

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
Scienze Mediche Generali e dei Servizi

Ciclo XXVII

**Settore Concorsuale di afferenza:** 06/B1 Medicina Interna

**Settore Scientifico disciplinare:** MED/09 Medicina Interna

Prospettive di terapia sistemica combinata  
Sorafenib+Capecitabina per l'epatocarcinoma: valutazione  
nel modello animale e ruolo dell'imaging ad ultrasuoni

**Presentata da:**

**Laura Venerandi**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Nicola Rizzo**

**Relatore**

**Prof. Fabio Piscaglia**

**Co-relatore**

**Dr. Alessandro Granito**

**Esame finale anno 2015**

# INDICE

<b>RIASSUNTO.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>5</b>
<b>OBIETTIVI .....</b>	<b>9</b>
<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>9</b>
<b>RISULTATI .....</b>	<b>12</b>
<b>Volumi .....</b>	<b>12</b>
<b>CEUS .....</b>	<b>15</b>
<b>Pesi .....</b>	<b>16</b>
<b>Analisi Western Blot .....</b>	<b>17</b>
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>18</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>22</b>

## RIASSUNTO

**Introduzione:** il Sorafenib rappresenta ad oggi l'unica terapia sistemica approvata per il trattamento dell'epatocarcinoma (HCC) avanzato. Tuttavia, dopo un periodo variabile di beneficio, molti tumori sviluppano delle resistenze a tale farmaco.

La chemioterapia somministrata secondo schema metronomico comporta una minore tossicità rispetto alla chemioterapia convenzionale ed un effetto antiangiogenetico, attraverso meccanismi diretti sulle cellule endoteliali ed indiretti.

La Capecitabina metronomica recentemente si è dimostrata efficace e ben tollerata nell'HCC avanzato. L'aggiunta di Capecitabina a Sorafenib potrebbe potenziarne l'effetto antiangiogenetico.

**Obiettivi:** valutare mediante tecniche ecografiche il comportamento biologico di un modello murino di HCC sottoposto a Sorafenib, Capecitabina e terapia di associazione dei due farmaci, per dimostrarne un eventuale effetto sinergico.

**Materiali e metodi:** il modello eterotopico di HCC è stato creato in topi *scid* mediante inoculazione sottocutanea di 5 milioni di cellule HuH7. Quando le masse hanno raggiunto un diametro di 5-10 mm, i topi sono stati suddivisi in 4 gruppi: gruppo 1 sottoposto a terapia con placebo (9 topi), gruppo 2 a terapia con Sorafenib (7 topi), gruppo 3 a terapia con Capecitabina (7 topi) e gruppo 4 a terapia di combinazione Sorafenib+Capecitabina (10 topi). I topi sono stati studiati al giorno 0 e al giorno 14 con ecografia B-mode e con mezzo di contrasto (CEUS). Al giorno 14 gli animali sono stati sacrificati e i pezzi tumorali sono stati conservati per l'analisi Western Blot.

**Risultati:** un topo del gruppo 1 e 4 topi del gruppo 4 sono stati trovati morti precocemente nelle gabbie e quindi esclusi.

Il delta di crescita tumorale al giorno 14 rispetto al giorno 0 è risultato di +503 % (109-1112), +158 % (36-331), +462 % (254-653) e +176 % (29-338) rispettivamente

nei 4 gruppi, con una differenza statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) tra i 4 gruppi, tra il gruppo 1 e 2, tra il gruppo 1 e 4, tra il gruppo 2 e 3, tra il gruppo 3 e 4.

Alla CEUS non si sono evidenziate differenze statisticamente significative nei cambiamenti di perfusione tumorale al giorno 14 nei 4 gruppi.

L'analisi Western Blot ha mostrato livelli di VEGFR-2 inferiori nel gruppo dei topi trattati con Sorafenib, ma in assenza di significatività statistica.

**Conclusioni:** la terapia di associazione di Sorafenib e Capecitabina non comporta un beneficio, in termini di riduzione della crescita tumorale, in un modello murino di HCC rispetto al solo Sorafenib. Inoltre, può essere sospettato un incremento di tossicità.

## INTRODUZIONE

L'epatocarcinoma (HCC) è la quinta neoplasia più diffusa al mondo e la seconda causa di morte per cancro [1].

La prognosi e il trattamento dell'HCC dipendono dallo stadio tumorale, definito dal sistema di stadiazione Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC), e dalla funzione epatica del paziente. Sfortunatamente, solo il 30% dei pazienti con HCC è suscettibile di trattamenti curativi al momento della diagnosi, mentre nella maggior parte dei casi il tumore si presenta in uno stadio avanzato [2].

Il Sorafenib, inibitore multichinasi di VEGFR-2, PDGFR, Raf-1, B-Raf, c-kit e altri, è un farmaco che agisce bloccando la neoangiogenesi e la proliferazione tumorale. Esso rappresenta ad oggi l'unica terapia sistemica approvata per il trattamento dell'HCC avanzato nei pazienti con una funzione epatica conservata. Due studi clinici randomizzati di fase III ne hanno dimostrato un vantaggio di sopravvivenza rispetto al placebo [3,4].

Tuttavia, gli effetti del Sorafenib sulla stabilizzazione tumorale sono spesso solo transitori e, dopo un periodo variabile di iniziale beneficio, il tumore comincia nuovamente a crescere portando ad una progressione di malattia. In altri casi, il tumore è resistente ab initio alla terapia.

Vari sono i meccanismi ipotizzati alla base dello sviluppo della resistenza tumorale ai farmaci antiangiogenetici [5, 6]:

- l'attivazione e/o upregulation di vie pro-angiogenetiche alternative, tra cui quella di FGF (fibroblast growth factor) e HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor);
- il reclutamento di cellule pro-angiogenetiche derivate dal midollo osseo, che provocano la formazione di nuovi vasi, stimolando così la crescita del tumore;
- l'aumento della concentrazione a livello dei vasi tumorali dei periciti, che stabilizzando le cellule endoteliali, le rendono meno sensibili ai farmaci antiangiogenetici;

- l'attivazione di un processo di invasione e metastatizzazione indipendente dalla neoangiogenesi, attraverso uno switch fenotipico tumorale o l'espressione di un programma genico prima silenziato.

La resistenza intrinseca ai farmaci antiangiogenetici viene definita invece come la totale assenza di ogni beneficio, anche transitorio, derivato dalla terapia, in termini di risposta tumorale, aumento della sopravvivenza o miglioramento della qualità di vita del paziente. Tra i meccanismi implicati descritti in studi su modelli animali e su biopsie di tumori umani, vi sarebbero la preesistente ridondanza di segnali pro-angiogenetici e l'infiltrazione di cellule infiammatorie che esprimono fattori pro-angiogenetici [5, 6].

Il problema della resistenza al Sorafenib ha portato così allo sviluppo di diversi trials clinici che propongono nuove terapie, singole o in associazione, in prima linea o nei casi di HCC non responsivo a tale farmaco [7].

Negli ultimi anni si è sviluppato in oncologia il concetto di chemioterapia "metronomica", ovvero somministrata a basse dosi (molto inferiori alla dose massima tollerata) e in maniera continuativa, senza le pause prolungate tipiche della chemioterapia convenzionale. Questa modalità di somministrazione determina da un lato una minore tossicità, in particolare a livello midollare e gastrointestinale, dall'altro un effetto antiangiogenetico attraverso un'azione sulle cellule endoteliali, come dimostrano diversi studi preclinici [8, 9].

La chemioterapia convenzionale ha infatti un debole effetto sulle cellule endoteliali, i cui danni vengono riparati durante le lunghe pause necessarie tra una somministrazione e l'altra. Se i farmaci vengono invece somministrati continuativamente, anche basse concentrazioni sono efficaci nell'inibire la proliferazione delle cellule endoteliali [10].

Oltre a questo effetto diretto, altri meccanismi sono stati dimostrati alla base dell'attività antiangiogenetica della chemioterapia metronomica: l'induzione di trombospondina 1 (TSP-1), potente inibitore endogeno dell'angiogenesi, che agisce legandosi sia a CD36 espresso sulla membrana delle cellule endoteliali inducendone

l'apoptosi, sia a VEGF bloccandone l'attività; la riduzione dei livelli di HIF-1 $\alpha$ , con conseguente soppressione di fattori angiogenetici tra cui VEGF e FGF; la riduzione del numero e della vitalità delle cellule endoteliali progenitrici (EPC), la cui migrazione dal midollo osseo nel tessuto tumorale contribuisce alla neoangiogenesi. Tali effetti sarebbero incrementati dall'associazione con farmaci antiangiogenetici [10-12].

Inoltre la chemioterapia metronomica sembrerebbe stimolare la risposta immunitaria riducendo le cellule T regolatrici (Treg), i cui livelli correlano con la progressione tumorale, e inducendo la maturazione delle cellule dendritiche [11].

L'efficacia di diversi schemi terapeutici con chemioterapia metronomica, in particolare in associazione a farmaci antiangiogenetici (ciclofosfamide, UFT e doxorubicina in combinazione con anticorpi anti-VEGF) è stata studiata in modelli animali di HCC, dimostrando un beneficio in termini di inibizione della crescita tumorale e overall survival (OS) rispetto alle terapie singole. L'effetto sinergico antiangiogenetico delle due terapie combinate è confermato dall'incremento dell'apoptosi delle cellule endoteliali e dalla riduzione della densità di vasi tumorali [13-16].

I pochi studi clinici presenti in letteratura sulla chemioterapia metronomica per l'HCC avanzato confermano tali risultati positivi. Hsu et al. hanno studiato la combinazione di Sorafenib e UFT, dimostrando una buona sicurezza e una OS di 7.4 mesi, superiore a quella ottenuta nel trial registrativo asiatico di Sorafenib [11, 17].

La Capecitabina, agente citotossico orale fluoropirimidinico, è un profarmaco, che viene convertito a 5-fluorouracile elettivamente nel tessuto tumorale, consentendo una maggiore tollerabilità, facilità di somministrazione e concentrazione intratumorale del farmaco [18]. Essa viene impiegata correntemente nel carcinoma mammario e del colon-retto e più recentemente si è dimostrata efficace e ben tollerata anche in pazienti con epatocarcinoma avanzato su cirrosi [19, 20]. In particolare, lo studio di fase II di Brandi et al. mostra risultati incoraggianti sull'utilizzo della

Capecitabina metronomica nell'HCC avanzato sia in prima linea che in seconda linea, con una OS rispettivamente di 14.47 e 9.77 mesi [21].

L'associazione di Sorafenib e Capecitabina metronomica è stata studiata in trials clinici di fase 1 e 2 su diversi tipi di tumori solidi (carcinoma mammario, renale, gastrico). Gli studi di farmacocinetica evidenziano come l'aggiunta di Sorafenib determini un modesto incremento dell'esposizione a Capecitabina e 5-FU, aumentandone Cmax e AUC [22-26].

Bellmunt, nel suo studio di fase 2 sulla combinazione dei due farmaci nel carcinoma a cellule renali metastatico (Sorafenib 400 mg x 2 e Capecitabina 500 mg/m<sup>2</sup> x 2), descrive un livello di tossicità maneggevole, con una progression free survival (PFS) ed una objective response rate (ORR) superiori a quelle dei singoli agenti [22].

Anche i risultati di Kim et al. sul carcinoma gastrico avanzato sono incoraggianti (ORR 62,5%, OS 14.7 mesi) e il profilo di tossicità della terapia combinata si mantiene accettabile, con un modesto incremento di diarrea e sindrome mano-piede di grado lieve-moderato [23].

Nello lavoro di Baselga sul carcinoma mammario metastatico, l'aggiunta di Sorafenib (400 mg x 2) a Capecitabina (1000 mg/m<sup>2</sup> x 2) portava ad un aumento statisticamente significativo della PFS. Tuttavia a tali dosaggi, molti pazienti sospendevano la terapia per effetti avversi [24].

Non ci sono in letteratura studi sull'associazione dei due farmaci nell'HCC. Sono disponibili solo i dati preliminari di uno studio di fase 2 su 15 pazienti con HCC su cirrosi (classe funzionale Child Pugh A o B7) trattati in prima linea con Sorafenib 400 mg x 2 e Capecitabina 850 mg/m<sup>2</sup> x 2. L'associazione dei due farmaci era ben tollerata e portava ad una disease control rate (DCR) del 54% ed una OS di 11.3 mesi [27].



## OBIETTIVI

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare, mediante tecniche ultrasonografiche, il comportamento biologico di un modello eterotopico murino di epatocarcinoma sottoposto a terapia di associazione con Sorafenib e Capecitabina metronomica, per dimostrarne un'eventuale attività sinergica ed un aumento di efficacia antitumorale rispetto alle terapie con i singoli agenti.

Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico veterinario universitario di Bologna.

## MATERIALI E METODI

La linea cellulare umana Huh7 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) è stata mantenuta ed ampliata utilizzando una tecnica di coltura standard con Dulbecco Modified Eagle Medium ad elevato tasso di glucosio, integrato con L-glutamina, 1 % ampicillina/amfotericina B e con il 10 % di siero fetale bovino (Gibco, Italia).

Il modello è stato ottenuto mediante l'inoculazione sottocutanea di  $5 \times 10^6$  cellule sospese in soluzione salina sterile tamponata con fosfato (Gibco, Italia) nel fianco destro di topi *scid* di 6-8 settimane.

Nel corso dell'esperimento, i topi sono stati nutriti con cibo e acqua ad libitum e sono stati allocati in gabbie sterili poste in un armadio con ricircolo di aria specifico, all'interno di una stanza con temperatura e umidità controllate e ciclo di luce/buio di 12 ore.

La crescita delle masse tumorali è stata monitorata periodicamente mediante ecografia. Quando le masse hanno raggiunto un diametro di 5-10 mm, i topi sono stati randomizzati in quattro gruppi:

- Gruppo 1: sottoposto a terapia con placebo
- Gruppo 2: sottoposto a terapia con Sorafenib
- Gruppo 3: sottoposto a terapia con Capecitabina
- Gruppo 4: sottoposto a terapia combinata Sorafenib+Capecitabina

Il placebo e i farmaci sono stati somministrati quotidianamente mediante gavage orale per un periodo di 14 giorni. Il placebo era costituito da una soluzione di 12.5 % Cremoforo (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA), 12.5 % etanolo e 75 % acqua sterile. Il Sorafenib è stato somministrato al dosaggio di 62 mg/kg die [28]; la Capecitabina al dosaggio di 200 mg/kg [29].

Gli animali sono stati pesati e studiati al giorno zero e al giorno 14 con ecografia B-Mode e con mezzo di contrasto (CEUS) utilizzando un ecografo MyLab 70 XVG (Esaote, Italia) con sonda lineare da 4-13 MHz. Durante gli esperimenti, i topi venivano anestetizzati mediante gas Sevoflurano con supplementazione di ossigeno (1%), depilati sul fianco da esaminare e posizionati su di un supporto riscaldato per mantenerne la temperatura corporea costante. Anche il gel utilizzato per gli esami ecografici veniva riscaldato.

Per ogni tumore sono state eseguite con l'ecografia B-mode una scansione trasversale ed una longitudinale e misurati i diametri massimi. Il volume tumorale è stato calcolato mediante la formula seguente: (diametro antero-posteriore x diametro trasversale x diametro longitudinale)/2.

Per l'esecuzione della CEUS, la sonda veniva posizionata su di un supporto meccanico e mantenuta fissa in modo da ottenere una scansione costante del tumore durante tutta la durata dell'esame. Una quantità pari a 0.10 ml di mezzo di contrasto (Sonovue, Bracco, Svizzera) veniva iniettata nel seno retroorbitario del topo e veniva registrato un clip di un minuto.

I clip sono stati quindi esaminati in cieco da due operatori ed è stato quantificata visivamente la perfusione tumorale come percentuale di zona perfusa rispetto alla massa totale al picco di enhancement arterioso del mezzo di contrasto (circa 30 secondi).

Al giorno 14, al termine degli esperimenti ed ancora sotto anestesia, tutti i topi sono stati sacrificati con 0.1 ml di soluzione di embutramide, mebezonium ioduro e tetracaina cloridrato (Tanax, Intervet Italia srl, Italia). Sono state prelevate le masse tumorali e i pezzi sono stati conservati in azoto liquido e congelati a -80 °C per l'analisi Western Blot.

Tre anticorpi policlonali, uno diretto contro VEGFR-2 (Cell Signaling Technology, Inc. Danversa, MA, USA, diluzione 1:1000), uno contro HIF-1 $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, Inc. di Santa Cruz, CA, USA, diluizione 1:200) ed uno contro Trombospondina-1 (Thrombospondin 1 mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:500) sono stati incubati separatamente per 16 ore a 4 °C. Un anticorpo secondario coniugato (etichetta antirabbit polimero HRP, sistema Envision DAKO Cytomation, Carpinteria, CA, USA) è stato incubato per 45 minuti a temperatura ambiente e la corrispondente banda è stata rivelata con il metodo chemiluminescenza potenziata (Amersham, UK). Le immagini digitali delle autoradiografie sono state acquisite e quantificate con ChemiDoc™ XRS + (Immagine Lab™ Software, Bio - Rad ).

Le immagini sono state calibrate contro un autoradiografia di riferimento ed espresse in unità di densità relativa (d.u.). Dopo l'acquisizione, le membrane sono state cancellate, e incubate nuovamente per due ore a temperatura ambiente con anticorpo anti- $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc. di Santa Cruz, CA, USA) per normalizzare la proteina carico. Per quantificare i livelli di ogni proteina (valore normalizzato) è stato usato un rapporto tra le bande di VEGFR-2, HIF-1 $\alpha$ , Trombospondina-1 e  $\beta$ -actina corrispondente.

## **Analisi statistica**

I dati sono presentati come mediane, valori minimi e massimi. Le differenze tra i gruppi sono state calcolate utilizzando i test di Kruskal Wallis e Mann-Whitney. Una  $p < 0.05$  è stata considerata statisticamente significativa. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software SPSS 16.0 ( Chicago, USA ).

## **RISULTATI**

33 topi sono stati utilizzati per lo studio. Di questi, 4 appartenenti al gruppo della combinazione ed uno appartenente al gruppo del placebo sono stati trovati morti precocemente nelle gabbie e quindi esclusi. I topi oggetto di studio sono risultati infine 29, così suddivisi:

- Gruppo 1 (placebo): 8 topi
- Gruppo 2 (Sorafenib): 7 topi
- Gruppo 3 (Capecitabina): 7 topi
- Gruppo 4 (Sorafenib+Capecitabina): 6 topi

### **Volumi**

La mediana dei volumi tumorali al giorno zero era di  $293 \text{ mm}^3$  (201-601) per il gruppo 1,  $352 \text{ mm}^3$  (82-1012) per il gruppo 2,  $329 \text{ mm}^3$  (190-885) per il gruppo 3 e  $359 \text{ mm}^3$  (85-924) per il gruppo 4. Al giorno 14 i volumi tumorali erano  $1817 \text{ mm}^3$  (381-2621) nel gruppo 1,  $692 \text{ mm}^3$  (111-1656) nel gruppo 2,  $1849 \text{ mm}^3$  (1033-4624) nel gruppo 3,  $1000 \text{ mm}^3$  (370-1679) nel gruppo 4 (**tabella 1**).

Il delta percentuale di crescita ( $\Delta$  crescita), calcolato come  $[(\text{volume finale} - \text{volume iniziale}) / \text{volume iniziale}] \times 100$ , è risultato rispettivamente di 503 %, 158 %, 462 % e 176 % nei 4 gruppi, con una differenza statisticamente significativa tra i 4 gruppi

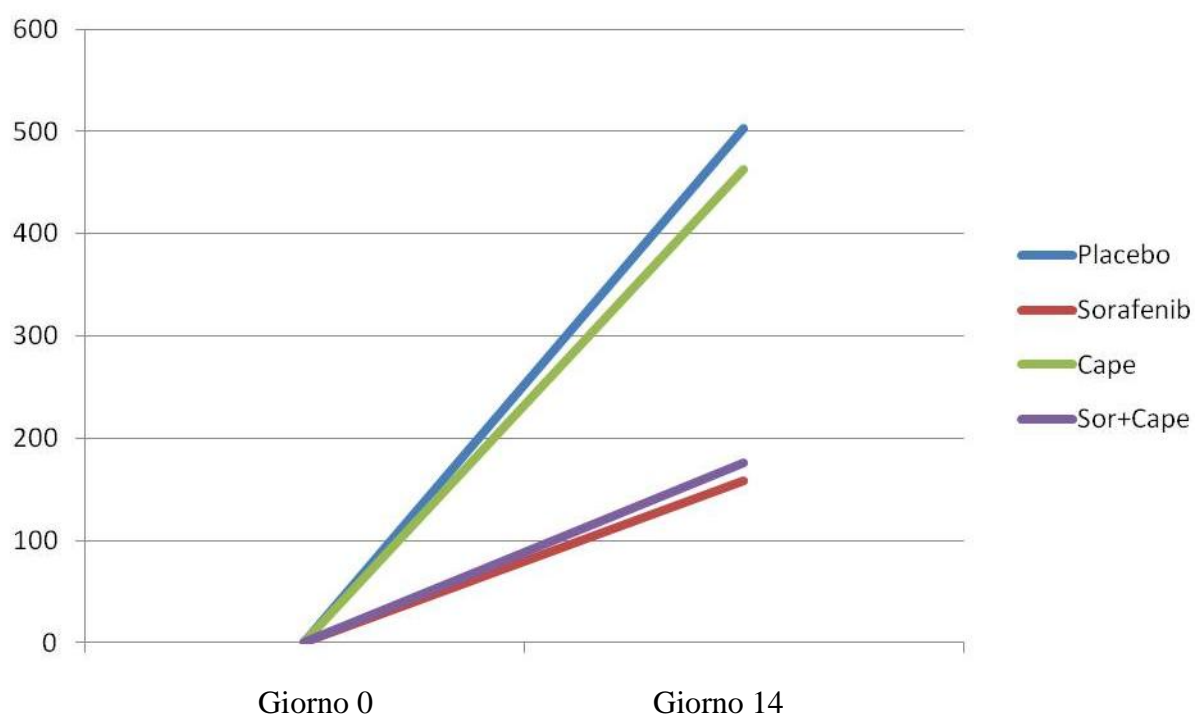
(p=0.002), tra il gruppo 1 e 2 (p=0.004), tra il gruppo 1 e 4 (p=0.005), tra il gruppo 2 e 3 (p=0.002), tra il gruppo 3 e 4 (p=0.014).

Nei topi trattati con Sorafenib e con la combinazione Sorafenib+Capecitabina si è assistito quindi ad un crescita tumorale significativamente inferiore rispetto agli altri gruppi; gli effetti della sola Capecitabina sono risultati sovrapponibili a quelli del placebo; l'associazione della Capecitabina al Sorafenib non ha aggiunto benefici in termini di riduzione della crescita tumorale rispetto al solo Sorafenib (**figura 1**).

**Tabella 1**

	<b>Volume G0 (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Volume G14 (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Δ crescita (%)</b>
<b>Gruppo 1 (Placebo)</b>	293 (201-601)	1817 (381-2621)	503 (109-1112)
<b>Gruppo 2 (Sorafenib)</b>	352 (82-1012)	692 (111-1656)	158 (36-331)
<b>Gruppo 3 (Capecitabina)</b>	329 (190-885)	1849 (1033-4624)	462 (254-653)
<b>Gruppo 4 (Sorafenib+Capecitabina)</b>	359 (85-924)	1000 (370-1679)	176 (29-338)

Valori mediani con rispettivi minimi e massimi dei volumi tumorali nei 4 gruppi di studio al giorno zero e al giorno 14. L'ultima colonna mostra il delta percentuale di crescita tumorale dal giorno zero al giorno 14.



**Figura 1.** Delta percentuale di crescita dei tumori (asse y) dei diversi gruppi dal giorno zero al giorno 14 (asse x).

I tumori dei topi trattati con Sorafenib e con la combinazione Sorafenib+Capecitabina hanno avuto una crescita significativamente inferiore rispetto ai tumori dei topi trattati con Placebo o con sola Capecitabina. La combinazione dei due farmaci non ha aggiunto benefici in termini di riduzione della crescita tumorale rispetto al solo Sorafenib.

## CEUS

All'ecografia con mezzo di contrasto, le percentuali di captazione arteriosa del mezzo di contrasto al giorno zero nei 4 gruppi erano rispettivamente dell'85 %, 100 %, 90 % e 90 %. Al giorno 14 i valori erano di 70 % nel gruppo 1, 100 % nel gruppo 2, 70 % nel gruppo 3 e 85 % nel gruppo 4 (**tabella 2**), con un delta percentuale rispettivamente di -23 %, 0 %, -13 % e 0 %, in assenza di una differenza statisticamente significativa tra i vari gruppi.

Nei gruppi di topi trattati con Placebo e Capecitabina si è assistito ad una tendenza alla riduzione della perfusione tumorale alla CEUS, mentre nei topi trattati con Sorafenib e con la combinazione Sorafenib+Capecitabina tale parametro è rimasto costante dopo il trattamento (**tabella 2**).

**Tabella 2**

	<b>Contrasto G0</b> (%)	<b>Contrasto G14</b> (%)	<b>Δ contrasto</b> (%)
<b>Gruppo 1</b> <b>(Placebo)</b>	85 (60-100)	70 (40-90)	-23 (-56-25)
<b>Gruppo 2</b> <b>(Sorafenib)</b>	100 (90-100)	100 (60-100)	0 (-40-11)
<b>Gruppo 3</b> <b>(Capecitabina)</b>	90 (50-100)	70 (40-100)	-13 (-40-12.5)
<b>Gruppo 4</b> <b>(Sorafenib+Capecitabina)</b>	90 (70-100)	85 (50-100)	0 (-50-11)

Percentuale di mezzo di contrasto al picco di enhancement della fase arteriosa della CEUS al giorno 0 e al giorno 14 per i diversi gruppo di trattamento. Nell'ultima colonna è riportato il delta percentuale di contrasto tra il giorno 0 e il giorno 14.

## Pesi

La tabella 3 riporta i pesi degli animali al giorno 0 e al giorno 14 e la variazione percentuale di essi dopo il trattamento. Il topi trattati con Sorafenib hanno subito la maggiore perdita di peso dopo il trattamento, seguiti dai topi trattati con la terapia combinata. La perdita di peso negli animali trattati con placebo o Capecitabina è stata minima. Una differenza statisticamente significativa ( $p=0.029$ ) si è osservata solo nel confronto tra le variazioni di peso dei gruppi 1 e 2.

**Tabella 3**

	<b>Peso G0</b> (g)	<b>Peso G14</b> (g)	<b>Δ peso</b> (%)
<b>Gruppo 1</b> <b>(Placebo)</b>	21,5 (18,4-22,7)	21,25 (20,2-23,6)	-1,7 % (-5.6-16.3)
<b>Gruppo 2</b> <b>(Sorafenib)</b>	20,8 (18-22,1)	19,2 (15,3-20,7)	-9,6 % (-21.5- -0.5)
<b>Gruppo 3</b> <b>(Capecitabina)</b>	20 (19,2-23,4)	19,9 (18,6-22,4)	-1,5 % (-12.8-8.9)
<b>Gruppo 4</b> <b>(Sorafenib+Capecitabina)</b>	20 (18,4-21,8)	19,1 (17,7-20,8)	-3,7 % (-7.4-5.5)

Pesi dei topi al giorno 0 e al giorno 14 nei diversi gruppi di trattamento e variazioni percentuali.



## Analisi Western Blot

Per l'analisi Western Blot sono stati utilizzati 6 campioni per ciascun gruppo, selezionati casualmente. I livelli di VEGFR-2, Hif-1 $\alpha$  e Trombospondina-1 ottenuti nei 4 gruppi di trattamento sono riportati nella tabella 4.

Sebbene la differenza tra tali dati nei 4 gruppi non sia risultata statisticamente significativa, notiamo come i valori di VEGFR-2 siano inferiori nel gruppo dei topi trattati con Sorafenib rispetto a tutti gli altri gruppi; i livelli di HIF-1 $\alpha$  sono risultati maggiori nel gruppo trattato con la terapia combinata; quelli di Trombospondina-1 nel gruppo di topi trattati con Capecitabina.

**Tabella 4.**

	<b>VEGFR-2/ <math>\beta</math>-actina</b>	<b>HIF-1<math>\alpha</math>/ <math>\beta</math>-actina</b>	<b>TPS-1/ <math>\beta</math>-actina</b>
<b>Gruppo 1 (Placebo)</b>	2.10 (0.26-2.13)	0.38 (0.19-0.80)	2.12 (0.55-3.15)
<b>Gruppo 2 (Sorafenib)</b>	1.27 (0.20-4.14)	0.38 (0.16-1.12)	2.00 (1.10-5.74)
<b>Gruppo 3 (Capecitabina)</b>	1.60 (0.68-7.28)	0.73 (0.19-8.93)	3.45 (1.09-5.76)
<b>Gruppo 4 (Sorafenib+Capecitabina)</b>	1.90 (0.38-1.93)	0.80 (0.10-3.71)	1.70 (1.17-4.75)

Valori di VEGFR-2, HIF-1 $\alpha$  e Trombospondina-1 misurati all'analisi Western Blot al giorno 14 nei diversi gruppi di trattamento.

## DISCUSSIONE

Questo studio dimostra come l'aggiunta di Capecitabina a Sorafenib non determini un effetto maggiore in termini di riduzione della crescita tumorale in un modello murino eterotopico di epatocarcinoma rispetto alla terapia con solo Sorafenib.

Il Sorafenib rappresenta ad oggi l'unico farmaco approvato per il trattamento dell'HCC avanzato. Spesso tuttavia, dopo un periodo variabile di iniziale risposta, il tumore diviene insensibile al farmaco e si assiste ad una progressione di malattia.

Il problema della resistenza ai farmaci antiangiogenetici ha aperto così la strada allo sviluppo di numerosi trials clinici sull'HCC avanzato, allo scopo di trovare nuove terapie che possano superare tali resistenze.

Negli ultimi anni, studi sulla Capecitabina metronomica ne hanno dimostrato una buona tolleranza ed una potenziale efficacia in pazienti con HCC avanzato sia in prima che in seconda linea, con una OS rispettivamente di 14.47 e 9.77 mesi [21].

Il razionale della chemioterapia somministrata secondo schema metronomico risiede in un profilo di tossicità più maneggevole e in un effetto antiangiogenetico, attraverso l'azione diretta sulle cellule endoteliali e meccanismi indiretti come l'inibizione di HIF-1 $\alpha$  e l'induzione di TPS-1 [10, 11].

L'aggiunta di farmaci a specifico bersaglio antiangiogenetico rappresenterebbe un'opportunità di aumentare l'efficacia della terapia metronomica, senza incrementarne significativamente la tossicità. Studi preclinici dimostrano come la combinazione delle due terapie comporti un incremento dell'apoptosi delle cellule endoteliali e una riduzione della densità di vasi tumorali rispetto alle terapie singole [9].

Partendo da questi presupposti e dai risultati incoraggianti di trials clinici di fase I e II [22-27], abbiamo condotto questo studio con l'obiettivo di valutare un eventuale effetto sinergico della combinazione di Sorafenib e Capecitabina metronomica in un modello murino di HCC.

I nostri risultati hanno mostrato tuttavia una crescita tumorale (delta percentuale di crescita da G0 a G14) sovrapponibile nei gruppi di topi trattati con Sorafenib e con la terapia combinata. L'aggiunta di Capecitabina a Sorafenib non ha determinato un effetto maggiore né in termini di riduzione della crescita tumorale, né di inibizione dell'angiogenesi, come dimostrano i livelli di VEGFR-2 al Western Blot.

Tale risultato potrebbe essere spiegato da diversi motivi.

Entrambe le terapie con Sorafenib e con Capecitabina metronomica hanno come bersaglio l'angiogenesi. La loro combinazione potrebbe aver indotto un livello tale di ipossia nel microambiente cellulare da stimolare la crescita tumorale, o perlomeno da impedire un'ulteriore inibizione della crescita. I livelli di HIF-1 $\alpha$  ottenuti al Western Blot sembrerebbero confermare questa ipotesi. Tale fattore infatti, stimolato dall'ipossia e responsabile dell'induzione di VEGF e di altri fattori pro-angiogenetici, è risultato maggiore nel gruppo di topi trattati con la terapia combinata, seppure in assenza di una significatività statistica.

Berruti et al. nel loro studio sull'associazione di Sorafenib e chemioterapia metronomica con Paclitaxel nel carcinoma adrenocorticale hanno ottenuto risultati analoghi. In particolare, la combinazione dei due farmaci manteneva un'attività citotossica in vitro, sebbene non superiore alla terapia con solo Sorafenib. In vivo invece la terapia combinata era totalmente inefficace e sembrava addirittura paradossalmente stimolare la progressione tumorale. Gli autori spiegano questi risultati con una possibile eccessiva stimolazione di HIF-1 $\alpha$  e conseguente induzione di geni coinvolti nell'angiogenesi e nella invasione tumorale [30].

In un recente studio condotto in vitro sugli effetti dell'associazione di Sorafenib e 5-FU su cellule di HCC, la combinazione non determina risultati migliori delle singole terapie sull'inibizione della proliferazione cellulare. Il Sorafenib, attraverso l'inibizione della cascata di RAF/MEK/ERK e STAT3, determinerebbe la down-regulation di ciclina D e quindi l'arresto del ciclo cellulare nella fase G1 e la riduzione delle cellule in fase S. In questo modo ridurrebbe la sensibilità delle cellule al 5-FU. I due farmaci avrebbero quindi effetti antagonisti piuttosto che sinergici

[31]. Questi risultati sono in disaccordo con studi di farmacocinetica su altri tipi di tumori solidi, secondo cui l'associazione di Sorafenib determinerebbe un aumento dell'esposizione a Capecitabina e a 5-FU [25-26]. Gli stessi autori spiegano tuttavia che la natura degli effetti dipende dalla linea cellulare utilizzata e dalle modalità di somministrazione delle terapie: quando Sorafenib viene somministrato dopo 5-FU, l'effetto può essere sinergico, poiché la sua azione non è dipendente dalle fasi del ciclo cellulare [32].

Nel nostro studio, la terapia con Capecitabina ha dimostrato, analogamente al placebo, effetti significativamente inferiori rispetto al Sorafenib o alla terapia di associazione sulla crescita tumorale.

Due studi sugli effetti di Capecitabina in prima linea sull'HCC avanzato confermano l'inferiorità di tale farmaco rispetto al Sorafenib, con una OS di 4.8 e 5.07 mesi nei due lavori [33, 34]. Le caratteristiche dei pazienti di questi due trial sono tuttavia diversi rispetto allo studio di Brandi: tutti i pazienti rientrano nello stadio BCLC-C e alcuni hanno un ECOG performance status 2.

Secondo alcuni autori, l'attività antitumorale della chemioterapia metronomica, perlomeno di alcuni farmaci, sarebbe poco dipendente dagli effetti antiangiogenetici e risiederebbe piuttosto nella stimolazione immunitaria. Doloff et al. hanno dimostrato che la terapia metronomica con Ciclofosfamide induce una regressione tumorale completa e duratura in un modello murino di glioblastoma con un meccanismo che non coinvolge l'antiangiogenesi, bensì l'attivazione dell'immunità innata, come dimostrato dall'incremento delle cellule natural killer (NK) e dendritiche. L'incremento di TPS-1 associato alla chemioterapia metronomica non è sufficiente, in assenza di un'adeguata risposta immunitaria, a determinare una risposta tumorale, come avviene nei topi immunodepressi privi di cellule NK [35].

Anche nel nostro studio, livelli maggiori di TPS-1 si riscontrano nel gruppo di topi trattato con Capecitabina, ma nonostante ciò la crescita tumorale in questo gruppo non è stata differente dal gruppo del placebo. La parziale immunosoppressione dei topi *scid* utilizzati, che possiedono cellule NK e macrofagi ma sono privi delle cellule

Treg, anch'esse implicate secondo alcuni autori nella risposta immuno-mediata alla base dei meccanismi della chemioterapia metronomica, potrebbe in parte spiegare questo dato.

Per quanto riguarda il comportamento dei tumori all'ecografia con mezzo di contrasto, non si sono evidenziate differenze statisticamente significative nei 4 gruppi di trattamento. Potremmo comunque correlare la tendenza ad una riduzione di perfusione tumorale osservata nei gruppi del placebo e della Capecitabina con la maggiore crescita tumorale degli stessi gruppi; è verosimile che i tumori a più rapido accrescimento presentino un aumento delle aree necrotiche interne.

Infine, la perdita percentuale di peso è risultata maggiore nel gruppo di topi trattati con Sorafenib. L'aggiunta di Capecitabina non ha determinato un ulteriore calo ponderale dei topi. Nonostante ciò, il ritrovamento di 4 topi morti precocemente appartenenti al gruppo della terapia di associazione ne fa sospettare un incremento di tossicità rispetto alle terapie con i singoli agenti.

Questo studio presenta dei limiti: innanzitutto il numero relativamente basso di topi utilizzati in ogni singolo gruppo, in particolare nel gruppo della terapia di associazione. Inoltre, per stabilire l'efficacia delle terapie è stato utilizzato un criterio puramente dimensionale, basandosi sui cambiamenti dei volumi tumorali misurati all'ecografia in B-mode. Tuttavia, secondo i criteri mRECIST, la valutazione della risposta dei tumori sottoposti a terapie antiangiogenetiche deve essere effettuata misurando, mediante tecniche con mezzo di contrasto (TC o RM), le aree vitali intratumorali [36]. Infine, vi sono limitazioni intrinseche relative al modello eterotopico.

In conclusione, pur con questi limiti, lo studio dimostra come la terapia di associazione di Sorafenib e Capecitabina non comporti un beneficio, in termini di riduzione della crescita tumorale, in un modello murino di HCC rispetto al solo Sorafenib.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210. Epub 2014 Oct 9.
- [2] Bruix J, Sherman M; American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011 Mar;53(3):1020-2. doi: 10.1002/hep.24199
- [3] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V et al. SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008 Jul 24;359(4):378-90. doi: 10.1056/NEJMoa0708857.
- [4] Cheng AL, Kang YK, Chen Z et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*. 2009 Jan;10(1):25-34. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70285-7. Epub 2008 Dec 16.
- [5] Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug;8(8):592-603. doi: 10.1038/nrc2442. Review.
- [6] Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*. 2009 Mar 3;15(3):220-31. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.027.
- [7] Shen YC, Lin ZZ, Hsu CH et al. Clinical trials in hepatocellular carcinoma: an update. *Liver Cancer*. 2013 Aug;2(3-4):345-64. doi: 10.1159/000343850. Review.

- [8] Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest*. 2000 Apr;105(8):1045-7.
- [9] 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*. 2005 Feb 10;23(5):939-52. Epub 2004 Nov 22.
- [10] Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jun;4(6):423-36. Review.
- [11] Torimura T, Iwamoto H, Nakamura T et al. Metronomic Chemotherapy: Possible Clinical Application in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Traslational Oncology* 2013; 6: 511-519.
- [12] Bocci G, Francia G, Man S et al. Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy. *PNAS* 2003; 100: 12917-12922.
- [13] Park ST, Jang JW, Kim GD et al. Beneficial effect of metronomic chemotherapy on tumor suppression and survival in a rat model of hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 65: 1029–1037.
- [14] Tang TC, Man S, Xu P et al. Development of a resistance-like phenotype to sorafenib by human hepatocellular carcinoma cells is reversible and can be delayed by metronomic UFT chemotherapy. *Neoplasia* 2010; 12: 928–940.

- [15] Zhou F, Hu J, Shao JH et al. Metronomic chemotherapy in combination with antiangiogenic treatment induces mosaic vascular reduction and tumor growth inhibition in hepatocellular carcinoma xenografts. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138, 1879–1890.
- [16] Jang JW, Park ST, Kwon JH et al. Suppression of hepatic tumor growth and metastasis by metronomic therapy in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med* 2011; 43: 305–312.
- [17] Hsu CH, Shen YC et al. Phase II study of combining Sorafenib with metronomic tegafur/uracil for advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2010; 53: 126-131.
- [18] Walko CM, Lindley C. Capecitabine: a review. *Clin Ther* 2005; 27: 23-44.
- [19] Ballardini P, Marri I, Margutti G et al. Long-lasting response with metronomic capecitabine in advanced hepatocellular carcinoma. *Tumori*. 2010;96(5):768-70.
- [20] Marinelli S, Granito A, Piscaglia F et al. Metronomic capecitabine in patients with hepatocellular carcinoma unresponsive to or ineligible for sorafenib treatment: Report of two cases. *Hepat Mon*. 2013;13(9):e11721.
- [21] Brandi G, de Rosa F, Agostini V et al. Metronomic capecitabine in advanced hepatocellular carcinoma patients: A phase II study. *The Oncologist* 2013; 18: 1256-1257.
- [22] Bellmunt J, Trigo JM, Calvo E et al. Activity of a multitarget chemo-switch regimen (sorafenib, gemcitabine, and metronomic capecitabine) in metastatic renal-cell carcinoma: a phase 2 study (SOGUG-02-06). *Lancet Oncol* 2010; 11: 350-357.



- [23] Kim C, Lee JL, Choi YH et al. Phase I dose-finding study of Sorafenib in combination with capecitabine and cisplatin as a first-line treatment in patients with advanced gastric cancer. *Invest New Drugs* 2012; 30: 306-315.
- [24] Baselga J, Segalla JGM, Rochè H et al. Sorafenib in combination with capecitabine: an oral regimen for patients with HER2-negative locally advanced or metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology* 2012; 30: 1484-1490.
- [25] Awada A, Gil T, Whenham N et al. Safety and pharmacokinetics of sorafenib combined with capecitabine in patients with advanced solid tumors: results of a phase I trial. *J Clin Pharmacol* 2011; 51: 1674-1684.
- [26] Infante JR, Jones SF, Bendell JC et al. A drug interaction study evaluating the pharmacokinetics and toxicity of sorafenib in combination with capecitabine. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; 69: 137-144.
- [27] Patt Y, Rojas-Hernandez C, Fekrazad M et al. Sorafenib and Capecitabine for hepatocellular carcinoma (HCC), a phase II trial. *Annals of oncology* 2013; 24 (4): iv38-iv121. Poster.
- [28] Wilhelm SM, Carter C, Tang L et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinase involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 7099-7109.
- [29] Ishikawa T, Utoh M, Sawada N et al. Tumor selective delivery of 5-fluorouracil by capecitabine, a new oral fluoropyrimidine carbamate, in human cancer xenografts *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 1091-1097.

- [30] Berruti A, Sperone P, Ferrero A et al. Phase II study of weekly paclitaxel and sorafenib as second/third line therapy in patients with adrenocortical carcinoma. *European Journal of Endocrinology* 2012; 166: 451-458.
- [31] Deng LF, Wang YH, Jia QA et al. Anti-proliferation effect of sorafenib in combination with 5-FU for hepatocellular carcinoma in vitro: antagonistic performance and mechanism. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2013; 21:845-849. Article in Chinese.
- [32] Deng LF, Ren Z, Jia Q et al. Schedule-dependent antitumor effects of 5-fluorouracil combined with sorafenib in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2013; 13: 363.
- [33] Farrag A. Efficacy and toxicity of metronomic Capecitabine in advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer Therapy* 2012; 3: 71-77.
- [34] Abdel-Rahman O, Abdel-Wahab M, Shaker M et al. Sorafenib versus Capecitabine in the management of advanced hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* 2013; 30: 655.
- [35] Doloff JC, Waxman DJ. VEGF receptor inhibitors block the ability of metronomically dosed cyclophosphamide to activate innate immunity-induced tumor regression. *Cancer Res* 2012; 72: 1103-1115.
- [36] Lencioni R, Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Seminars in Liver Disease* 2010; 30: 52-60.