens	sensibile	60	40.5%	31	20.9%	30	20.3%	20	13.5%	7	4.7%
	resistente	34	51.5%	11	16.7%	17	25.8%	3	4.5%	1	1.5%
	refrattario	17	56.7%	8	26.7%	3	10.0%	0	.0%	2	6.7%

		VAR00001					
		1-6 mesi		7-12 mesi		>12	
		nr. pazienti	Row N %	nr. pazienti	Row N %	nr. pazienti	Row N %
plat sens	sensibile	101	68.2%	20	13.5%	27	18.2%
	resistente	50	75.8%	12	18.2%	4	6.1%
	refrattario	26	86.7%	2	6.7%	2	6.7%

Pearson Chi-Square Tests

		VAR00001
plat_sens	Chi-square	9.505
	df	4
	Sig.	.050 ^a

Dividendo i cicli di Etoposide in 3 gruppi (1-6; 7-12; >12) si rileva una differenza statisticamente significativa (chi quadro) nelle percentuali. Ciò significa che le pazienti che beneficiano di Etoposide a lungo termine (> 12 mesi) sono le platino sensibili ($p=0,05$). Questo può essere spiegato dal fatto che le platino sensibili hanno comunque dei meccanismi che rimangono sensibili ad altri farmaci.

Semplificando la classificazione in due gruppi (platino sensibili e platino resistenti-refrattarie) il risultato è sovrapponibile, ma il chi quadro è ancora più significativo ($p=0,007$).

		VAR00002			
		1-12 mesi		>12	
		Count	Row N %	Count	Row N %
plat_sens_2_gruppi	sensibile	121	81.8%	27	18.2%
	resistente&refrattario	90	93.8%	6	6.3%

Pearson Chi-Square Tests

		VAR00002
plat_sens_2_gruppi	Chi-square	7.161
	df	1
	Sig.	.007

Oppure

		VAR00003			
		1-6 mesi		>6	
		Count	Row N %	Count	Row N %
plat_sens_2_gruppi	sensibile	101	68.2%	47	31.8%
	resistente&refrattario	76	79.2%	20	20.8%

Pearson Chi-Square Tests

		VAR00003
plat_sens_2_gruppi	Chi-square	3.488
	df	1
	Sig.	.062

In questo caso il beneficio di terapie piú lunghe di 6 mesi non è statisticamente significativo per le platino sensibili.

Durata in mesi di Etoposide in relazione alla platino sensibilità: neoplasia ovarica

		num_cicli_eto_gruppi									
		1-3 mesi		4-6 mesi		7-12 mesi		13-24 mesi		> 24 mesi	
		Count	Row N %	Count	Row N %	Count	Row N %	Count	Row N %	Count	Row N %
plat_sens	sensibile	44	42.3%	27	26.0%	13	12.5%	18	17.3%	2	1.9%
	resist	21	44.7%	12	25.5%	11	23.4%	3	6.4%	0	.0%
	refratt	10	66.7%	4	26.7%	0	.0%	0	.0%	1	6.7%

		VAR00001					
		1-6 mesi		7-12 mesi		>12	
		Count	Row N %	Count	Row N %	Count	Row N %
plat_sens	sensibile	71	68.3%	13	12.5%	20	19.2%
	resist	33	70.2%	11	23.4%	3	6.4%
	refratt	14	93.3%	0	.0%	1	6.7%

Pearson Chi-Square Tests

		VAR00001
plat_sens	Chi-square	10.600
	df	4
	Sig.	.031 ^a

Vantaggio delle pazienti platino sensibili trattate con più di 12 cicli di Etoposide (p=0,031).

		VAR00002			
		1-12 mesi		>12	
		Count	Row N %	Count	Row N %
plat_sens_2_gruppi	sensibile	84	80.8%	20	19.2%
	resistente&refrattario	58	93.5%	4	6.5%

Pearson Chi-Square Tests

		VAR00002
plat_sens_2_gruppi	Chi-square	5.129
	df	1
	Sig.	.024 ^a

Semplificando la classificazione in due gruppi (platino sensibili e platino resistenti-refrattarie) il risultato è sovrapponibile, ma il chi quadro è ancora più significativo (p=0,024).

		VAR00003			
		1-6 mesi		>6	
		Count	Row N %	Count	Row N %
plat_sens_2_gruppi	sensibile	71	68.3%	33	31.7%
	resistente&refrattario	47	75.8%	15	24.2%

Pearson Chi-Square Tests

		VAR00003
plat_sens_2_gruppi	Chi-square	1.074
	df	1
	Sig.	.300

Con quest'ultima analisi si conferma che il vantaggio delle platino sensibili è per un trattamento per più di 12 cicli e non per più di 6 cicli (p=0,3).

Cicli Etoposide in relazione alla platino sensibilità: neoplasia endometriale

		num_cicli_eto_gruppi									
		1-3 mesi		4-6 mesi		7-12 mesi		13-24 mesi		> 24 mesi	
		Count	Row N %	Count	Row N %	Count	Row N %	Count	Row N %	Count	Row N %
plat_sens	sensibile	10	41.7%	4	16.7%	5	20.8%	1	4.2%	4	16.7%
	resist	8	57.1%	4	28.6%	1	7.1%	0	.0%	1	7.1%
	refratt	4	50.0%	2	25.0%	2	25.0%	0	.0%	0	.0%

		VAR00001					
		1-6 mesi		7-12 mesi		>12	
		Count	Row N %	Count	Row N %	Count	Row N %
plat_sens	sensibile	14	58.3%	5	20.8%	5	20.8%
	resist	12	85.7%	1	7.1%	1	7.1%
	refratt	6	75.0%	2	25.0%	0	.0%

Pearson Chi-Square Tests

		VAR00001
plat_sens	Chi-square	4.803
	df	4
	Sig.	.308 ^a

		VAR00002			
		1-12 mesi		>12	
		Count	Row N %	Count	Row N %
plat_sens_2_gruppi	sensibile	19	79.2%	5	20.8%
	resistente&refrattario	21	95.5%	1	4.5%

Pearson Chi-Square Tests

		VAR00002
plat_sens_2_gruppi	Chi-square	2.685
	df	1
	Sig.	.101 ^a

		VAR00003			
		1-6 mesi		>6	
		Count	Row N %	Count	Row N %
plat_sens_2_gruppi	sensibile	14	58.3%	10	41.7%
	resistente&refrattario	18	81.8%	4	18.2%

Pearson Chi-Square Tests

		VAR00003
plat_sens_2_gruppi	Chi-square	2.990
	df	1
	Sig.	.084

Nelle pazienti con neoplasia endometriale non c'è nessun vantaggio statisticamente significativo per trattamenti con Etoposide maggiori a 6 o 12 mesi in caso di platino sensibilità.

Cicli Etoposide in relazione alla platino sensibilità: neoplasia cervicale

		num_cicli_eto_gruppi									
		1-3 mesi		4-6 mesi		7-12 mesi		13-24 mesi		> 24 mesi	
		Count	Row N %	Count	Row N %	Count	Row N %	Count	Row N %	Count	Row N %
plat_sens	sensibile	6	30.0%	10	50.0%	2	10.0%	1	5.0%	1	5.0%
	resist	5	100.0%	0	.0%	0	.0%	0	.0%	0	.0%
	refratt	3	42.9%	3	42.9%	0	.0%	0	.0%	1	14.3%

		VAR00001					
		1-6 mesi		7-12 mesi		>12	
		Count	Row N %	Count	Row N %	Count	Row N %
plat_sens	sensibile	16	80.0%	2	10.0%	2	10.0%
	resist	5	100.0%	0	.0%	0	.0%
	refratt	6	85.7%	0	.0%	1	14.3%

Pearson Chi-Square Tests

		VAR00001
plat_sens	Chi-square	2.049
	df	4
	Sig.	.727 ^{a,b}

		VAR00002			
		1-12 mesi		>12	
		Count	Row N %	Count	Row N %
plat_sens_2_gruppi	sensibile	18	90.0%	2	10.0%
	resistente&refrattario	11	91.7%	1	8.3%

Pearson Chi-Square Tests

		VAR00002
plat_sens_2_gruppi	Chi-square	.025
	df	1
	Sig.	.876 ^a

		VAR00003			
		1-6 mesi		>6	
		Count	Row N %	Count	Row N %
plat_sens_2_gruppi	sensibile	16	80.0%	4	20.0%
	resistente&refrattario	11	91.7%	1	8.3%

Pearson Chi-Square Tests

		VAR00003
plat_sens_2_gruppi	Chi-square	.774
	df	1
	Sig.	.379 ^a

Anche nelle pazienti con neoplasia cervicale non c'è nessun vantaggio statisticamente significativo per trattamenti con Etoposide maggiori a 6 o 12 mesi in caso di platino sensibilità.

3. CONCLUSIONI

Sempre più spesso, negli ultimi anni, il cancro si è trasformato in una “condizione cronica” con cui convivere, sottoponendosi a regolari controlli e a multiple linee di chemioterapia.

A simile esito hanno contribuito diversi fattori, fra cui l'aumento della sopravvivenza ottenuto grazie a migliori regimi terapeutici comprendenti chirurgie citoreducenti più aggressive e chemioterapie sistemiche, oltre che, ovviamente, una maggiore disponibilità delle tecniche d'*imaging*, le quali hanno reso possibili diagnosi più sensibili e precoci delle eventuali recidive di malattia. Può ritenersi, del resto, che solo pochi decenni orsono la comparsa e, *a fortiori*, la diagnosi precoce di alcune recidive non fosse addirittura possibile poiché l'intervallo tra il riscontro della patologia primitiva e l'exitus era alquanto ridotto.

L'obiettivo dell'oncologo medico, nelle fasi avanzate di malattia laddove non esistono protocolli terapeutici codificati e l'obiettivo non è più la guarigione del paziente ma la cronicizzazione della malattia a fronte di una buona qualità di vita, è quello di cercare di scegliere per ogni paziente il farmaco migliore da utilizzare, la dose ottimale, l'intervallo di tempo tra una somministrazione e l'altra e l'eventuale associazione con altri farmaci.

L'Etoposide è un chemioterapico che da anni viene ampiamente utilizzato nelle fasi avanzate dei tumori ginecologici laddove sussistono esigui spazi di cura. Somministrato a regime metronomico ha grandi vantaggi come il basso costo, la bassa tossicità e la possibilità di essere assunto per via orale dalle stesse pazienti, senza bisogno di accessi venosi o lunghe infusioni. Consente spesso un controllo a lungo termine della malattia che si traduce sia in una stabilità neoplastica che in una condizione di miglioramento clinico e strumentale.

Il dato che emerge da questo studio è che, pur trattandosi di pazienti prognosticamente sfavorevoli (nella maggior parte dei casi si trattava di tumori scarsamente differenziati, con stadio alla presentazione III e IV, mediana DFS 12 mesi, intervallo di tempo tra diagnosi del tumore primitivo e inizio del trattamento con Etoposide 22 mesi), la sopravvivenza dall'inizio del trattamento con Etoposide era molto buona (34 mesi) e accompagnata da una discreta qualità di vita.

Nelle pazienti con neoplasia ovarica e cervicale l'Etoposide è stato usato con buoni risultati da solo, non associato ad altri farmaci. Le pazienti con neoplasia endometriale trattate con Etoposide associato a Megestrol acetato avevano un'OS migliore rispetto alle pazienti trattate solo con Etoposide.

Valutando il valore del marcatore tumorale Ca125 al momento dell'inizio della terapia con Etoposide e dopo 6 cicli nelle pazienti con neoplasia ovarica che fossero state sottoposte ad almeno 6 cicli di chemioterapia, 52 su 58 pazienti presentavano una risposta positiva a tale farmaco che si traduceva in un quadro di stabilità, di minima risposta o addirittura di miglioramento.

Le pazienti che beneficiavano di Etoposide per lungo periodo (> 12 mesi) erano quelle con neoplasia ovarica platino sensibili, questo probabilmente perché le platino sensibili hanno comunque dei meccanismi che permettono di mantenere la sensibilità ad altri farmaci.

Rispetto agli altri farmaci utilizzati nelle fasi avanzate di malattia, l'Etoposide sembra quindi dare le stesse risposte ma con effetti collaterali molto minori.

L'Etoposide sembra inibire la crescita neoplastica attraverso un effetto citotossico nei confronti delle cellule tumorali, un effetto citotossico nei confronti delle cellule endoteliali (squilibrio tra fattori proangiogenici e antiangiogenici a vantaggio di questi ultimi) e modificando la risposta immunitaria in senso antineoplastico.

In tale materia sarebbe necessario svolgere una classica sperimentazione con randomizzazione a 2 bracci nella quale il primo braccio assume il farmaco (Etoposide) e l'altro braccio svolge la terapia antitumorale tradizionale. Ciò in quanto esiste già un'esperienza consolidata di alta probabilità di efficacia (in termini di controllo di malattia) dell'utilizzo di tale farmaco e al fine di verificarne la reale utilità senza i bias dello studio retrospettivo.

Questa è la ragione per cui le conclusioni scientifiche sull'efficacia al ricorso all'Etoposide, *rebus sic stantibus*, seppur validate nel nostro studio dalla clinica, non possono che essere raggiunte attraverso un raffronto con i dati storici.

Ciò che si rende possibile è un confronto con la storia clinica di malate che non sono state sottoposte a Etoposide peraltro nella consapevolezza che una simile scelta ha sempre avuto motivazioni particolari, che inquinano la possibilità di una valutazione depurata dall'incidenza di ulteriori variabili.

Il fatto che l'inizio dell'utilizzazione ordinaria di Etoposide nelle situazioni cliniche avanzate risale ormai a molti anni orsono rende a sua volta assai difficile un confronto con l'andamento delle patologie in oggetto in epoca precedente, stante il fatto, che nell'ultimo quindicennio sono variate in maniera significativa i protocolli chemioterapici applicati in prima e seconda linea.

Nonostante il razionale della chemioterapia metronomica e i risultati siano incoraggianti, non può ritenersi prudente che essa venga sostituita alla chemioterapia tradizionale. Ha senso, invece, utilizzare i due regimi in combinazione o in alternanza, in modo che siano colpiti contemporaneamente due bersagli: le cellule tumorali e la rete vascolare che le nutre.

Fermi i benefici potenziali della chemioterapia metronomica o antiangiogenica, in particolare quando utilizzata in associazione con i nuovi farmaci molecolari, sussistono in ogni caso diverse problematiche significative che devono essere affrontate onde aumentare le possibilità di successo.

L'obiettivo è quindi quello di individuare la dose più piccola che permetta il controllo delle cellule bersaglio e quindi la sequenza ottimale che permetta di ottimizzare questo controllo nel tempo.

In particolare, vi è la necessità di appurare quali siano, nell'ambito della terapia metronomica, i chemioterapici più efficaci per ciascuna singola malattia, quali siano le combinazioni e le sequenze migliori e quali meccanismi di resistenza possano svilupparsi nel tempo.

Potrebbe in ogni caso essere utile, oltre a valutare l'andamento clinico della malattia, monitorare l'andamento dei markers associati ad angiogenesi (Trombospondina-1 o VEGF) e studiare la densità della microvascolarizzazione neoplastica (CD31).

Alla luce delle nuove evidenze scientifiche si prospetta anche un ulteriore meccanismo d'azione della chemioterapia metronomica sull'immuno-modulazione chemioindotta.

¹ Aisner J, Lee EJ

Etoposide. Current and future status

Cancer 67: 215-219, 1991

² Kucukoner M, Isikdogan A, Yaman S

Oral etoposide for platinum-resistant and recurrent epithelial ovarian cancer: a study by the Anatolian Society of Medical Oncology

Asian Pacific J Clin Oncol 13: 3973-3976, 2012

³ Alici S, Saip P, Eralp Y

Oral etoposide (VP16) in platinum-resistant epithelial ovarian cancer (EOC)

Am J Clin Oncol 26: 358-362, 2003

⁴ Uysal M, Ozdogan M, Kargi A

Prolonged progression-free survival with maintenance metronomic oral cyclophosphamide and etoposide treatment in macroscopic residual disease or recurrent/advanced stage ovarian cancer

J Buon 19(4): 980-984, 2014

⁵ Sterba J, Valik D, Mudry P

Combined biodifferentiating and antiangiogenic oral metronomic therapy is feasible and effective in relapsed solid tumors in children: single-center pilot study

Onkologie 29: 308-313, 2006

⁶ Kieran MW, Turner CD, Rubin J

A feasibility trial of antiangiogenic (metronomic) chemotherapy in pediatric patients with recurrent or progressive cancer

J Pediatr Hematol Oncol 27: 573-581, 2005

⁷ Rose PG, Blessing JA, Mayer AR

Prolonged oral etoposide as second-line therapy for platinum-resistant and platinum-sensitive ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study

J Clin Oncol 16: 405-410, 1998

⁸ Verdrengh M, Tarkowski A

Impact of topoisomerase II inhibition on cytokine and chemokine production

Inflamm Res 52: 148-153, 2003

⁹ Folkman J

Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?

Nat Rev Drug Discov 6: 273-286, 2007

¹⁰ Dreves J, Laus C, Mendiger M

Antiangiogenesis: current clinical data and future perspectives

Onkologie 25: 520-7, 2002

¹¹ Jain R.K.

Molecular regulation of vessel maturation

Nat Med 9:685, 2003

¹² Conway E.M., Collen D., Carmeliet P.

Molecular mechanisms of blood vessel growth

Cardiovasc Res 49:507, 2001

¹³ Shaked Y

Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents

Cancer Cell 14, 263-273, 2008

¹⁴ Rafii S.

Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration

Semin Cell Dev Biol 13:61, 2002

¹⁵ Reyes M.

Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow

J Clin Invest 109:337, 2002

¹⁶ Paez-Ribes M

Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis

Cancer Cell 15:220-231, 2009

¹⁷ Bocci G, Nicolaou KC, Kerbel RS

Protracted low-dose effects on human endothelial cell proliferation and survival in vitro reveal a selective antiangiogenic window for various chemotherapeutic drugs

Cancer Res 62: 6938-6943, 2002

¹⁸ Dreves J, Fakler J, Eisele S

Antiangiogenic potency of various chemotherapeutic drugs for metronomic chemotherapy

Anticancer Res 24: 1759-1764, 2004

¹⁹ Folkman J

Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis

Semin Oncol
29:15, 2002

²⁰ Carmeliet P.

Angiogenesis in health and disease

Nat Med 9: 653, 2003

²¹ Folkman J

Tumor angiogenesis: therapeutic implications

N Engl J Med 285: 1182-6, 1971

²² Kerbel RS., Klement G., Pritchard KI.

Continuous low-dose anti-angiogenic/metronomic chemotherapy: from the research laboratory into the oncology clinic

Ann Oncol 13: 12-5, 2002

²³ Moserle L, Amadori A, Indraccolo S

The angiogenic switch: implications in the regulation of tumor dormancy

Curr Mol Med 9(8): 935-941

²⁴ Iivanainen E., Kahari V.M., Heino J.

Endothelial cell-matrix interactions

Microsc Res Tech 60:13, 2003

²⁵ Motegi K, Harada K, Pazouki S

Evidence of a bi-phasic effect of thrombospondin 1 on angiogenesis

Histochem J 34(8-9): 411-421, 2002

²⁶ Bornstein P., Sage E.H.

Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function

Curr Opin Cell Biol 14:608, 2002

²⁷ Damber JE, Valbo C, Albertsson P

The anti-tumour effect of low-dose continuous chemotherapy may partly be mediated by thrombospondin

Cancer Chemother Pharmacol 58: 354-360, 2006

²⁸ Bocci G, Francia G, Man S

Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy

Proc Natl Acad Sci USA 100, 12917-12922

²⁹ Kerbel RS

Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer?

Science 312: 1171-1175, 2006

³⁰ Bergers G, Hanahan D

Modes of resistance to antiangiogenic therapy

Nat Rev Cancer 8: 592-603, 2008

³¹ Pietras K, Hanahan D

A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose “chemo-switch” regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer

J Clin Oncol 23, 939-952, 2005

³² Bocci G, Loupakis F

The possible role of chemotherapy in antiangiogenic drug resistance

Med Hypotheses 78(5): 646-648, 2012

³³ Ng SS, Figg WD

Upregulation of endogenous angiogenesis inhibitors: a mechanism of action of metronomic chemotherapy

Cancer Biol Ther 3(12): 1212-1213, 2004

³⁴ Dvorak HF

Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy

J Clin Oncol 20: 4368-4380, 2002

³⁵ Terme M, Colussi O, Marcheteau E

Modulation of immunity by antiangiogenic molecules in cancer

Clin Dev Immunol 2012: 492920, 2012

³⁶ Hildebrandt M, Peggs K, Uharek L

Immunotherapy: opportunities, risks and future perspectives

Cytotherapy 16: 120-129, 2014

³⁷ Hoenicke L, Zander L

Immune surveillance of senescent cell-biological significance in cancer and non cancer pathologies

Carcinogenesis 33(6): 1123-1126

³⁸ Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F

Immunological aspects of cancer chemotherapy

Nat Rev Immunol 8: 59-73, 2008

³⁹ Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F

Immunological aspects of cancer chemotherapy

Nat Rev Immunol 8: 59-73, 2008

⁴⁰ Kang TH, Mao CP, Lee SY

Chemotherapy acts as an adjuvant to convert the tumor microenvironment into a highly permissive state for vaccination-induced antitumor immunity

Cancer Res 73: 2493-2504, 2013

⁴¹ Nars MS, Kaneno R

Immunomodulatory effects of low dose chemotherapy and perspectives of its combination with immunotherapy

Int J Cancer 132: 2471-2478, 2013

⁴² Ma Y, Conforti R, Aymeric L

How to improve the immunogenicity of chemotherapy and radiotherapy

Cancer Metastasis Rev 30: 71-82, 2011

⁴³ Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H

Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape

Nat Immunol 3: 991-998, 2002

⁴⁴ Zitvogel L, Hannani D, Aymeric L

Antitumoral immunization during cancer chemotherapy

Bull Acad Natl Med 196: 1075-1086, 2012

⁴⁵ Mross K, Steinbild S

Metronomic anticancer therapy, an ongoing treatment option for advanced cancer patients

J Cancer Ther Res 1(1): 32, 2012

⁴⁶ André N, Pasquier E, Kamen B

Can targeted therapy be successful without metronomic scheduling?

Curr Top Med Chem 12: 1639-1642, 2012

⁴⁷ Collova E, Sebastiani F, De Matteis E

Use of metronomic chemotherapy in oncology: results from a national Italian survey

Tumori 97(4): 454-458, 2011

⁴⁸ Andre N, Padovani L, Pasquier E

Metronomic scheduling of anticancer treatment: the next generation of multitarget therapy?

Future Oncol 7: 385-394, 2011

⁴⁹ Maiti R

Metronomic chemotherapy

J Pharmacol Pharmacother 5: 186-192, 2014

⁵⁰ Lien K, Georgsdottir S, Sivanathan L

Low-dose metronomic chemotherapy: a systematic literature analysis

Eur J Cancer 49: 3387-3395, 2013

⁵¹ Kamen BA

Metronomic therapy: it makes sense and is patient friendly

J Pediatr Hematol Oncol 27(11): 571-572, 2005

⁵² Gasparini G

Metronomic scheduling: the future of chemotherapy?

Lancet Oncol 2(12): 733-740

⁵³ Andre N, Carrè M, Pasquier E

Metronomics: towards personalized chemotherapy?

Nat Rev Clin Oncol 11: 413-431, 2014

⁵⁴ Takimoto CH

Maximum tolerated dose: clinical end point for a bygone era?

Target Oncol 4(2):143-147, 2009

⁵⁵ Romiti A, Cox MC, Sarcina I

Metronomic chemotherapy for cancer treatment: a decade of clinical studies

Cancer Chemother Pharmacol 72: 13-33, 2013

⁵⁶ Kerbel RS, Kamen BA

The antiangiogenic basis of metronomic chemotherapy

Nat Rev Cancer 4(6): 423-436, 2004

⁵⁷ Bertolini F, Mancuso P, Shaked Y

Molecular and cellular biomarkers for angiogenesis in clinical oncology

Drug Discov Today 12(19-20): 806-812, 2007

⁵⁸ Scharovsky OG, Mainetti LE, Rozados VR

Metronomic chemotherapy: changing the paradigm that more is better

Curr Oncol 16(2): 7-15, 2009

⁵⁹ Maraveyas A, Lam T, Hetherington JW

Can a rational design for metronomic chemotherapy dosing be devised?

Br J Cancer 92(8): 1588-1590, 2005

⁶⁰ Pasquier E, Kavallaris M, Andre N

Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions

Nat Rev Clin Oncol 7(8):455-465, 2010

⁶¹ Laquente B, Vinals F, Germa JR

Metronomic chemotherapy: an antiangiogenic scheduling

Clin Transl Oncol 9: 93-98, 2007

⁶² Lam T

From total empiricism to a rational design of metronomic chemotherapy phase I dosing trials

Anticancer Drugs 17, 113-121, 2006

⁶³ Calvani N, Orlando L, Nacci

Metronomic chemotherapy against cancer: from paradigm to clinical practice?

Tumori 95: 843-845, 2009

⁶⁴ Loven D, Hasnis E, Bertolini F

Low-dose metronomic chemotherapy: from past experience to new paradigm in the treatment of cancer

Drug Discov Today 18: 193-201, 2013

⁶⁵ Kareva I, Waxman D, Lakka G

Metronomic chemotherapy: an attractive alternative to maximum tolerated dose therapy that can activate anti-tumor immunity and minimize therapeutic resistance

Cancer Letters 358: 100-106, 2015

⁶⁶ Hahnfeldt P, Folkman J, Hlatky L

Minimizing long-term tumor burden: the logic for metronomic chemotherapeutic dosing and its antiangiogenic basis

J Theor Biol 220(4): 545-554, 2003

⁶⁷ Miller KD, Sweeney CJ, Sledge J

Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics

J Clin Oncol 19(4): 1195-1206, 2001

⁶⁸ Browder T, Butterfield CE, Kraling BM

Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer

Cancer Res 60(7): 1878-1886, 2000

⁶⁹ Shaked Y, Emmenegger U, Man S

Optimal biologic dose of metronomic chemotherapy regimens is associated with maximum antiangiogenic activity

Blood 106(9): 3058-3061, 2005

⁷⁰ Sarmiento R, Gasparini G

Antiangiogenic metronomic chemotherapy

Onkologie 31:161-162, 2008

⁷¹ Hanahan D, Bergers G, Bergsland E

Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice

J Clin Invest 105(8): 1045-1047, 2000

⁷² Loven D, Hasnis E, Bertolini F

Low-dose metronomic chemotherapy: from past experience to new paradigms in the treatment of cancer

Drug Discovery Today 18: 193-201, 2013

⁷³ Gnoni A, Silvestris N, Licchetta A

Metronomic chemotherapy from rationale to clinical studies: a dream or reality?

Oncol Hemat 95: 46-61, 2015

⁷⁴ Bin Hao Y, Yong Y, Ruan J

New insights into metronomic chemotherapy-induced immunoregulation

Cancer Letters 354: 220-226, 2014