



DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE
DIPARTIMENTO DI PATOLOGIA CHIRURGICA, MEDICA, MOLECOLARE E
DELL'AREA CRITICA
DIPARTIMENTO DI RICERCA TRASLAZIONALE E DELLE NUOVE TECNOLOGIE
IN MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea Specialistica in Medicina e Chirurgia

Monitoraggio terapeutico di Imatinib in pazienti
affetti da GIST: studio farmacocinetico e
confronto con tollerabilità ed efficacia

RELATORE

Chiar.mo Prof. Alfredo Falcone

CANDIDATO

Andrea Sbrana

Anno Accademico 2013/2014

INDICE

INDICE.....	2
RIASSUNTO.....	4
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE: I TUMORI STROMALI GASTRO-INTESTINALI (GIST).....	10
1.1 Epidemiologia.....	10
1.2 Anatomia Patologica.....	12
1.3 Biologia molecolare.....	13
1.4 Quadro clinico.....	15
1.5 Diagnostica strumentale.....	16
1.6 Diagnosi patologica e predizione del rischio.....	18
1.7 Trattamento.....	20
1.7.1 Micro-GIST.....	20
1.7.2 Malattia localizzata operabile.....	21
1.7.3 Malattia localmente avanzata o in sedi complesse.....	24
1.7.4 Malattia metastatica.....	24
1.8 Follow up.....	36
CAPITOLO 2 MONITORAGGIO TERAPEUTICO DI IMATINIB IN PAZIENTI AFFETTI DA GIST: STUDIO FARMACOCINETICO E CONFRONTO CON TOLLERABILITÀ ED EFFICACIA: PRESENTAZIONE DELLO STUDIO.....	37
2.1 Background.....	37
2.2 Razionale dello studio.....	39
2.3 Obiettivi ed endpoint dello studio.....	39
2.4 Materiali e metodi dello studio.....	40
2.4.1 Pazienti.....	40
2.4.2 Stima della numerosità del campione.....	40
2.4.3 Procedure.....	41
2.4.4 Analisi statistica e modelli matematici.....	46

CAPITOLO 3 RISULTATI PRELIMINARI DELLO STUDIO	48
3.1 Caratteristiche dei pazienti.....	48
3.2 Dati relativi alla farmacocinetica di Imatinib	52
3.3 Confronto tra farmacocinetica e caratteristiche dei pazienti.....	54
3.4 Confronto tra farmacocinetica e tollerabilità	56
3.4 Confronto tra farmacocinetica ed efficacia.....	61
CAPITOLO 4 CONCLUSIONI	63
CAPITOLO 5 DISCUSSIONE	66
BIBLIOGRAFIA	74

RIASSUNTO

I tumori stromali gastro-intestinali (GIST) sono tumori rari (meno dell'1% di tutte le neoplasie maligne), ma rappresentano i tumori mesenchimali più comuni del tratto gastroenterico. Si tratta di neoplasie originanti dalle cellule interstiziali di Cajal e caratterizzate da positività immunohistochimica per c-KIT (CD117). Da un punto di vista bio-molecolare tali tumori possono presentare mutazioni a carico di KIT o di PDGFRA, seppur esista una piccola quota parte di neoplasie *wild type* per tali geni e verosimilmente associate a mutazioni di altri geni.

I GIST sono in un 20% dei casi totalmente asintomatici e rilievo occasionale di indagini eseguite per altri motivi e un 10% delle diagnosi è effettuato in corso di autopsia *post mortem*. Il 70% dei GIST sono sintomatici, ma, comunque, spesso risultano associati a sintomatologia vaga ed aspecifica (es. fastidio addominale, nausea, vomito, senso di sazietà precoce, calo ponderale); talora, il quadro clinico è dovuto a sanguinamento della neoplasia o a localizzazione metastatica.

Il *gold standard* per la diagnosi di GIST è rappresentato dalla TC con m.d.c., ma anche l'ecoendoscopia (talora associata ad agobiopsia con ago sottile) e la PET costituiscono strumenti utili per l'inquadramento diagnostico. La biopsia è indispensabile laddove la chirurgia non costituisca il primo atto terapeutico.

La diagnosi di GIST deve trovare conferma istopatologica (su pezzo operatorio o su materiale da agobiopsia). L'anatomo-patologo deve corredare la conferma istologica ed immunohistochimica di GIST con alcune importanti informazioni, come la sede del tumore primitivo, le dimensioni della neoplasia e l'indice mitotico (espresso come numero di mitosi per 50 campi ad alto ingrandimento). Tali dati permettono la definizione della prognosi e del rischio di recidiva o ripresa di malattia (score prognostico secondo Miettinen).

Il trattamento dei GIST è di tipo multidisciplinare e dipende dallo stadio di malattia.

I micro-GIST (cioè tumori di dimensioni inferiori a 2 cm di diametro massimo) possono essere sottoposti a sorveglianza endoscopica a meno di comparsa di sintomatologia, la quale pone indicazione alla asportazione chirurgica (in alcuni casi anche per via endoscopica).

In caso di malattia localizzata e tecnicamente operabile la chirurgia rappresenta il trattamento di scelta ed essa deve mirare ad una resezione completa con margini liberi. L'atto chirurgico deve essere attento ed evitare in ogni modo la rottura della massa tumorale, evento che determina una prognosi peggiore.

Un trattamento medico adiuvante alla chirurgia è indicato in caso di alto rischio di recidiva o ripresa di malattia ed esso consiste nella terapia con Imatinib per 3 anni.

In caso di malattia localmente avanzata o in sedi complesse si ha indicazione alla citoreduzione con Imatinib (per circa 6-12 mesi), dopodiché il paziente deve essere indirizzato alla chirurgia radicale. A seguito dell'atto chirurgico è, infine, opportuno riprendere il trattamento medico con Imatinib (seppur la durata della terapia adiuvante non sia in questi casi totalmente condivisa).

In caso di malattia metastatica la terapia medica rappresenta il cardine terapeutico.

Esistono vari farmaci che hanno indicazione in questo *setting* di pazienti.

La prima linea di trattamento è data da Imatinib, inibitore dell'attività tirosin-chinasica di vari recettori cellulari (c-KIT, PDGFRA, BCR-ABL...), somministrato alla dose di 400 mg/die continuativamente. Il dosaggio deve essere di 800 mg/die in caso di mutazione dell'esone 9 di c-KIT. Tale trattamento determina un impressionante vantaggio in termini di tempo libero da progressione di malattia e sopravvivenza globale rispetto ai pazienti non trattati.

In caso di progressione di malattia vi è indicazione ad aumentare il dosaggio di Imatinib a 800 mg/die, qualora il paziente non sia già trattato con tale schedula.

Il farmaco di seconda scelta nei pazienti progrediti in corso di terapia con Imatinib a dosaggio pieno è rappresentato da Sunitinib, altro inibitore tirosin-chinasico ad azione prevalentemente anti-angiogenetica.

La terza linea di trattamento non è ancora ufficialmente codificata. In Italia Regorafenib, molecola ad azione inibitrice dell'attività tirosin-chinasica di molteplici recettori cellulari, non è ancora registrato per l'uso in questo *setting* di pazienti, per cui una valida opzione di trattamento è rappresentata dal riutilizzo (*rechallenge*) di Imatinib, ma anche altri inibitori tirosin-chinasici hanno dimostrato la loro efficacia nel rallentare la progressione di malattia in questi pazienti.

L'utilizzo di Imatinib ha rappresentato una svolta nella gestione medica dei pazienti affetti

da GIST in fase metastatica o ad alto rischio di malattia, ma alcuni aspetti del suo utilizzo devono essere ulteriormente indagati per migliorare il trattamento della malattia, aumentandone l'efficacia e riducendone gli effetti avversi.

In particolare, diversi studi hanno dimostrato che esiste una notevole variabilità farmacocinetica interindividuale, quantificabile intorno al 40-50%, e diversi sono i fattori che possono spiegare tale fenomeno (peso corporeo, conta granulocitaria, albuminemia, emoglobina plasmatica). A causa di questa importante variabilità farmacocinetica il monitoraggio terapeutico di Imatinib potrebbe rappresentare un'importante strategia per il miglioramento del suo utilizzo nella pratica clinica.

Il razionale dello studio è dato proprio dalla presenza di una forte variabilità farmacocinetica interindividuale. Infatti, è plausibile che in alcuni pazienti tale variabilità determini il raggiungimento di concentrazioni plasmatiche allo stato stazionario diverse, per cui l'esecuzione del monitoraggio terapeutico potrebbe permettere di identificare precocemente pazienti a maggior rischio di effetti collaterali e/o di risposta clinica obiettiva peggiore.

L'obiettivo dello studio è la valutazione delle caratteristiche farmacocinetiche di Imatinib e del suo metabolita Norimatinib in pazienti affetti da GIST e sottoposti ad un protocollo di monitoraggio terapeutico del farmaco. Gli obiettivi secondari sono l'identificazione di possibili marcatori predittivi di tollerabilità ed efficacia e l'elaborazione di strategie farmacologiche per la personalizzazione del trattamento.

I pazienti arruolati sono di entrambi i sessi, con età compresa tra 18 e 80 anni, diagnosi comprovata di GIST, malattia metastatica o ad alto rischio di ripresa o recidiva e trattamento con Imatinib in corso.

Lo studio prevede l'arruolamento dei pazienti nel corso di una regolare Visita di Controllo, durante la quale al paziente è spiegato il disegno dello studio con i suoi obiettivi. In tale occasione il paziente è sottoposto a prelievo ematico per l'esecuzione delle analisi farmacocinetiche, analogamente a quanto verrà fatto nelle successive visite di follow up.

Il materiale ematico è processato mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), la quale permette la determinazione delle concentrazioni puntuali del farmaco e dei suoi metaboliti nel plasma dei pazienti. L'analisi dei dati ottenuti mediante software e

modelli matematici che operano un confronto con dati di farmacocinetica di popolazione permette, infine, la stima della concentrazione del farmaco allo stato stazionario nel sangue dei pazienti analizzati.

Tali dati sono confrontati con le caratteristiche dei pazienti e con i dati di efficacia e tollerabilità del trattamento raccolti nel corso delle stesse visite di controllo.

Il nostro studio, tuttora in corso, ha finora arruolato 11 pazienti, di entrambi i sessi, con età variabile tra 49 e 78 anni, in buone o discrete condizioni generali (ECOG PS compreso tra 0 e 2). Tali pazienti sono affetti da GIST primitivo a sede variabile (stomaco, duodeno, digiuno e retto) ed hanno in parte malattia in fase metastatica (5 su 11) con secondarismi epatici e/o peritoneali ed in parte malattia radicalmente operata, ma ad elevato rischio di ripresa o recidiva (6 su 11). Sono caratterizzati da mutazioni attivanti il gene c-KIT (10 su 11, di cui 9 con mutazione a carico dell'esone 11 e 1 con mutazione a carico dell'esone 9) o PDGFRA (1 su 11). Per tali quadri di malattia sono, dunque, trattati con Imatinib a dosaggio variabile (8 a 400 mg/die, 2 a 800 mg/die ed 1 a 200 mg/die).

Tali pazienti sono stati sottoposti a monitoraggio terapeutico del farmaco in occasione della visita di arruolamento.

Le concentrazioni plasmatiche di Imatinib rilevate risultano variabili con un range di valori compresi tra 245 µg/L e 2678 µg/L ed una media pari a 2049,46 µg/L, mentre le concentrazioni plasmatiche del metabolita Norimatinib rientrano in un range compreso tra 127 µg/L e 812 µg/L con una media di concentrazione plasmatica pari a 341,55 µg/L.

L'analisi delle concentrazioni plasmatiche di Imatinib e Norimatinib rilevate nei singoli pazienti ha permesso di effettuare una stima della concentrazione minima raggiunta dal farmaco nel sangue. I valori di concentrazione minima oscillano da 0,24 mg/L e 2,84 mg/L con un valore medio di 1,395 mg/L.

Si è valutata la correlazione tra dosaggio assunto e concentrazione plasmatica minima allo stato stazionario raggiunta. Gli 8 pazienti che assumono Imatinib al dosaggio di 400 mg/die hanno una $C_{min,ss}$ media di 1,07 mg/L \pm 0,66 mg/L, mentre i 2 pazienti che assumono Imatinib al dosaggio di 800 mg/die hanno una $C_{min,ss}$ media di 2,44 mg/L \pm 0,57 mg/L.

Si è studiata la correlazione tra sesso e concentrazione plasmatica minima raggiunta. Gli individui di sesso maschile hanno una $C_{min,ss}$ media di 0,76 mg/L \pm 0,29 mg/L, mentre gli individui di sesso femminile hanno una $C_{min,ss}$ media di 1,73 mg/L \pm 0,87 mg/L.

Si è osservata la correlazione tra tossicità emerse in corso del trattamento e concentrazione plasmatica minima del farmaco allo stato stazionario.

Sono state riportate da alcuni pazienti delle tossicità di grado più elevato, in particolare due casi di astenia G2 ed un caso di astenia G3, un caso di sintomatologia diarroica di entità G2, due casi di anemizzazione di grado G2, due casi di edema periorbitale di grado G2 ed un caso di sindrome edemigena degli arti inferiori di grado G2.

I 4 pazienti che hanno sperimentato tossicità di grado superiore o uguale a G2 avevano in 3 casi su 4 concentrazioni plasmatiche minime superiori a 2,0 mg/L e in 1 solo caso concentrazioni plasmatiche inferiori a tale valori, mentre i pazienti con tossicità di grado G0 o G1 avevano in 7 casi su 7 concentrazioni plasmatiche minime inferiori a 2,0 mg/L. Il test al χ^2 operato sulla seguente distribuzione dà un risultato $\chi^2 = 7,219$. Considerando un grado di libertà, l'analisi statistica porta ad un valore $p = 0,0072$, il che è indicativo di una significatività statistica molto alta.

Si è, infine, operato un confronto tra efficacia del trattamento e concentrazioni plasmatiche minime. I 6 pazienti radicalmente operati e sottoposti a terapia adiuvante con Imatinib non sono andati incontro a recidiva e/o ripresa di malattia durante il trattamento. I cinque pazienti con malattia metastatica sono stati trattati per un periodo medio di 28,31 mesi (con un range variabile da 0,83 a 94,9 mesi). Le risposte obiettive evidenziate sono diverse: un caso di risposta completa, un caso di risposta parziale, un caso di stabilità di malattia e due casi di progressione di malattia.

Analizzando i dati emersi, possiamo trarre alcune conclusioni.

È emersa una correlazione lineare tra dosaggio di farmaco assunto e concentrazioni plasmatiche minime raggiunte. In particolare, i soggetti trattati con 800 mg/die hanno concentrazioni plasmatiche minime maggiori dei soggetti trattati con 400 mg/die ($2,44 \text{ mg/L} \pm 0,57 \text{ mg/L}$ vs $1,07 \text{ mg/L} \pm 0,66 \text{ mg/L}$).

Abbiamo notato che esiste una correlazione lineare tra sesso del paziente e concentrazione plasmatica minima del farmaco. In particolare, infatti, i soggetti di sesso femminile hanno una concentrazione plasmatica minima di Imatinib in media più alta dei soggetti di sesso maschile ($1,73 \text{ mg/L} \pm 0,86 \text{ mg/L}$ vs $0,76 \text{ mg/L} \pm 0,29 \text{ mg/L}$). Tale dato si correla ad un valore $p = 0,111$ e, dunque, ad una buona significatività statistica.

L'analisi dei dati finora ottenuti dallo studio ha permesso di evidenziare come la presenza di concentrazioni plasmatiche minime al di sotto dei 2 mg/L correli con una buona tolleranza al trattamento con riduzione della probabilità di insorgenza di effetti collaterali o

con comparsa di reazioni avverse di grado inferiore a G1. Possiamo, perciò, desumere con un certo grado di significatività statistica ($p = 0,0072$) che un livello di $C_{min,ss}$ pari a 2 mg/L possa rappresentare un cut-off per separare pazienti con buona o peggiore tolleranza al trattamento con Imatinib. Chiaramente l'esiguità del campione preso in analisi limita in parte la potenza statistica del dato, per cui è necessario proseguire in futuro gli studi per ottenere un più grande numero di dati e confermare ulteriormente il risultato emerso.

Per quanto riguarda la correlazione tra concentrazione plasmatica minima ed efficacia del farmaco, l'esiguo numero dei pazienti finora analizzati non permette di evidenziare una reale correlazione tra questi due parametri, per cui è fondamentale continuare la raccolta di nuovi pazienti ed ottenere un campione più ampio di casi.

In conclusione, nonostante Imatinib sia un farmaco caratterizzato da una generale buona tollerabilità ed esista una correlazione lineare tra dosaggio giornaliero assunto e concentrazione plasmatica minima, è presente una certa variabilità interindividuale nella farmacocinetica del farmaco e la comparsa di tossicità appare potenzialmente legata al raggiungimento di concentrazioni plasmatiche minime più elevate. Per questo motivo appare importante incentivare protocolli di monitoraggio terapeutico del farmaco nei pazienti affetti da GIST e trattati con Imatinib al fine di individuare in maniera precoce quei pazienti a maggior rischio di sviluppo di complicanze maggiori correlate al trattamento e mettere in atto le necessarie precauzioni di tipo clinico-terapeutico.

CAPITOLO 1
INTRODUZIONE:
I TUMORI STROMALI GASTRO-INTESTINALI (GIST)

1.1 EPIDEMIOLOGIA

I tumori stromali gastrointestinali (GIST) sono tumori rari: rappresentano, infatti, meno dell'1% di tutte le neoplasie maligne con un'incidenza media di 1,5/100.000/anno¹ (questo dato tiene di conto solo dei GIST clinicamente rilevanti, ma si ritiene che l'incidenza reale complessiva di questa patologia, considerando anche le forme subcliniche, sia più alta²). In Toscana, ad esempio, si contano circa 50-60 nuovi casi ogni anno.

Sono, tuttavia, i tumori mesenchimali più comuni del tratto gastroenterico.

Le sedi di insorgenza più tipiche in ordine decrescente di frequenza sono:

- stomaco (60%),
- piccolo intestino (30%),
- retto (5%),
- esofago (3%)

Rare sono le localizzazioni extra-intestinali (< 2%), come mesentere, omento e retroperitoneo³.

Non hanno una spiccata predilezione per uno dei due sessi, ma alcuni studi suggeriscono una leggera predominanza nel sesso maschile.

L'età media di insorgenza è intorno a 60-65 anni, seppur possano frequentemente riguardare anche altre età.

La prevalenza in età pediatrica è molto bassa. I GIST pediatrici rappresentano, tuttavia, un'entità clinica distinta dai GIST dell'età adulta, in quanto sono caratterizzati da maggior prevalenza nel sesso femminile, assenza di mutazioni tipiche dei geni c-KIT e PDGFRA, localizzazione gastrica multicentrica e possibili metastasi linfonodali⁴.

I GIST sono nella stragrande maggioranza dei casi neoplasie di tipo sporadico.

Tuttavia, diverse forme sindromiche ereditarie sono caratterizzate da una maggiore incidenza di GIST.

Tra queste ricordiamo:

- la sindrome di Carney, che si caratterizza per la comparsa di GIST gastrici, paragangliomi e condromi polmonari⁵,
- la neurofibromatosi di tipo 1 o sindrome di von Recklinghausen, che si associa alla possibile insorgenza di GIST *wild-type*, tipicamente localizzati a livello del piccolo intestino e spesso di tipo multicentrico⁶,
- la sindrome di Carney-Stratakis, che geneticamente è determinata da mutazioni del gene della subunità B dell'enzima succinato deidrogenasi (SDHB), ma anche della subunità C (SDHC) o D (SDHD), e clinicamente è caratterizzata dalla comparsa di GIST e paragangliomi^{7,8}.

In alcune famiglie sono state descritte mutazioni germinali di tipo autosomico dominante a livello dei geni di c-KIT e PDGFRA. Tali soggetti sviluppano con maggior frequenza GIST multipli, generalmente in età più precoce dei soggetti con malattia sporadica.

1.2 ANATOMIA PATOLOGICA^{9,10}

Attualmente si ritiene che i GIST originino dalle cellule interstiziali di Cajal, cellule deputate al controllo della peristalsi gastrointestinale.

L'aspetto macroscopico più tipico è quello di un tumore che protrude nel lume gastrointestinale, accrescendosi nel contesto del tessuto sottomucoso ricoperto da una mucosa assottigliata, o di una lesione esofitica che sporge sul versante sieroso della parete del tratto gastrointestinale.

La superficie di taglio è color ocra, la consistenza appare variabile da lievemente aumentata a morbida e spesso si osservano foci di emorragia.

Nei tumori più grandi possono essere presenti necrosi o cisti.

Da un punto di vista microscopico possiamo distinguere diverse varianti istologiche di GIST:

- tumori a cellule fusate (70%),
- tumori a cellule epitelioidi (20%),
- tumori a citologia mista (10%).

L'aspetto discriminativo anatomico-patologico è di tipo immunoistochimico. Infatti, le cellule costituenti i GIST esprimono in più del 95% dei casi l'antigene c-KIT o CD117 e questo aspetto permette la diagnosi differenziale rispetto agli altri tumori mesenchimali gastrointestinali. La positività per altri marker immunoistochimici è variabile: Bcl-2 (80%), CD34 (70%), actina muscolo-specifica (50%), actina del muscolo liscio (35%), S-100 (10%), desmina (5%).

Prima della scoperta dei caratteri antigenici tipici delle cellule dei GIST, tali tumori erano classificati come sarcomi di vario tipo e tale errore diagnostico è stato evidenziato da diversi studi retrospettivi. Uno studio svedese pubblicato nel 2005¹¹ ha riscontrato che il 60% dei tumori all'epoca analizzati e diagnosticati come GIST erano stati erroneamente diagnosticati come altri istotipi tumorali (leiomioma, leiomiosarcoma, leiomioblastoma ed altri istotipi).

1.3 BIOLOGIA MOLECOLARE

Da un punto di vista molecolare nel 75-80% dei casi i GIST si caratterizzano per la presenza di mutazioni attivanti il gene KIT (c-KIT).

KIT è una glicoproteina trans-membrana di 145 kDa che funge da recettore per SCF (*Stem Cell Factor*) e possiede attività di tipo tirosin-chinasico. Al legame di SCF con KIT, tale glicoproteina va incontro ad omo-dimerizzazione ed attivazione della funzione tirosin-chinasica con conseguente fosforilazione di una varietà di substrati molecolari intracellulari che fungono da effettori della trasduzione del segnale e determinano in ultima istanza proliferazione e differenziazione cellulare, nonché abolizione dell'apoptosi.

Più tipicamente il gene KIT nelle cellule dei GIST è mutato a livello dell'esone 11¹², che codifica per un dominio juxtamembranario intracellulare del recettore. Normalmente tale porzione recettoriale impedisce la dimerizzazione di KIT in assenza di SCF; la relativa mutazione, dunque, determina attivazione costitutiva dell'attività tirosin-chinasica di KIT.

Con frequenza inferiore può risultare mutato l'esone 9¹². In particolare tale evento è più tipico dei GIST del piccolo intestino. Questa mutazione determina, analogamente alla precedente, un'attivazione costitutiva della proteina tirosin-chinasica; d'altra parte, questo aspetto risulta clinicamente importante da conoscere, in quanto determina maggiore resistenza al trattamento con inibitori tirosin-chinasici.

Altre possibili mutazioni riscontrate nel gene KIT riguardano gli esoni 13, 14 e 17.

Più recentemente l'analisi genomica delle cellule di GIST con gene KIT non mutato ha evidenziato mutazioni a carico del gene dell'isoforma α del recettore per il fattore di crescita PDGF, *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGFRA)¹³.

Le mutazioni di tale gene riscontrate nei GIST sono tipicamente a carico degli esoni 12 e 18. Queste mutazioni determinano attivazione costitutiva del dominio tirosin-chinasico del recettore PDGFRA con conseguente promozione della differenziazione e della proliferazione cellulare, ma anche dell'attività di neo-angiogenesi.

Da un punto di vista clinico-terapeutico è interessante notare come la mutazione D842V dell'esone 18 del gene PDGFRA, come evidenziato anche da studi in vitro, si associ ad una resistenza intrinseca agli inibitori delle tirosin-chinasi comunemente usati nel trattamento dei GIST, come Imatinib e Sunitinib¹⁴.

Esiste, infine, una minoranza di GIST che risulta *wild type* sia per il gene KIT che per PDGFRA. Da un punto di vista biologico tali malattie hanno un andamento

tendenzialmente indolente, ma si associano ad una naturale resistenza ai trattamenti medici per i GIST comunemente utilizzati in ambito clinico.

Sono più frequentemente *wild type* per tali geni i GIST pediatrici e quelli associati a forme sindromiche.

In realtà, come ormai è noto da anni in ambito oncologico, i GIST *wild type* (come qualsiasi altra patologia oncologica) non sono chiaramente tali in senso assoluto, ma presentano verosimilmente mutazioni a carico di altri geni (in gran parte ancora non noti) che determinano la comparsa delle alterazioni biologiche tipiche delle cellule tumorali e costituiscono la base del processo di oncogenesi.

Studi molto recenti hanno individuato nei GIST *wild type* per KIT e PDGFRA mutazioni a carico di altri geni, in particolare a livello dei geni codificanti per le subunità dell'enzima succinato deidrogenasi e per la proteina intracellulare B-RAF^{15,16}.

1.4 QUADRO CLINICO¹⁷

Solo il 70% dei GIST è sintomatico.

Infatti, circa un 20% risulta clinicamente silente ed è diagnosticato in maniera accidentale nel corso di indagini strumentali (endoscopiche o radiologiche) condotte per altra ragione o di interventi chirurgici addominali, mentre un 10% delle diagnosi è effettuato nell'ambito di autopsie *post mortem*.

Le forme sintomatiche sono associate a sintomatologia vaga ed aspecifica.

Il sintomo più frequente (60-70%) è il fastidio addominale, più raramente un franco dolore a carico dell'addome (soprattutto nelle forme con emorragia intra- od extra lesionale). Altri sintomi riferiti dai pazienti comprendono nausea, vomito, senso di sazietà precoce e calo ponderale.

Esistono sintomi specifici per alcune sedi, come la disfagia per le neoplasie esofagee, la colestasi per le neoplasie periampollari e l'intussuscezione per le neoplasie del piccolo intestino.

Nel 30-40% dei casi la sintomatologia è legata al sanguinamento della neoplasia. Tale fenomeno può riguardare la cavità peritoneale, determinando l'insorgenza di quadri di addome acuto da emoperitoneo, ma può avvenire anche all'interno del lume gastrointestinale, causando ematemesi, melena od anemia. Meno frequentemente possono determinare emoretroperitoneo.

La sintomatologia può, infine, dipendere dalla presenza di metastasi, in particolare a carico del peritoneo, dell'omento, del mesentere e del fegato (molto raramente anche a livello polmonare ed osseo).

1.5 DIAGNOSTICA STRUMENTALE

Data la sintomatologia vaga e variegata la diagnosi iniziale di GIST può risultare molto ritardata nel tempo rispetto all'insorgenza della neoplasia.

La tomografia computerizzata (TC) dell'addome con mezzo di contrasto (m.d.c.) risulta attualmente il *gold standard* per la definizione diagnostica del GIST. Essa è utilizzata al fine di caratterizzare la lesione, valutarne l'estensione e l'eventuale presenza di metastasi nelle sedi più comuni. La TC con m.d.c. permette, inoltre, il successivo monitoraggio della risposta alla terapia e l'esecuzione dei controlli di *follow up* per la valutazione della recidiva di malattia^{18,19}.

Alle immagini TC i GIST appaiono come masse di tessuto molle ampie, ben definite, con caratteri di *enhancement* del mezzo di contrasto eterogenei. La densità basale della neoplasia è generalmente variabile e manifesta un aumento di segnale dopo l'iniezione di contrasto per via intravenosa. Vari gradi di necrosi possono essere frequentemente visualizzati all'interno della massa tumorale, soprattutto in tumori che rispondono al trattamento medico.

La valutazione TC della risposta alla terapia può essere effettuata secondo i criteri RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*), che si basano sulla valutazione del numero e delle dimensioni delle lesioni visualizzabili, o secondo i più recenti criteri di Choi, che tengono di conto anche delle variazioni di densità delle lesioni. Secondo diversi studi, l'utilizzo dei criteri di Choi ha dimostrato di essere superiore nella valutazione della risposta alla terapia^{20,21}.

L'ecoendoscopia (EUS, *Endoscopic Ultrasound*) viene talvolta utilizzata nella diagnosi di GIST. Permette di valutare la profondità di invasione della neoplasia; inoltre, risulta utile per ottenere un campione tissutale biptico.

L'efficacia dell'agobiopsia ad ago sottile (FNA, *Fine-Needle Agobiopsy*) guidata da EUS è stata evidenziata da diversi studi e la sua accuratezza si aggira intorno all'80-85%^{18,19}. Al momento attuale, dunque, la FNA con guida EUS deve essere considerata la procedura più sicura per ottenere un campione tissutale biptico per la diagnosi di GIST.

Non si dovrebbe ricorrere, invece, alla biopsia percutanea pre-operatoria a causa dell'alto rischio di rottura tumorale o insembramento.

I GIST sono tumori ad elevato SUV (*Standardized Uptake Value*) alle indagini PET (tomografia ad emissione di positroni) a causa dell'effetto delle tirosin-chinasi recettoriali sul *signaling* delle proteine trasportatrici del glucosio¹⁹.

La PET risulta pertanto utile nella rilevazione di piccole metastasi non visibili alla TC con m.d.c.³, nella differenziazione tra lesioni metabolicamente attive e tessuto tumorale necrotico o cicatriziale e nella diagnosi differenziale con lesioni benigne di aspetto TC simile.

Spesso variazioni nell'attività metabolica lesionale precedono le variazioni anatomiche visibili alla TC, per cui la PET è utilizzata nella valutazione, anche precoce, della risposta agli inibitori tirosin-chinasici. I criteri di valutazione della risposta alla terapia stilati dall'EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*) si basano su indagini PET^{3,19,20,22}.

1.6 DIAGNOSI PATOLOGICA E PREDIZIONE DEL RISCHIO

La biopsia pre-operatoria non è obbligatoria nel caso in cui il paziente venga sottoposto a chirurgia *d'emblée*.

D'altra parte, la biopsia diviene mandatoria prima dell'inizio della terapia medica con inibitori tirosin-chinasici in ambito pre-operatorio.

La FNA con guida EUS è da preferire alla biopsia percutanea, dal momento che riduce il rischio di emorragia tumorale e disseminazione neoplastica intra-addominale²³. Questa metodica è, infatti, praticamente esente da rischi, se praticata in ambiente esperto.

L'indicazione a tale esame deve essere stabilita da parte di gruppi interdisciplinari con esperienza nelle patologie neoplastiche dell'addome, valutando i rischi ed i benefici di tale approccio.

La diagnosi istopatologica di GIST dovrebbe includere:

- istologia ed immunoistochimica (conferma della diagnosi di GIST),
- dimensioni della neoplasia (in particolare, misura del diametro massimo della lesione primitiva),
- indice mitotico, espresso come numero di mitosi presenti in 50 campi microscopici ad alto ingrandimento (HPF, *High Power Field*),
- sede anatomica della lesione.

Tali elementi, infatti, rappresentano i principali fattori che permettono la definizione della prognosi e del rischio di recidiva e ripresa di malattia del paziente.

Il patologo, inoltre, in sede di valutazione del pezzo operatorio dovrebbe anche riportare l'eventuale rottura della capsula tumorale, evento che, indipendentemente dagli altri fattori, determina una prognosi molto sfavorevole e, dunque, un alto rischio di recidiva e ripresa di malattia.

Una classificazione di rischio ampiamente usata è quella definita dallo studio di Miettinen del 2006²⁴, la quale tiene di conto dei suddetti fattori e stratifica il rischio del paziente con GIST su cinque livelli di rischio (nessuno, molto basso, basso, intermedio ed alto), come mostrato nella sottostante tabella (*Tab.1: Score prognostico sec. Miettinen*).

<i>Dimensioni (cm)</i>	<i>Indice mitotico</i>	<i>Sede</i>			
		<i>Stomaco</i>	<i>Duodeno</i>	<i>Digiuno/ileo</i>	<i>Retto</i>
<2	< 5 / 50 <i>HPF</i>	0 Nessuno	0 Nessuno	0 Nessuno	0 Nessuno
2-5		1,9 Molto basso	4,3 Basso	8,3 Basso	8,5 Basso
5-10		3,6 Basso	24 Intermedio	Dati insuff	Dati insuff
> 10		12 Intermedio	52 Alto	34 Alto	57 Alto
<2	> 5 / 50 <i>HPF</i>	0 Nessuno	50 Alto	Dati insuff	54 Alto
2-5		16 Intermedio	73 Alto	50 Alto	52 Alto
5-10		55 Alto	85 Alto	Dati insuff	Dati insuff
> 10		86 Alto	90 Alto	86 Alto	71 Alto

(Tab. 1) *Score prognostico sec. Miettinen*

Più recentemente sono stati prodotti altri metodi di stratificazione del rischio, che risultano più complessi e, perciò, sono meno utilizzati e più difficilmente utilizzabili nella comune pratica clinica. Tali metodi si basano su nomogrammi²⁵ o vere e proprie mappe prognostiche²⁶, le quali considerano i precedenti fattori come variabili continue e permettono, dunque, una miglior definizione prognostica.

Non mancano già oggi dati a supporto di condotte terapeutiche individualizzate su base molecolare e questo sarà sempre più vero in futuro^{24,26}.

Per questo motivo è raccomandabile l'effettuazione dell'analisi mutazionale a complemento della diagnosi di GIST. Tale esame dovrebbe essere effettuato in centri di riferimento.

1.7 TRATTAMENTO

Come nella maggior parte delle patologie di natura neoplastica, anche nell'ambito della terapia dei GIST è auspicabile una pianificazione del trattamento di tipo multidisciplinare, in cui siano partecipi patologi, radiologi, chirurghi ed oncologi medici.

Data la rarità della patologia, inoltre, è preferibile che la gestione dei GIST e la presa in carico di tali pazienti avvenga in centri di riferimento per la terapia dei sarcomi e dei GIST e/o all'interno di reti operative che abbiano *expertise* multidisciplinare e trattino un elevato numero di pazienti con GIST ogni anno.

1.7.1 Micro-GIST

Sono definite micro-GIST quelle neoplasie che misurano meno di 2 cm nel loro diametro massimo.

Solitamente si tratta di reperti occasionali in corso di esami endoscopici.

Qualora tali lesioni risultino sintomatiche, l'escissione chirurgica radicale è raccomandata.

I micro-GIST asintomatici, invece, qualora le indagini eco-endoscopiche non evidenzino elementi suggestivi di malattia ad alto rischio, possono essere gestiti in maniera conservativa, intraprendendo sorveglianza endoscopica con intervalli di 6-12 mesi^{27,28,29}.

La resezione endoscopica di queste piccole neoplasie rimane, comunque, una valida alternativa terapeutica. Con il recente avvento di tecniche di resezione endoscopica, gli endoscopisti possono rimuovere lesioni interessanti la mucosa o la sottomucosa mediante resezioni mucosali endoscopiche (EMR, *Endoscopic Mucosal Resection*) con garanzie di radicalità e sicurezza oncologica.

La completa resezione di tumori sottoepiteliali di dimensioni maggiori di 2 cm o di quelli originantesi dalla tonaca muscolare propria rimane, invece, difficile con tecniche EMR^{30,31,32}.

Uno studio condotto su pazienti anziani e ad alto rischio operatorio ha dimostrato che la legatura EUS-guidata di piccole lesioni duodenali è un'opzione terapeutica sicura e valida³³.

1.7.2 Malattia localizzata operabile

1.7.2.1 Chirurgia

Di fronte ad una malattia localizzata e tecnicamente operabile l'intervento chirurgico è la scelta prioritaria nel trattamento dei GIST.

La chirurgia deve mirare ad una resezione completa della neoplasia con margini liberi^{18, 29,34}.

Di fronte ad un paziente che sia stato sottoposto a chirurgia ed il cui referto anatomico-patologico evidenzia la presenza di margini chirurgici microscopicamente infiltrati da neoplasia (resezione R1), un secondo intervento di radicalizzazione deve essere valutato alla luce della sua fattibilità e della necessità di ampie demolizioni (una chirurgia multiviscerale dovrebbe, infatti, essere evitata)³⁵.

Data la bassa incidenza di metastasi linfonodali, la linfadenectomia loco-regionale non è richiesta in sede di intervento chirurgico.

Soprattutto i GIST del retto, del duodeno e dell'esofago comportano problemi decisionali maggiori che devono coinvolgere necessariamente il paziente. In questi casi, pur in assenza di un'evidenza formale di efficacia per quanto riguarda l'*outcome* finale, si può proporre una citoriduzione pre-operatoria con Imatinib, perseguendo lo scopo di una chirurgia meno demolitiva.

L'intervento chirurgico deve essere condotto in maniera da rendere minimo il rischio di contaminazione peritoneale.

La rottura della massa con dispersione del suo contenuto, infatti, si associa ad una prognosi sfavorevole.

Per questo motivo si può considerare una terapia pre-operatoria nei casi in cui vi sia un rischio elevato di rottura intra-operatoria della massa tumorale, in quanto una risposta alla terapia medica pre-operatoria è in grado di limitare tale evento.

Inoltre, per lo stesso motivo la chirurgia laparoscopica deve essere evitata nei pazienti con neoplasie di grandi dimensioni.

1.7.2.2 Terapia adiuvante

Nonostante la chirurgia rappresenti il *gold standard* per il trattamento della malattia localizzata, essa non determina la guarigione ed il controllo di malattia nel 100% dei casi.

La resezione completa e radicale è possibile in circa l'85% dei pazienti con malattia loco-regionale e il 50% dei pazienti dopo resezione radicale sviluppa recidiva o ripresa di malattia, sia a livello loco-regionale che a distanza^{3,27,34,36,37}. Il tempo medio di progressione di malattia dopo resezione del tumore primitivo, in caso di malattia ad alto rischio, è di 2 anni.

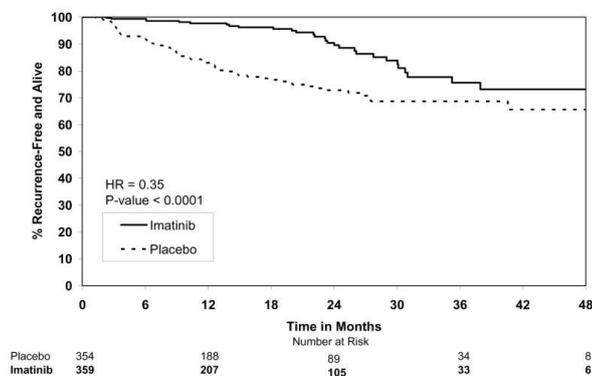
Per questi motivi risulta, dunque, logico pensare ad una terapia adiuvante alla chirurgia.

Sino ad ora sono stati condotti tre importanti studi^{37,38,39} sull'utilizzo di Imatinib nei pazienti sottoposti a chirurgia per GIST, di cui due più importanti e di maggior impatto.

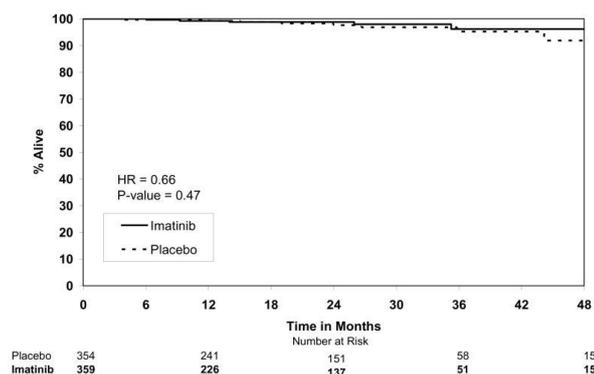
Lo studio presentato da DeMatteo nel 2009 poneva a confronto un trattamento adiuvante con Imatinib 400 mg/die (dosaggio mutuato dal *setting* metastatico) per un anno vs placebo. Lo studio ha dimostrato un vantaggio, in termini di sopravvivenza libera da recidiva, nei pazienti ad alto rischio trattati con Imatinib.

Molto importante è stato, inoltre, lo studio condotto dallo *Scandinavian Sarcoma Group* e presentato al congresso dell'ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) nel 2011.

Tale studio analizzava pazienti con diagnosi istologica di GIST confermata sul pezzo operatorio, i quali, secondo criteri di dimensione, indice mitotico o rottura tumorale, erano caratterizzati da una malattia ad elevato rischio di recidiva o ripresa. I pazienti erano randomizzati per ricevere terapia adiuvante post-chirurgica con Imatinib per 12 o 36 mesi. È stato dimostrato un vantaggio in termini di sopravvivenza libera da recidiva nei pazienti ad alto rischio di recidiva (*Fig. 1: Sopravvivenza libera da recidiva di malattia*), mentre non sono state evidenziate differenze significative in termini di sopravvivenza globale (*Fig. 2: Sopravvivenza globale*).



(Fig. 1) Sopravvivenza libera da recidiva di malattia



(Fig. 2) Sopravvivenza globale

L'analisi per sottogruppi ha evidenziato, però, che il beneficio in sopravvivenza libera da recidiva di malattia era maggiore in soggetti con tumori di dimensioni maggiori, dunque a più alto rischio.

Alla luce di tali studi, le principali linee guida (AIOM, ESMO, NCCN) raccomandano nei pazienti affetti da GIST ad alto od altissimo rischio di ricaduta la terapia con Imatinib protratta per almeno tre anni.

Nei pazienti affetti da GIST a rischio moderato di ricaduta la terapia adiuvante con Imatinib protratta per almeno tre anni può essere considerata, per cui deve essere discussa con il paziente tale possibilità di trattamento.

Sono, comunque, tuttora in corso degli studi volti a valutare l'efficacia di una terapia adiuvante più prolungata, come lo studio PERSIST (*Post-resection Evaluation of Recurrence-free Survival for GIST with adjuvant imatinib*), che pone a confronto una terapia adiuvante di 3 anni vs 5 anni, i cui dati sono al momento ancora in attesa di pubblicazione.

La terapia adiuvante con Imatinib deve essere considerata nei pazienti con mutazione sensibile a livello dei geni KIT o PDGFRA.

Il dosaggio convenzionale è di 400 mg/die, ma, mutuando i dati ottenuti dagli studi nei pazienti metastatici, vi è consenso nel ritenere che la mutazione in esone 9 di KIT sia meglio trattata con 800 mg/die⁴⁰.

Vi è altresì consenso nel non trattare i pazienti con mutazione D842V a livello dell'esone 18 del gene PDGFRA, in quanto non sensibile ad Imatinib⁴¹.

Non c'è, invece, consenso se trattare pazienti con GIST *wild type*. In questi casi si deve considerare che la sensibilità ad Imatinib è inferiore e che la storia naturale di queste forme è profondamente diversa dai casi con mutazioni ed è tendenzialmente più indolente, soprattutto nei casi di GIST sindromici. Le analisi per sottogruppi dei *trial* clinici sin ora disponibili sono troppo limitate nel fornire dati sufficienti su questo aspetto.

1.7.3 Malattia localmente avanzata o in sedi complesse

In caso di GIST localmente avanzato o non resecabile radicalmente *d'emblée*, vi è indicazione alla citoriduzione con Imatinib^{42,43,44}.

I GIST del retto o di altra sede anatomica critica, candidati a chirurgia demolitiva, possono anch'essi essere trattati con Imatinib a scopo citoriduttivo, programmando la chirurgia quando sia stata ottenuta una adeguata riduzione della massa.

L'esatta durata della terapia pre-operatoria non è ancora conosciuta. Nei pazienti in risposta, Imatinib è continuato fino al raggiungimento della massima risposta (definita come assenza di ulteriore miglioramento tra due TC consecutive). Questo avviene generalmente in 6-12 mesi. La chirurgia è, comunque, indicata quando la neoplasia appare ridotta al punto da permettere una chirurgia radicale senza significative comorbilità.

La terapia con Imatinib è intrapresa al dosaggio di 400 mg/die previa analisi mutazionale dei geni KIT e PDGFRA su materiale biotico. In caso di mutazione dell'esone 9 di KIT, analogamente agli altri *setting* di pazienti, il dosaggio è aumentato ad 800 mg/die.

Imatinib può essere interrotto in sicurezza 2-3 giorni prima della chirurgia e può essere ripreso appena il paziente si è rimesso dall'intervento. Generalmente, infatti, la terapia con Imatinib in questi pazienti è proseguita anche in regime adiuvante.

Non vi è, però, consenso sulla durata della terapia adiuvante in questi pazienti. Alcune Scuole considerano ottimale una terapia di 3 anni *in toto*, cioè sommando sia il periodo pre- che post-operatorio, mentre altre ritengono utile effettuare una terapia adiuvante per 3 interi anni dopo la chirurgia.

1.7.4 Malattia metastatica

Nella malattia metastatica la terapia medica è il trattamento di prima scelta; bisogna in questo *setting* di pazienti evitare interventi altamente demolitivi, che inoltre non

conducono a benefici sulla sopravvivenza globale del paziente.

1.7.4.1 Prima linea di trattamento: Imatinib

La prima linea di trattamento nella malattia avanzata o metastatica è rappresentata da un inibitore tirosin-chinasico, Imatinib (somministrato per via orale sotto forma di Imatinib mesilato, nome commerciale Glivec o Gleevec®, *Novartis*).

Imatinib è una piccola proteina di circa 5 kDa, che agisce come inibitore delle proteine tirosin-chinasiche potente e selettivo, in grado di bloccare in modo mirato e competitivo l'attività di tali proteine a livello dei recettori BCR-ABL, KIT, PDGFR α , ARG e c-FMS, come dimostrato da studi sia *in vivo* che *in vitro*.

Così facendo, impedisce la fosforilazione delle proteine responsabili della trasduzione del segnale e, dunque, interrompe i segnali di proliferazione e sopravvivenza della cellula tumorale.

In epoca pre-Imatinib, l'unica *chance* di trattamento era rappresentata da interventi demolitivi, che determinavano sopravvivenze mediane di 12-24 mesi.

Infatti, i GIST sono tumori sia chemio- che radioresistenti, per cui le possibilità di trattamento prima dell'avvento di Imatinib era molto limitate.

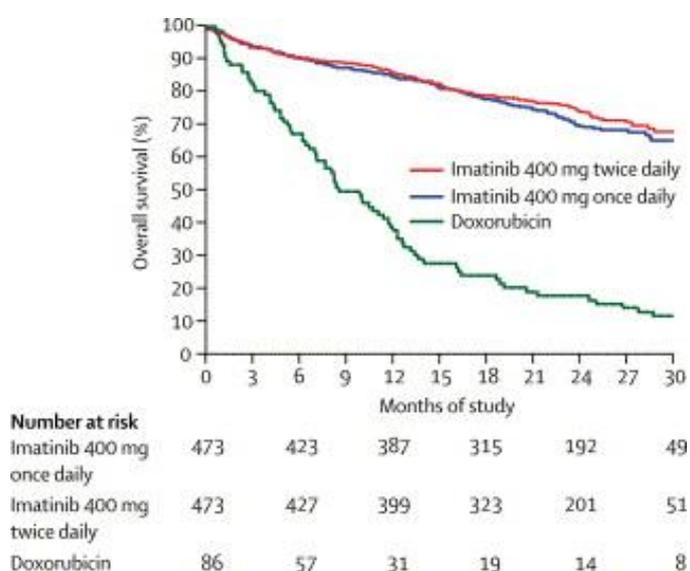
Il tasso di risposta alla chemioterapia antiblastica (che si avvaleva di terapie utilizzate in altre forme sarcomatose, come le antracicline) era molto basso e si aggirava intorno al 5%, in assenza di impatto sulla sopravvivenza globale dei pazienti.

L'uso della radioterapia poneva seri problemi a causa della sensibilità degli organi adiacenti e della resistenza intrinseca della patologia ed aveva un limitato utilizzo nei GIST del retto.

Per questi motivi si può affermare che Imatinib ha cambiato la storia naturale della malattia.

Le prime evidenze dell'attività di Imatinib risalgono ai primi anni Duemila, quando Joensuu pubblicò un *case report* sull'effetto di tale molecola in un paziente affetto da GIST metastatico⁴⁵. Tale soggetto, il cui quadro prima dell'inizio della terapia con Imatinib (allora noto ancora con la sigla STI-571) era compatibile con un impegno multiviscerale diffuso, andò incontro ad una riduzione fino alla quasi totale scomparsa delle sedi di ipercaptazione PET compatibili con malattia.

Il più importante studio che portò alla registrazione del farmaco per il trattamento del GIST metastatico fu condotto dal gruppo europeo-australiano e pubblicato su *Lancet* nel 2004⁴⁶. Tale studio ha valutato la risposta di 946 pazienti randomizzati a ricevere Imatinib alla dose di 400 mg una vs due volte al giorno. Tale studio non ha dimostrato una significativa differenza in termini di sopravvivenza globale tra i due bracci, ma, effettuando un'analisi di confronto con controlli tratti dal database EORTC e trattati con regimi di chemioterapia contenenti doxorubicina, ha evidenziato un vantaggio impressionante in termini di sopravvivenza globale in confronto a tali pazienti (*Fig. 3: Sopravvivenza globale dell'intera popolazione di studio*).



(Fig. 3) Sopravvivenza globale dell'intera popolazione di studio

Dagli studi di fase II e III è risultato che Imatinib è un farmaco generalmente ben tollerato, con la maggioranza degli eventi avversi di grado da lieve a moderato.

Questi ultimi includono più frequentemente:

- edema, soprattutto a livello della regione periorbitaria, più raramente a carico degli arti inferiori,
- reazioni cutanee (in particolare, eritemi e rash),
- astenia e facile affaticabilità,
- eventi gastrointestinali, come nausea e vomito, diarrea e dispepsia,
- eventi ematologici, in particolare anemia, meno frequentemente leucopenia con neutropenia,
- più raramente, dolore (cefalea, mialgia) ed incremento dei valori laboratoristici

degli indici di funzionalità epatica.

Tali eventi sono risultati più frequenti e tendenzialmente di grado più elevato nei pazienti trattati con dosaggi più elevati.

A seguito di tali studi, dunque, il trattamento con Imatinib mesilato alla dose di 400 mg/die è stato approvato dalle principali agenzie farmacologiche di regolazione a livello mondiale come la prima linea di trattamento dei pazienti affetti da GIST non resecabile e/o metastatico.

Il beneficio in tali pazienti è decisamente al di sopra dei risultati medi nell'ambito del trattamento oncologico. Von Mehren ha presentato all'ASCO 2011 i risultati del follow up a 9 anni del *trial* americano B2222, uno dei primi studi effettuati per valutare gli effetti di Imatinib nei pazienti con GIST avanzato e/o metastatico. Dopo 9 anni il 17,7% dei pazienti arruolati in tale studio era ancora in vita.

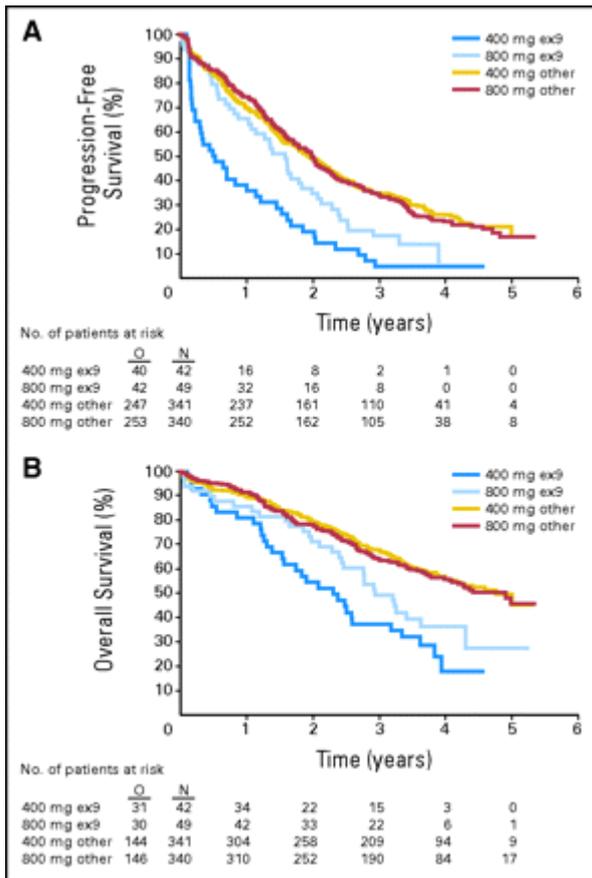
Nel 2010 sono stati pubblicati i risultati di una metanalisi dei principali studi condotti sino ad allora sul trattamento con Imatinib dei pazienti con GIST metastatico⁴⁷.

In tale ambito è stata eseguita anche un'analisi per sottogruppi, che teneva di conto di differenze di:

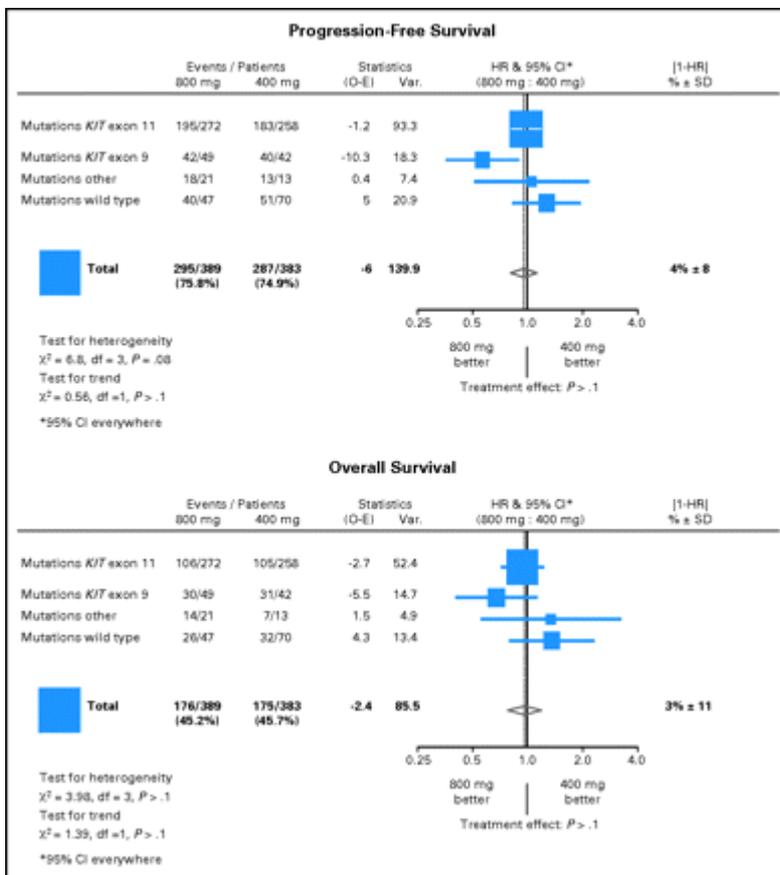
- sesso,
- età,
- *performance status*,
- sito del tumore primitivo,
- tempo dalla diagnosi,
- pregresse terapie,
- stato mutazionale.

Questo studio ha evidenziato un beneficio statisticamente significativo in termini di progressione libera da malattia, ma non di sopravvivenza globale, nei pazienti con mutazione dell'esone 9 di KIT trattati con Imatinib 800 mg/die (*Fig. 4: Sopravvivenza libera da progressione di malattia e sopravvivenza globale analizzata per sottogruppi in relazione alle diverse mutazioni del gene KIT e Fig. 5: Forest plot dei risultati del confronto tra dosi di trattamento in tutti i sottogruppi delle diverse mutazioni geniche*).

In tali pazienti, dunque, allo stato attuale la terapia con Imatinib è iniziata direttamente al dosaggio di 800 mg/die.



(Fig. 4) Sopravvivenza libera da progressione di malattia e sopravvivenza globale analizzata per sottogruppi in relazione alle diverse mutazioni del gene *KIT*.



(Fig. 5) Forest plot dei risultati del confronto tra dosi di trattamento in tutti i sottogruppi delle diverse mutazioni geniche

Il trattamento con Imatinib deve essere protratto indefinitamente fino a progressione di malattia o a tossicità, la quale comunque deve essere attentamente gestita nell'ambito di un trattamento cronico.

La necessità della prosecuzione del trattamento in maniera indefinita è supportata dal fatto che l'interruzione del trattamento è generalmente seguita da una progressione di malattia relativamente rapida in quasi la totalità dei casi, anche quando le lesioni siano state asportate chirurgicamente⁴⁸. Inoltre, l'interruzione del farmaco con sua successiva ripresa in seguito alla progressione di malattia ha evidenziato una bassa sopravvivenza libera da ripresa di malattia, verosimilmente per la comparsa secondaria di cloni resistenti al farmaco⁴⁹.

La risposta al trattamento con Imatinib determina una minima quota di remissioni complete di malattia (0-4%), mentre prevalgono le remissioni parziali o le risposte senza componente dimensionale, ma con risposta tissutale.

Complessivamente l'83,7% dei pazienti trae beneficio dal trattamento con Imatinib (andando, cioè, incontro a risposta completa, risposta parziale o stabilità di malattia).

La valutazione del quadro di malattia con la PET ripetuta poco dopo l'inizio della terapia permette di predire la sensibilità del GIST ad Imatinib.

In circa il 15% dei GIST esiste, infatti, una resistenza primaria ad Imatinib, che si manifesta come assenza di risposta e/o progressione di malattia sin dall'inizio del trattamento con il farmaco. Questa è legata fondamentalmente a caratteristiche genotipiche delle cellule tumorali, come la già citata mutazione D842V dell'esone 18 del gene PDGFRA.

1.7.4.2 Seconda linea di trattamento

Nel corso della terapia con Imatinib una certa quota di pazienti che inizialmente rispondono al trattamento va incontro a progressione di malattia, la quale è dovuta a comparsa di resistenza secondaria (o acquisita).

Tale resistenza è attribuibile alla comparsa di seconde mutazioni a carico del gene KIT, in particolare a livello degli esoni 13, 14 o 17. Tali mutazioni sono evidenziate nel 40-80% delle indagini biomolecolari effettuate su campioni tissutali di biopsie ottenute da pazienti in progressione sotto terapia con Imatinib.

Questo fenomeno insorge almeno 6 mesi dopo l'inizio del trattamento, ma avviene con un

tempo mediano di 18-24 mesi ed è più frequente nei pazienti con mutazioni primitive a carico dell'esone 11⁵⁰.

In caso di progressione di malattia, primitiva o secondaria, è utile comprendere in prima istanza la tipologia di progressione cui siamo di fronte.

Essa, infatti, può essere:

- intralasionale (ripresa di malattia in un'area isolata di una lesione),
- focale (evidenza di incremento dimensionale di una singola lesione),
- diffusa (aumento diffuso in numero e dimensioni di varie lesioni).

Di fronte ad una progressione limitata o focale di malattia, infatti, è possibile considerare l'opzione chirurgica di trattamento (con concomitante prosecuzione del trattamento con Imatinib), mentre in caso di progressione diffusa (che è statisticamente più frequente) è necessario operare delle modifiche alla terapia medica.

Inoltre, è opportuno escludere la "falsa progressione". Tale evento è dovuto al fatto che la risposta tissutale ad Imatinib può essere rappresentata da necrosi intralasionale: questo evento può determinare un incremento dimensionale della lesione ed essere falsamente confuso con un aumento del carico di malattia. In tale ambito, dunque, un'analisi mediante PET che valuti l'attività metabolica delle lesioni potrebbe risultare utile.

In caso di progressione franca di malattia, se il paziente è trattato con Imatinib al dosaggio di 400 mg/die, vi è consenso ad aumentare la dose fino a 800 mg/die.

Tale atteggiamento è giustificato da due studi principali, lo studio EORTC 62005⁵¹ e quello SWOG S0033⁵².

Entrambi gli studi hanno dimostrato che l'aumento della dose di Imatinib da 400 mg/die a 800 mg/die, al momento della progressione della malattia, è risultato tollerato e fornisce un beneficio clinico in circa un terzo dei pazienti.

In caso di paziente già in trattamento alla dose di 800 mg/die, intollerante a tale dosaggio od in ulteriore progressione con tale schedula di terapia, vi è indicazione a passare alla terapia con Sunitinib.

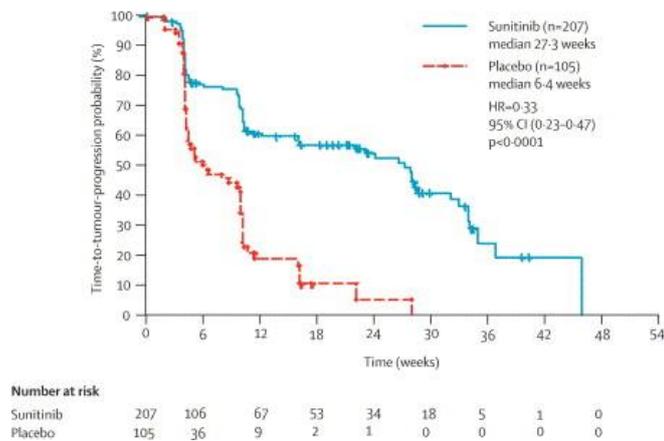
Sunitinib (somministrato per via orale sotto forma di sunitinib malato con il nome commerciale di *Sutent*®, Pfizer) è un inibitore tirosin-chinasico *multi-target* con azione sui

recettori KIT, PDGFR, VEGFR, RET e FLT3, il quale dunque va ad inibire la cascata di trasduzione del segnale a valle di tali recettori, esplicando un'azione prevalentemente rivolta contro l'angiogenesi tumorale.

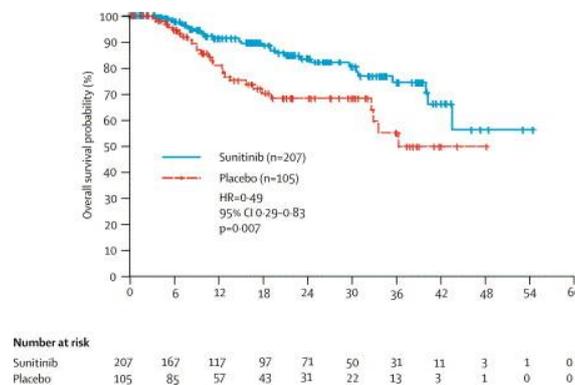
Tale farmaco è stato approvato come seconda linea di trattamento dei GIST avanzati e/o metastatici dopo fallimento di Imatinib a seguito dello studio condotto da Demetri e pubblicato su *Lancet* nel 2006⁵³.

Tale studio confrontava il trattamento con Sunitinib 50 mg/die con schedula *4 weeks on - 2 weeks off* vs placebo con stessa schedula in pazienti con GIST avanzato e/o metastatico progrediti od intolleranti ad Imatinib.

Il braccio trattato con Sunitinib ha ottenuto un vantaggio in termini di tempo alla progressione tumorale quattro volte superiore al braccio di controllo (27,3 vs 6,4 settimane), ma anche in termini di sopravvivenza globale (Fig. 6: *Tempo alla progressione tumorale* e Fig. 7: *Sopravvivenza globale*).



(Fig. 6) *Tempo alla progressione tumorale*



(Fig. 7) *Sopravvivenza globale*

Il 7% dei pazienti nel braccio di trattamento con Sunitinib è andato incontro a risposta parziale ed il 58% a stabilità di malattia, mentre solo il 19% è stato caratterizzato da progressione di malattia.

Per questo motivo, Sunitinib 50 mg/die con schedula *4 weeks on - 2 weeks off* è stato approvato come standard di trattamento in pazienti con GIST avanzato e/o metastatico dopo fallimento od intolleranza a terapia con Imatinib.

Il trattamento è generalmente ben tollerato.

I principali eventi avversi, evidenziati anche dal precedente studio, includono:

- stanchezza,
- diarrea,
- nausea e vomito,
- tossicità ematologiche, come anemia e neutropenia,
- dolore addominale,
- mucosite,
- anoressia,
- ipopigmentazione cutanea,
- sindrome mano-piedi,
- ipertensione arteriosa,
- cardiotoxicità,
- ipotiroidismo.

Diviene, dunque, importante provvedere ad un monitoraggio attento dei valori di pressione arteriosa e della frazione di eiezione del ventricolo sinistro.

Ogni 3-6 mesi è altresì opportuno il dosaggio dei livelli sierici di TSH.

La comparsa di tossicità in corso di terapia con Sunitinib può essere trattata con farmaci sintomatici (es. anti-ipertensivi, L-tiroxina) o, nel caso tali provvedimenti non permettano un controllo delle reazioni avverse, con modifiche della schedula di trattamento (in particolare, Sunitinib 37,5 mg/die continuativamente⁵⁴, ma anche altre schedule, come Sunitinib 50 mg/die *2 weeks on - 1 week off*), riduzione della dose totale o sospensione del farmaco (eventualmente temporanea con successiva ripresa).

1.7.4.3 Terza linea di trattamento

Ad oggi non esiste una terza linea codificata per il trattamento dei pazienti con GIST avanzato e/o metastatico progrediti al trattamento con Imatinib e Sunitinib.

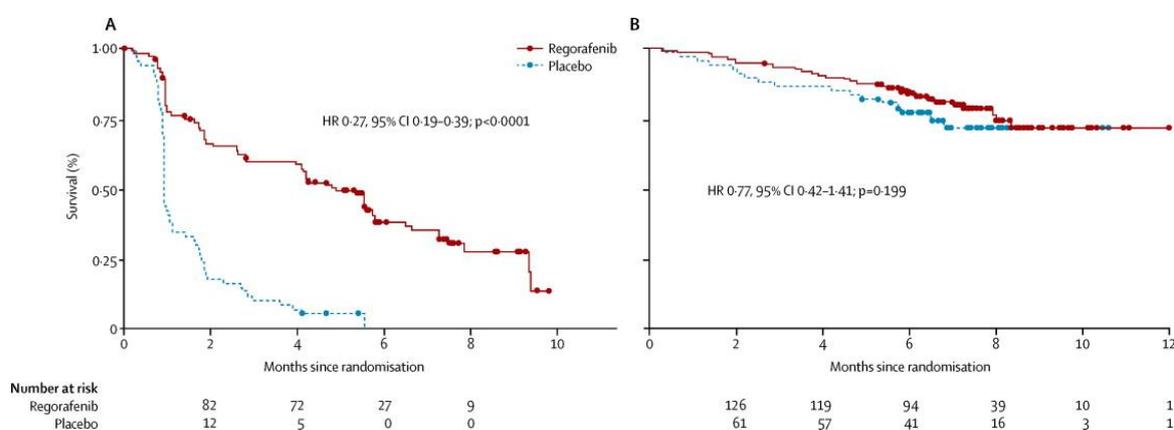
Regorafenib (nome commerciale *Stivarga*®, Bayer) ha dimostrato risultati incoraggianti in questo *setting* di pazienti.

Si tratta di un inibitore tirosin-chinasico *multi-target*, che agisce a livello di vari recettori, tra cui KIT, PDGFR e VEGFR2, esplicando, quindi, un'azione principalmente di tipo anti-angiogenetico.

Il principale studio sull'utilizzo di Regorafenib nei pazienti progrediti al trattamento con Imatinib e Sunitinib è stato presentato da Demetri all'ASCO nel 2012 e pubblicato su *Lancet* nel 2013⁵⁵.

Tale studio randomizzava i pazienti in due bracci e confrontava il trattamento con Regorafenib 160 mg/die 3 weeks on - 1 weeks off in associazione a *best supportive care* (BSC) vs placebo in associazione a BSC, con possibilità, in caso di progressione di malattia, di crossover dal braccio placebo al braccio Regorafenib.

Regorafenib ha dimostrato di fornire un vantaggio statisticamente significativo ai pazienti trattati in termini di sopravvivenza libera da progressione di malattia (4,8 vs 0,9 mesi, HR: 0,27, $p < 0,0001$), mentre, a causa della possibilità di crossover tra i due bracci, non è stato possibile evidenziare un vantaggio statisticamente significativo in termini di sopravvivenza globale (Fig. 8: *Sopravvivenza libera da progressione di malattia (A) e sopravvivenza globale (B)*).



(Fig. 8) *Sopravvivenza libera da progressione di malattia (A) e sopravvivenza globale (B)*

La maggior parte dei pazienti trattati con Regorafenib è andata incontro a stabilità di malattia (71,4%), mentre il 4,5% di questi soggetti ha addirittura avuto una risposta parziale.

Il trattamento con Regorafenib ha determinato una certa quota di tossicità.

Il 29% dei pazienti trattati vs il 21% dei pazienti non trattati ha avuto reazioni avverse severe. Dobbiamo, comunque, tener di conto del fatto che tali pazienti risultavano pre-trattati con almeno due linee di terapia prima dell'ingresso nello studio.

I principali effetti avversi sono stati:

- sindrome mano-piedi,
- ipertensione arteriosa,
- diarrea,
- affaticabilità,
- mucosite orale,
- alopecia,
- raucedine,
- anoressia,
- rash di tipo maculo-papulare,
- nausea,
- stipsi,
- mialgia,
- alterazioni della voce.

Generalmente tali reazioni avverse sono state gestibili con aggiustamenti della dose di Regorafenib e solo l'8% dei pazienti trattati con Regorafenib (8 pazienti su 132) ha dovuto interrompere definitivamente il farmaco.

A seguito di tale studio, l'FDA (*Food and Drug Administration*), ente di regolazione dei farmaci degli Stati Uniti, ha approvato l'uso di Regorafenib come terza linea di trattamento dei pazienti con GIST non resecabile e/o metastatico dopo fallimento o intolleranza del trattamento con Imatinib e Sunitinib.

In Europa ed in Italia, EMA ed AIFA non hanno ancora proceduto a tale delibera. Per questo motivo il trattamento con Regorafenib è possibile solo all'interno di studi clinici.

In attesa dell'approvazione del trattamento con Regorafenib, nei pazienti che non possono

accedere a studi clinici, è possibile ottenere un certo beneficio mediante il ritorno al trattamento con Imatinib (*rechallenge*) dopo Sunitinib, come evidenziato dai dati forniti dallo studio RIGHT presentato all'ASCO nel 2013⁵⁶.

Verosimilmente, infatti, il mantenimento di un trattamento con un inibitore tirosin-chinasico, anche in caso di progressione di malattia, piuttosto che la totale interruzione del trattamento, può rallentare tale progressione. Diversi studi hanno dimostrato un certo beneficio nei pazienti in progressione di malattia trattati anche con altri inibitori, come Sorafenib⁵⁷ e Nilotinib⁵⁸, rispetto a quei soggetti che interrompono totalmente il trattamento.

1.8 FOLLOW UP

Non esistono studi che indichino il percorso di follow up ottimale nei pazienti radicalmente operati con malattia localizzata.

Le ricadute più spesso riguardano il fegato e/o il peritoneo (altri possibili siti di metastasi, come lo scheletro, sono invece rari), per cui le indagini devono essere mirate allo studio di tali distretti anatomici.

La stratificazione del rischio secondo gli indici precedentemente esposti può essere utile per stabilire la cadenza dei controlli di follow up. I pazienti ad alto rischio hanno generalmente una ripresa di malattia entro 1-2 anni dal termine della terapia adiuvante, mentre i pazienti a basso rischio possono avere recidive più tardive, anche se questo avviene con una probabilità minore.

Solitamente i pazienti ad alto rischio sono sottoposti a TC o RM ogni 3-6 mesi per i 3 anni in cui sono trattati con terapia adiuvante, poi ogni 3 mesi nei 2 anni successivi al termine della terapia, infine ogni 6 mesi fino al quinto anno dal termine della terapia. Successivamente si tende ad eseguire TC o RM con cadenza annuale fino al decimo anno.

I pazienti a basso rischio possono, invece, essere seguiti in maniera più dilazionata nel tempo, ad esempio mediante TC o RM ogni 6-12 mesi per i primi 5 anni dalla chirurgia.

CAPITOLO 2

**MONITORAGGIO TERAPEUTICO DI IMATINIB IN PAZIENTI AFFETTI DA
GIST: STUDIO FARMACOCINETICO E CONFRONTO CON TOLLERABILITÀ
ED EFFICACIA**

PRESENTAZIONE DELLO STUDIO

2.1 BACKGROUND

L'utilizzo di Imatinib ha rappresentato una svolta epocale nel trattamento dei GIST, determinando un impressionante miglioramento della prognosi dei pazienti rispetto all'era precedente l'introduzione del farmaco nella pratica clinica.

Nonostante tale dato, risulta evidente che alcuni aspetti del suo impiego debbano essere maggiormente studiati per migliorare ulteriormente il trattamento dei pazienti nell'ottica di arrivare ad un trattamento sempre più personalizzato.

In particolare, negli studi di farmacocinetica di popolazione condotti sinora è stato dimostrato che Imatinib ha un'ampia variabilità farmacocinetica, le cui basi biologiche non sono ancora del tutto chiare.

Dopo somministrazione per via orale alla dose standard di 400 mg/die, il farmaco va incontro ad un rapido assorbimento con una biodisponibilità assoluta (frazione del farmaco somministrata che raggiunge la circolazione sistemica senza subire alcuna modificazione chimica) intorno al 98% (indipendentemente dall'assunzione in concomitanza con il cibo). A livello circolatorio il farmaco, data la sua struttura chimica lipofila, è legato alle proteine plasmatiche, in particolare albumina ed α 1-glicoproteina acida, per circa il 95%.

Ha un metabolismo prevalentemente epatico operato da diverse isoforme di enzimi citocromiali (CYP 3A4, 3A5, 2D6, 2C9 e 2C19), potendo dunque inibire il metabolismo di altri farmaci che interagiscono con tali isoforme enzimatiche. Imatinib viene metabolizzato a diverse molecole, tra cui Norimatinib (N-desmetil-imatinib), che ha dimostrato un'attività simile a quella del progenitore, ed altre molecole inattive.

Il farmaco ha un'emivita plasmatica terminale intorno a 16-18 ore. La sua eliminazione avviene prevalentemente per via biliare (rapporto escrezione fecale/urinaria intorno a 5:1) sotto forma di metaboliti, uno dei quali (CGP 74588) ha dimostrato attività simile a quella del farmaco originario.

A partire dallo studio B2222 si è, però, osservato che il profilo farmacocinetico del farmaco è caratterizzato da un'elevata variabilità interindividuale, quantificabile intorno al 40-50%. Diversi studi hanno successivamente cercato di definire i determinanti di tale variabilità^{59,60}.

I fattori che concorrono a determinare tale aspetto sono risultati diversi ed includono:

- peso corporeo,
- conta leucocitaria plasmatica (in particolare, conta granulocitaria),
- albuminemia,
- livelli di emoglobina plasmatica.

Negli studi di cui sopra, l'analisi retrospettiva delle concentrazioni plasmatiche minime di Imatinib nei pazienti ha dimostrato la presenza di un ampio range di valori (da 256 a 4.582 ng/mL), confermando dunque l'ampia variabilità cinetica.

Numerosi nuovi studi hanno in seguito concentrato l'attenzione su elementi di genetica cellulare e molecolare come possibili spiegazioni di tale fenomeno.

In particolare, sono stati condotti diversi studi sul possibile ruolo dei trasportatori transmembranari, come ABC-B1 e OCT1.

Tali proteine, infatti, hanno dimostrato già in studi *in vitro* un ruolo nell'ingresso e nell'estruzione di Imatinib dalle cellule tumorali di pazienti con leucemia mieloide cronica (CML)⁶¹. È ipotizzabile, dunque, che tali trasportatori influenzino la cinetica anche a livello sistemico, essendo ampiamente distribuiti ed espressi a livello della mucosa intestinale e del sistema epatobiliare, causando, rispettivamente, ridotto assorbimento e maggiore eliminazione per via biliare.

Tali studi trovano una notevole importanza per le possibili implicazioni in ambito di pratica clinica.

Infatti, è stata dimostrata la presenza di una soglia minima di concentrazione plasmatica di Imatinib, la quale è associata ad una maggiore probabilità di comparsa di tossicità, ma anche di risposta obiettiva al trattamento. In particolare, nel caso dei GIST, i pazienti che avevano concentrazioni plasmatiche superiori a 1.100 ng/mL (limite inferiore del range interquartile) mostravano una più alta percentuale di risposte obiettive, ma anche di effetti collaterali; d'altra parte, il 25% dei pazienti che mostravano concentrazioni plasmatiche inferiori al limite proposto erano suscettibili di ricevere un minor beneficio e di non

presentare reazioni avverse.

In conseguenza a tutto ciò, il monitoraggio terapeutico di Imatinib e del suo metabolita Norimatinib potrebbe rappresentare una strategia necessaria all'ottimizzazione della dose del farmaco da somministrare al paziente al fine di raggiungere il migliore risultato terapeutico a costo della minor tossicità possibile.

2.2 RAZIONALE DELLO STUDIO

La farmacocinetica di Imatinib è estremamente variabile tra i pazienti affetti da GIST e gran parte di questa variabilità rimane ancora non spiegata.

È plausibile che in alcuni pazienti le variazioni della cinetica siano così elevate da far sì che la somministrazione della dose standard (400 mg/die) sia associata al raggiungimento di concentrazioni plasmatiche allo stato stazionario più basse.

L'esecuzione sistematica del monitoraggio terapeutico del farmaco, dunque, potrebbe permettere di identificare in maniera precoce quei pazienti nei quali il trattamento farmacologico con Imatinib si associ ad una maggior probabilità di comparsa di reazioni avverse e/o ad una risposta clinica obiettiva peggiore.

2.3 OBIETTIVI ED ENDPOINT DELLO STUDIO

L'obiettivo principale dello studio è la valutazione delle caratteristiche farmacocinetiche di Imatinib (e del metabolita Norimatinib) in pazienti affetti da GIST e sottoposti ad un protocollo di monitoraggio terapeutico del farmaco.

Gli obiettivi secondari includono:

- identificazione di possibili marcatori predittivi di tollerabilità ed efficacia,
- elaborazione di strategie farmacologiche per la personalizzazione del trattamento.

Gli endpoint utilizzati sono:

- concentrazioni plasmatiche di Imatinib e Norimatinib nel plasma dei pazienti (a partire da almeno due settimane dopo l'inizio della somministrazione, nonché nei mesi seguenti di follow up),
- valutazione delle tossicità e dell'efficacia terapeutica indotte dal farmaco,

- elaborazione di modelli cinetico-dinamici e di algoritmi decisionali per l'ottimizzazione del trattamento farmacologico.

2.4 MATERIALI E METODI DELLO STUDIO

2.4.1 Pazienti

Nello studio sono arruolati pazienti affetti da GIST secondo i seguenti criteri di inclusione:

- entrambi i sessi,
- età compresa tra 18 ed 80 anni,
- comprovata diagnosi di GIST,
- malattia metastatica e/o non resecabile o malattia ad alto rischio sottoposta a chirurgia radicale e successivo trattamento adiuvante,
- trattamento in corso con Imatinib,
- in grado di fornire un consenso informato alla partecipazione allo studio.

Eventuali criteri di esclusione sono:

- età inferiore a 18 o superiore ad 80 anni,
- incapacità di fornire il consenso informato allo studio.

La perdita del paziente al successivo follow up oncologico non è criterio di esclusione, bensì di uscita dallo studio.

Parimenti non è da considerare un criterio di esclusione l'assunzione concomitante di altri farmaci, purché ne sia noto principio attivo, dose e periodo di somministrazione.

2.4.2 Stima della numerosità del campione

Lo studio richiede l'arruolamento di almeno 54 individui.

Tale numerosità è determinata da diversi elementi:

- la minor frequenza dell'allele raro dei polimorfismi genetici delle proteine verosimilmente implicate nelle differenze farmacocinetiche (0,3, allele T di ABC-B1),
- il rapporto tra gli individui omozigoti *wild type* ($0,7^2 = 0,49$) ed eterozigoti più omozigoti polimorfici ($2 \times 0,3 \times 0,7 + 0,3^2 = 0,51$) pari approssimativamente ad 1,
- è considerato un effetto significativo sulla cinetica del farmaco se la differenza nel

valore medio dei parametri farmacocinetici tra i due gruppi è almeno del 20%,

- la potenza dello studio è pari all'80%,
- l'errore α è posto a 0,05.

2.4.3 Procedure

Lo studio procederà secondo modalità e tempi espressi in tabella (*Tab.2: Procedure*).

	<i>Evento</i>	<i>Attività</i>	<i>Funzione</i>
1	Visita di Controllo	Presentazione del protocollo Espressione del consenso informato Attribuzione del codice alfanumerico Raccolta dati clinici (efficacia e tollerabilità) Prelievo ematico	Arruolamento Registrazione del consenso informato Identificazione del paziente e protezione della privacy Registrazione dati su CRF Raccolta per esecuzione del monitoraggio terapeutico
2	Analisi di laboratorio	Esecuzione del monitoraggio terapeutico	Misurazione delle concentrazioni ematiche di farmaci
3	Ogni successiva visita	Raccolta dati clinici Esecuzione del prelievo	Aggiornamento dati su CRF ed esecuzione monitoraggio terapeutico
4	Ogni successiva analisi di laboratorio	Esecuzione delle analisi di monitoraggio	Registrazione dei risultati su CRF
5	Analisi statistiche e matematiche	Esecuzione delle analisi statistiche e modellistica ad interim e finali	Valutazione dei possibili fattori di variabilità della cinetica dei farmaci
6	Report e pubblicazioni	Preparazione di report e pubblicazioni	Preparazione di relazioni scientifiche

(*Tab.2) Procedure*

2.4.3.1 Arruolamento

Alla prima visita utile lo studio viene presentato ai pazienti che soddisfano i criteri di

inclusione ed esclusione di cui sopra.

In tale occasione i pazienti sono informati riguardo a caratteristiche, obiettivi, endpoint e procedure dello studio, dopodiché esprimono il loro consenso informato alla partecipazione allo studio mediante sottoscrizione di apposito modulo.

I dati del paziente vengono, quindi, registrati ed il paziente viene identificato con un codice alfanumerico, cosicché sulla CRF non siano riportate in alcun modo informazioni che possano permettere il riconoscimento del paziente e ledere alla sua privacy. L'esatta corrispondenza tra nome e codice viene trascritta su un apposito elenco, che viene attentamente custodito.

In occasione della visita di arruolamento, infine, viene eseguito un prelievo ematico da una vena periferica del braccio per la successiva esecuzione del monitoraggio terapeutico del farmaco.

2.4.3.2 Follow up

Le visite di follow up seguono i criteri della comune pratica clinica, non interferendo in nessuno modo con il normale andamento di queste.

In occasione delle visite di controllo è possibile eseguire un prelievo ematico a fini di monitoraggio terapeutico secondo le procedure standard; inoltre, vengono annotati i dati clinici in riferimento all'efficacia e alla tollerabilità del trattamento.

2.4.3.3 Monitoraggio terapeutico

Il protocollo di monitoraggio terapeutico prevede l'esecuzione di un prelievo ematico da vena periferica di circa 4 mL raccolto in provetta sterile Vacutainer® contenente l'anticoagulante litio-eparina.

Si provvede a registrare l'ora dell'esecuzione del prelievo e l'ora dell'ultima somministrazione del farmaco.

Inoltre, il campione ematico deve essere accompagnato da alcune informazioni che permettano l'esatta successiva analisi; in particolare, è necessario valutare età, altezza, peso corporeo, valori di concentrazione plasmatica di albumina, α 1-glicoproteina acida, creatinina e transaminasi.

Il campione viene, infine, sottoposto ad analisi mediante cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC). Dal momento che tale procedura non è in alcun modo urgente, è possibile eventualmente centrifugare il campione e congelare il plasma risultante a -20 °C fino al momento di esecuzione delle analisi farmacocinetiche.

Dopo l'esecuzione del prelievo un'aliquota del farmaco è messa in una provetta eppendorf sterile e congelata a -80 °C fino al momento dell'esecuzione delle analisi farmacogenetiche.

2.4.3.4 Esecuzione delle misurazioni per il monitoraggio terapeutico

La misurazione della concentrazione plasmatica di Imatinib e Norimatinib viene condotta mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*).

La procedura si articola in due fasi distinte.

Inizialmente viene effettuata l'estrazione in fase solida selettiva, utilizzando un kit idoneo (Chromsystems®, Monaco, Germania). In particolare, si procede al condizionamento della colonnina di preparazione dei campioni (SPE, *Solid Phase Extraction*), immettendo in essa 1 mL di *Equilibration Buffer 1* e successivamente 1 mL di *Equilibration Buffer 2* e centrifugando dopo ciascuna aggiunta. Dopo aver condizionato la colonnina SPE, si immettono 100 µL di standard interno (*Internal Standard, IS*), 500 µL di *Extraction Buffer* e 500 µL del campione di plasma.

L'aggiunta di una quantità ben definita di IS sia al campione del paziente che ai controlli e allo standard di calibrazione è fondamentale, in quanto consente di mettere in evidenza e conseguentemente compensare ogni possibile causa di variabilità durante la preparazione.

A questo punto le colonne SPE sono centrifugate a 1090 giri/min per 1 minuto e, dopo aver controllato che siano completamente vuote, si elimina l'eluato.

Si procede a questo punto al lavaggio della colonnina SPE, immettendo in essa 1 mL di *Wash Buffer 1* e centrifugando per 1 minuto a 1090 giri/min.

Si aggiunge nella colonnina SPE 1 mL di acqua per HPLC e si centrifuga per 2 minuti a 1090 giri/min, infine l'eluato viene scartato.

Si procede, quindi, all'ultima fase di eluizione, cambiando la provetta di raccolta e immettendo nella colonnina SPE 400 µL di *Elution Buffer* e centrifugando a 1090 giri/min per 2 minuti. Si ottiene, così, nella provetta di raccolta l'analita di interesse di cui si deve determinare la concentrazione.

Questa prima fase di estrazione in fase solida selettiva è fondamentale, in quanto consente di eliminare gran parte di quei componenti della matrice biologica che giocano un ruolo fondamentale, in quanto modulano il rilascio del farmaco in vivo, ma che possono interferire con il dosaggio del principio attivo. Questa procedura, che viene effettuata per i

campioni di plasma, deve essere seguita anche per gli standard di calibrazione nel plasma e per i controlli nel plasma, dopo che questi sono stati ricostituiti pipettando 2 mL di acqua distillata nel flacone contenente il liofilizzato e attendendo 10-15 minuti a temperatura ambiente, agitando il flacone delicatamente e ripetutamente fino alla completa solubilizzazione del contenuto.

Lo standard di calibrazione nel plasma è necessario per la calibrazione del sistema HPLC, procedura che deve essere fatta per ciascun giorno di analisi, tracciando le curve di calibrazione. Per tracciare la curva di calibrazione sono necessari tre punti, ottenuti dalla determinazione della concentrazione di tre campioni contenenti lo standard di calibrazione diluiti serialmente con rapporto 1:2. In particolare, il primo campione della serie di diluizione contiene 500 µL di standard di calibrazione. Da esso sono prelevati 450 µL per ottenere la prima diluizione 1:2. A questi 450 µL sono aggiunti 450 µL di plasma bianco ottenendo 900 µL della diluizione 0,5. Per ottenere la diluizione 0,25, infine, si prelevano 300 µL della diluizione 0,5, cui si aggiungono 300 µL di plasma bianco. I tre campioni così ottenuti vengono analizzati insieme ai campioni plasmatici dei pazienti all'inizio della corsa per ottenere la curva di calibrazione.

Una volta ottenuto l'eluato, si può procedere alla seconda fase di analisi cromatografica, condotta su strumenti HPLC di tipo Waters Breeze® e Alliance® (Waters, USA).

L'HPLC è una tecnica di cromatografia liquida che permette di separare due o più composti presenti in un solvente, sfruttando l'equilibrio di affinità tra una fase stazionaria, posta all'interno della colonna cromatografica, e una fase mobile, che fluisce attraverso essa. Il tipo di eluizione utilizzata è definita isocratica, in quanto la composizione dell'eluente non varia durante l'analisi, a differenza di ciò che avviene nel caso di un'eluizione a gradiente, in cui la composizione dell'eluente varia durante l'analisi.

La rilevazione del composto in esame avviene sul detector all'uscita della colonna cromatografica mediante l'emissione di raggi UV e la misurazione dell'assorbanza, che è caratteristica per i diversi analiti. Considerando il fatto che gli analiti di interesse hanno diversi massimi di assorbimento (λ max), è necessario che il rivelatore commuti automaticamente la lunghezza d'onda a cui effettuare la lettura ai tempi programmati, in base al tempo di corsa (definito tempo di ritenzione) dei diversi analiti. In particolare, nel nostro caso, per rilevare l'assorbanza di Imatinib e Norimatinib, il rivelatore legge a 265 nm, mentre passa a 305 nm per leggere lo IS.

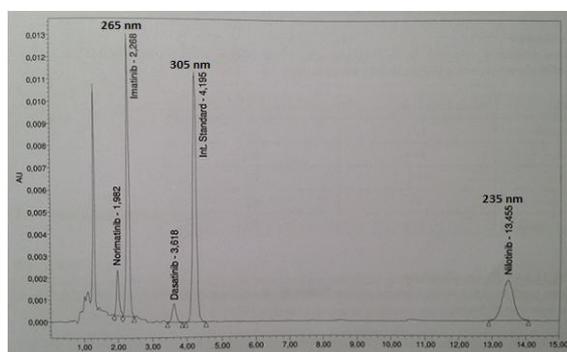
Prima di procedere all'analisi, è necessario inizializzare lo strumento mediante acqua

distillata ad un flusso di 7,5 mL/min per 2 min, poi con la fase mobile allo stesso flusso per altri 2 min. A questo punto si monta la colonna cromatografica per HPLC (HPLC Column, Chromsystems®, Monaco, Germania) e si procede al suo condizionamento con la fase mobile per 20 min ad un flusso di 0,5 mL/min.

Una volta che lo strumento è pronto per l'analisi, l'eluato ottenuto dalla fase di estrazione viene diluito con 200 µL di acqua per HPLC e mescolato brevemente mediante Vortex®. A questo punto, 100 µL del campione vengono inseriti nelle *vial* per HPLC e disposte nel carosello dello strumento. Una volta avviato lo strumento per HPLC, da ciascuna *vial* vengono iniettati nella colonna cromatografica 25 µL dell'eluato che corrono ad una velocità di flusso di 1,5 mL/min, impiegando circa 20 minuti per l'analisi di ciascun campione. Insieme a ciascuna serie di campioni è necessario immettere anche i controlli per verificare e documentare la precisione e l'accuratezza dell'analisi.

Al termine dell'analisi è necessario verificare che i valori determinati per i controlli corrispondano ai valori indicati dall'azienda.

Una volta terminata l'analisi con lo strumento per HPLC si ottiene un cromatogramma con dei picchi a diversi tempi di ritenzione corrispondenti agli analiti presenti nel campione. In particolare, i diversi analiti terminano la loro corsa nella colonna cromatografica, giungendo a livello del rilevatore UV nel seguente ordine: Norimatinib (tempo di ritenzione 1,9 min), Imatinib (2,1 min) ed IS (4,2 min), come rappresentato nel grafico sottostante (*Fig. 9: Cromatogramma degli analiti di interesse; Nota: il grafico è generico e contiene anche i picchi di altri due composti di tipo tirosin-chinasico, Dasatinib e Nilotinib, che non sono di interesse per questo studio*)



(*Fig. 9) Cromatogramma degli analiti di interesse (Nota: il grafico è generico e contiene anche i picchi di altri due composti di tipo tirosin-chinasico, Dasatinib e Nilotinib, che non sono di interesse per questo studio)*

Per calcolare la concentrazione plasmatica è necessario determinare l'area sottesa dai picchi degli analiti, calcolandone l'integrale e confrontando poi questo valore con quello ottenuto dalle curve di calibrazione standard del giorno in cui viene effettuata l'analisi.

2.4.3.5 Raccolta di dati di efficacia e tollerabilità

Si procede alla registrazione dei dati fisiopatologici e clinici di interesse, in particolare gli elementi utili alla valutazione dell'efficacia del trattamento, nonché l'eventuale resistenza al trattamento e la comparsa di effetti collaterali ad esso attribuibili.

Le eventuali reazioni avverse sono identificate e valutate secondo la scala CTCAE versione 4.03.

La valutazione di efficacia è basata sui criteri RECIST versione 1.1:

- risposta completa (CR, *Complete Response*): scomparsa di tutte le lesioni target; qualsiasi linfonodo patologico (target o non target) deve avere il diametro maggiore che si è ridotto ad una lunghezza inferiore a 10 mm;
- risposta parziale (PR, *Partial Response*): almeno una diminuzione del 30% nella somma dei diametri delle lesioni target rispetto alla somma dei diametri alla valutazione basale o precedente;
- progressione di malattia (PD, *Progressione of Disease*): almeno un aumento del 20% nella somma dei diametri delle lesioni target rispetto alla maggior riduzione ottenuta durante il trattamento o alla valutazione basale, se questa è la somma minore;
- malattia stabile (SD, *Stable Disease*): riduzione o aumento nella somma dei diametri insufficiente per definirsi PR o PD.

Tutti questi aspetti sono, infine, inseriti nella CRF con gli accorgimenti dovuti per la tutela della privacy dei pazienti.

2.4.4 Analisi statistica e modelli matematici

I risultati ottenuti sono analizzati in forma aggregata e vengono calcolati i valori dei parametri di dispersione (deviazione standard e range) e gli indici centrali (media e mediana).

I più comuni test statistici (es. ANOVA, test di Fisher) sono applicati sia per variabili

discrete che continue ed il livello di significatività statistica è posto a $p = 0,05$.

L'identificazione dei valori di cut off per parametri predittivi di efficacia/tollerabilità (es. concentrazioni plasmatiche) è perseguita con l'utilizzo di analisi ad hoc (es. analisi ROC, valutazione PPV/NPV).

I risultati ottenuti dalle analisi di monitoraggio terapeutico vengono impiegati per l'analisi farmacocinetica di popolazione con l'elaborazione di modelli matematici mediante software Monolix e NONMEM, includendo le informazioni cliniche ed i risultati degli esami di laboratorio di ciascun paziente. In particolare, l'inserimento dei valori di concentrazione plasmatica puntuale ottenuti dalle analisi farmacocinetiche assieme ad altri dati di interesse, come ad esempio il tempo intercorso dall'ultima somministrazione, il peso, l'altezza e la creatinemia, permette la stima ed il calcolo dei valori di concentrazione plasmatica minima allo stato stazionario nel singolo paziente.

In tale modo l'analisi farmacocinetica di popolazione potrebbe condurre all'individuazione di quelle variabili che influenzano le caratteristiche farmacocinetiche del farmaco, potendone anche quantificare l'effetto.

L'utilizzo di modelli matematici può essere impiegato per l'eventuale elaborazione di algoritmi e protocolli decisionali al fine di aggiustare la dose di farmaco in ciascun paziente.

CAPITOLO 3

RISULTATI PRELIMINARI DELLO STUDIO

Presentiamo ad oggi i dati preliminari ottenuti dalle analisi effettuate sui pazienti sino ad oggi inseriti nello studio, che è tuttora in corso.

3.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

Ad oggi sono stati inseriti 11 pazienti nello studio.

Si tratta di pazienti con caratteristiche generali e di malattia diverse (*Tab. 4: Caratteristiche dei pazienti*).

<i>Caratteristiche dei pazienti</i>	<i>Numero (n = 11)</i>	<i>% (100)</i>
Età		
• Mediana	69	
• Range	49-78	
Sesso		
• Maschi	5	45
• Femmine	6	55
ECOG Performance Status		
• 0	7	64
• 1	3	27
• 2	1	9
Sede del tumore primitivo		
• Stomaco	6	55
• Duodeno	2	18
• Digiuno	2	18
• Retto	1	9

Dimensioni del tumore primitivo		
• < 2 cm	0	0
• 2-5 cm	2	18
• 5-10 cm	3	27
• > 10 cm	5	45
• Non disponibile	1	9
Mitosi/HPF nel tumore primitivo		
• < 5	3	27
• > 5	7	64
• Non nota	1	9
Setting		
• Aduvante	6	55
• Metastatico	5	45
Sedi di metastasi		
• Fegato	3	60
• Fegato e Peritoneo	1	20
• NED post-chirurgia	1	20
Mutazioni di c-KIT		
• Esone 11	9	82
• Esone 9	1	9
• Non mutato	1	9
Mutazioni di PDGFRA		
• Mutato	1	9
• Non mutato	10	91
Dosaggio di Imatinib		
• 200 mg/die	1	9
• 400 mg/die	8	73
• 800 mg/die	2	18

(Tab. 4) Caratteristiche dei pazienti

Il campione in analisi include 11 soggetti di età mediana di 69 anni (con un range di 49-78 anni), di cui 5 individui di sesso maschile e 6 di sesso femminile.

Il *Performance Status* dei pazienti (valutato secondo i criteri ECOG, *Eastern Cooperative*

Oncology Group) è nella maggior parte dei casi buono (ECOG PS = 0 in 7 soggetti su 11) o discreto (ECOG PS = 1 in 3 soggetti su 11). Solo un soggetto si presentava in condizioni generali mediocri (ECOG PS = 2 in 1 soggetto su 11).

I pazienti arruolati risultano essere affetti da un GIST primitivo a sede variabile: in particolare, 6 soggetti sono affetti da tumore primitivo gastrico, 2 duodenale, 2 digiunale ed 1 rettale.

Le dimensioni del tumore primitivo, che rappresentano uno dei fattori prognostici principali, sono altresì variabili: 2 compresi tra 2 e 5 cm, 3 tra 5 e 10 cm, 5 superiori a 10 cm. Di un solo soggetto non è stato possibile individuare le dimensioni del tumore primitivo, essendo stata effettuata la chirurgia del primitivo e la successiva analisi anatomo-patologica presso un altro Centro.

L'analisi isto-patologica ha dimostrato in 3 casi tumori a basso indice mitotico (inferiore a 5 per campo microscopico ad alto ingrandimento), mentre 7 sono risultati ad alto indice mitotico (superiore a 5 per campo microscopico ad alto ingrandimento), dunque a peggiore prognosi. Analogamente a quanto suddetto, di un paziente non è stato possibile risalire a tale dato, in quanto è affetto al nostro Centro solo in fase successiva rispetto alla chirurgia del tumore primitivo.

Lo studio ha interessato sia pazienti sottoposti a chirurgia radicale e trattati con Imatinib a scopo adiuvante (6 pazienti su 11), sia pazienti con malattia non radicalmente operabile e/o metastatica (5 pazienti su 11).

Per quanto concerne i pazienti con malattia metastatica, le sedi principali di metastasi sono due: il fegato ed il peritoneo. In particolare, 4 pazienti su 5 presentano metastasi epatiche, mentre il peritoneo è interessato da malattia in un solo paziente, che ha anche sincrone metastasi epatiche. Un paziente di questi 5 non ha, invece, alcuna evidenza di malattia metastatica in sede, in quanto le metastasi peritoneali sono state radicalmente escisse in sede chirurgica.

Al fine di iniziare il trattamento, i preparati istologici sono stati analizzati alla ricerca delle mutazioni di c-KIT e PDGFRA. È stata evidenziata in un unico caso una mutazione a carico di PDGFRA, mentre tutti i restanti pazienti hanno evidenziato mutazioni del gene di c-KIT. Di questi, solo uno è risultato mutato a livello dell'esone 9, mentre i restanti 9 hanno mostrato la più comune mutazione a carico dell'esone 11.

Il trattamento con Imatinib è stato intrapreso a dosaggi differenti. 8 pazienti su 11 sono trattati con Imatinib alla dose standard di 400 mg/die, mentre 2 pazienti alla dose di 800 mg/die (uno di essi ha ricevuto tale dose in prima linea di trattamento, in quanto portatore di mutazione dell'esone 9 del gene di c-KIT, mentre l'altro è stato sottoposto a tale schedula di trattamento a seguito di progressione di malattia alla dose standard di 400 mg/die). Un paziente, al momento dell'inserimento nello studio e del prelievo ematico, stava ricevendo la dose di 200 mg/die, in quanto la comparsa di pregresse tossicità aveva imposto tale riduzione di dose.

3.2 DATI RELATIVI ALLA FARMACOCINETICA DI IMATINIB

A seguito dell'esecuzione di un prelievo ematico nei pazienti trattati, si è proceduto mediante le tecniche precedentemente descritte al dosaggio della concentrazione ematica di Imatinib e del metabolita Norimatinib.

Tenendo conto, poi, della concentrazione ematica del farmaco, operando un confronto tra la concentrazione rilevata nel singolo paziente, le variabili biologiche di cui sopra ed i dati di farmacocinetica di massa disponibili per il farmaco mediante i software già descritti, si è calcolata la concentrazione minima plasmatica del farmaco allo stato stazionario ($C_{min,ss}$).

La tabella mostra i risultati ottenuti (*Tab. 5: Concentrazione plasmatica puntuale e minima calcolata di Imatinib e Norimatinib*).

<i>Paziente</i>	<i>Sesso</i>	<i>Dosaggio di Imatinib mesilato (mg/die)</i>	<i>Concentrazione plasmatica di Imatinib ($\mu\text{g/L}$)</i>	<i>Concentrazione plasmatica di Norimatinib ($\mu\text{g/L}$)</i>	<i>$C_{min,ss}$ di Imatinib (mg/L)</i>
001	M	400	1892	247	0,26
002	F	400	245	177	0,24
003	F	400	2435	452	1,66
004	F	400	1507	209	1,49
005	M	400	2061	127	0,89
006	F	800	4192	127	2,84
007	F	800	2678	521	2,04
008	M	400	1229	206	0,87
009	M	200	1139	201	0,78
010	M	400	3029	812	1,01
011	F	400	2137	678	2,11
<i>Media</i>			2049,46	341,55	1,395

(*Tab. 5*) *Concentrazione plasmatica puntuale e minima calcolata di Imatinib e Norimatinib*

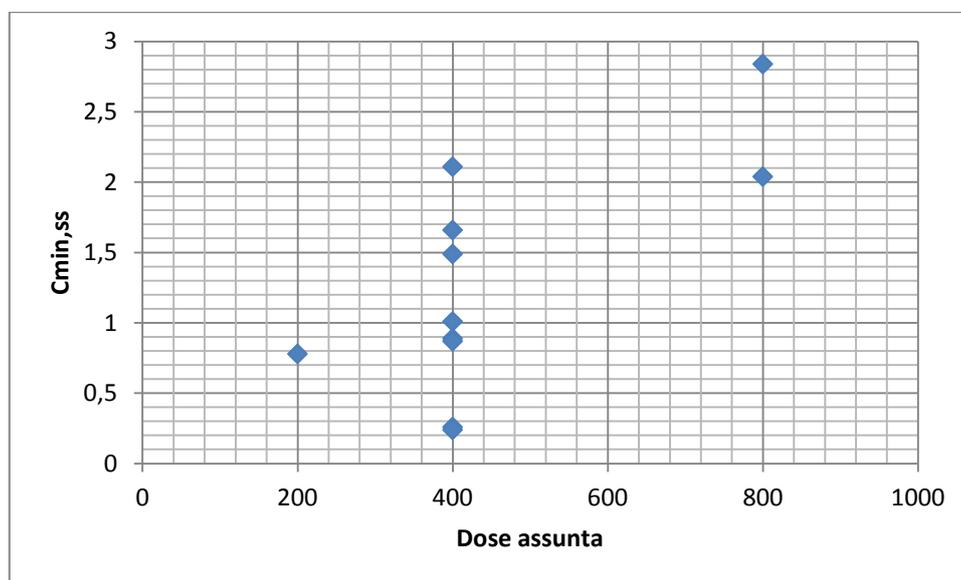
Le concentrazioni plasmatiche di Imatinib rilevate risultano variabili con un range di valori compresi tra 245 $\mu\text{g/L}$ e 2678 $\mu\text{g/L}$ ed una media pari a 2049,46 $\mu\text{g/L}$, mentre le

concentrazioni plasmatiche del metabolita Norimatinib rientrano in un range compreso tra 127 µg/L e 812 µg/L con una media di concentrazione plasmatica pari a 341,55 µg/L.

L'analisi delle concentrazioni plasmatiche di Imatinib e Norimatinib rilevate nei singoli pazienti ha permesso di effettuare una stima della concentrazione minima raggiunta dal farmaco nel sangue. I valori di concentrazione minima oscillano da 0,24 mg/L e 2,84 mg/L con un valore medio di 1,395 mg/L.

3.3 CONFRONTO TRA FARMACOCINETICA E CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

Alla luce dei dati ottenuti si è tentato di stabilire una correlazione lineare tra dosaggio di farmaco assunto e concentrazione plasmatica minima raggiunta (*Fig. 9: Correlazione tra dose di farmaco assunta e concentrazione plasmatica minima*).

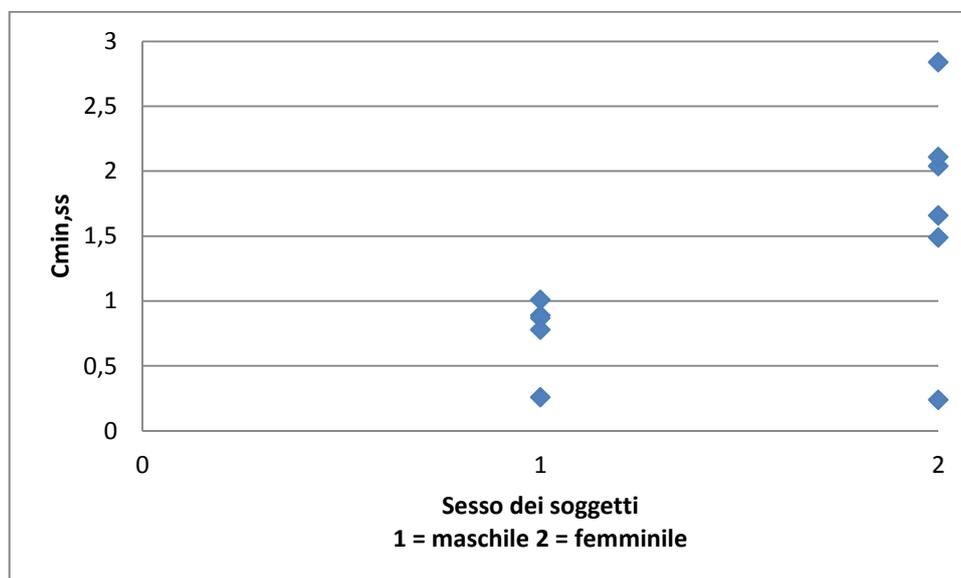


(Fig. 9) Correlazione tra dose di farmaco assunta e concentrazione plasmatica minima

Gli 8 pazienti che assumono Imatinib al dosaggio di 400 mg/die hanno una C_{min,ss} media di 1,07 mg/L \pm 0,66 mg/L, mentre i 2 pazienti che assumono Imatinib al dosaggio di 800 mg/die hanno una C_{min,ss} media di 2,44 mg/L \pm 0,57 mg/L.

Il coefficiente r^2 è pari a 0,4743.

Si è, inoltre, cercato di evidenziare una possibile differenza di genere nella farmacocinetica del farmaco (*Fig. 10: Correlazione tra genere e concentrazione plasmatica minima*).



(*Fig. 10*) Correlazione tra genere e concentrazione plasmatica minima

Gli individui di sesso maschile hanno una $C_{min,ss}$ media di $0,76 \text{ mg/L} \pm 0,29 \text{ mg/L}$, mentre gli individui di sesso femminile hanno una $C_{min,ss}$ media di $1,73 \text{ mg/L} \pm 0,87 \text{ mg/L}$.

Il coefficiente r^2 è pari a 0,3841. Tale dato si correla ad un valore $p = 0,111$ e, dunque, ad una buona significatività statistica.

3.4 CONFRONTO TRA FARMACOCINETICA E TOLLERABILITÀ

Al momento del prelievo ematico i pazienti sono stati sottoposti a Visita Oncologica e sono state registrate in Cartella Clinica le condizioni generali del singolo paziente.

I pazienti hanno lamentato diverse tossicità di vario grado ascrivibili al trattamento farmacologico ed assimilabili a quelle già note in letteratura.

Le tossicità emerse sono riportate in tabella (*Tab. 6: Tossicità riportate dai pazienti in trattamento*).

Paziente	Astenia	Nausea	Vomito	Diarrea	Anemia	Mucosite orale	Congiuntivite	Rash maculopannular	Edema periorbitale	Edemi arti inf.
001			G1						G1	
002	G1			G1					G1	
003	G1	G1		G1					G1	
004				G1					G1	G1
005										
006	G3				G2					G2
007	G2			G1					G2	G1
008									G1	
009	G1			G1			G1	G1		
010					G2					
011	G2	G1		G2	G1				G2	

(*Tab. 6*) Tossicità riportate dai pazienti in trattamento

Le tossicità sono state valutate secondo i criteri CTCAE (*Common Terminology Criteria for Adverse Events*), nella loro versione 4.03.

Secondo tale classificazione le reazioni avverse riportate dai pazienti dello studio sono così classificabili.

- Astenia:
 - o G1: astenia alleviata dal riposo;
 - o G2: astenia non alleviata dal riposo, limitazione delle attività quotidiane,

- non di cura della persona (*instrumental ADL*);
 - G3: astenia non alleviata dal riposo, limitazione delle attività quotidiane di cura della persona (*self care ADL*);
- Nausea:
 - G1: perdita di appetito senza alterazione delle abitudini alimentari;
 - G2: diminuzione dell'assunzione orale senza significativa perdita di peso, disidratazione o malnutrizione;
 - G3: inadeguato apporto calorico o di liquidi per os; indicate la nutrizione enterale o NPT o ospedalizzazione;
- Vomito:
 - G1: 1-2 episodi (separati da almeno 5 minuti) in 24 ore;
 - G2: 3-5 episodi (separati da almeno 5 minuti) in 24 ore;
 - G3: ≥ 6 episodi (separati da almeno 5 minuti) in 24 ore; indicate nutrizione enterale o NPT o ospedalizzazione;
 - G4: conseguenze potenzialmente fatali; è indicato un intervento urgente;
 - G5: decesso;
- Anemia:
 - G1: emoglobina compresa tra LIN e 10 g/dL,
 - G2: emoglobina compresa tra 10,0 e 8 g/dL,
 - G3: emoglobina compresa tra 8,0 e 6,5 g/dL,
 - G4: conseguenze potenzialmente fatali; è indicato un intervento urgente;
 - G5: decesso;
- Mucosite orale:
 - G1: asintomatica o lievi sintomi; intervento non indicato;
 - G2: dolore moderato, non interferisce con l'assunzione orale; indicato cambiamento nella dieta;
 - G3: dolore grave, interferisce con l'assunzione orale;
 - G4: conseguenze potenzialmente fatali; è indicato un intervento urgente;
 - G5: decesso;
- Congiuntivite:
 - G1: asintomatica o lievi sintomi; intervento non indicato;
 - G2: sintomatica; indicato intervento topico (es. antibiotici); limitazione delle attività quotidiane, non di cura della persona (*instrumental ADL*),
 - G3: limitazione delle attività quotidiane di cura della persona (*self care*

ADL);

- Rash maculo-papulare:
 - G1: macule/papule che ricoprono < 10% della superficie corporea con o senza sintomi (es. prurito, bruciore, senso di tensione);
 - G2: macule/papule che ricoprono 10-30 % della superficie corporea con o senza sintomi (es. prurito, bruciore, senso di tensione); limitazione delle attività quotidiane, non di cura della persona (*instrumental ADL*);
 - G3: macule/papule che ricoprono > 30% della superficie corporea con o senza sintomi (es. prurito, bruciore, senso di tensione); limitazione delle attività quotidiane di cura della persona (*self care ADL*);
- Edema periorbitale:
 - G1: soffice o non improntabile;
 - G2: indurito o improntabile; indicato intervento topico;
 - G3: edema associato a disturbi visivi; aumento della pressione intraoculare; glaucoma od emorragia retinica; neurite ottica; indicati diuretici ed intervento chirurgico;
- Edema degli arti:
 - G1: discrepanza del 5-10% tra gli arti valutati come volume o circonferenza al punto di maggiore differenza visibile; edema o mascheramento dell'architettura anatomica ad un'ispezione accurata;
 - G2: discrepanza del 10-30% tra gli arti valutati come volume o circonferenza al punto di maggiore differenza visibile; edema o mascheramento dell'architettura anatomica immediatamente evidente; obliterazione delle pieghe cutanee; apparente cambiamento del normale profilo anatomico; limitazione delle attività quotidiane, non di cura della persona (*instrumental ADL*);
 - G3: discrepanza > 30% tra gli arti valutati come volume o circonferenza al punto di maggiore differenza visibile; deviazione evidente del normale profilo anatomico; limitazione delle attività quotidiane di cura della persona (*self care ADL*).

Osservando i dati clinici raccolti, si conferma che Imatinib risulta essere un trattamento generalmente ben tollerato, essendo causa di reazioni avverse di entità lieve e facilmente ben gestibili dai pazienti e dai medici. Sono state, comunque, riportate da alcuni pazienti

delle tossicità di grado più alto, in particolare due casi di astenia G2 ed un caso di astenia G3, un caso di sintomatologia diarroica di entità G2, due casi di anemizzazione di grado G2, due casi di edema periorbitale di grado G2 ed un caso di sindrome edemigena degli arti inferiori di grado G2.

Si è tentato di valutare una correlazione tra le concentrazioni plasmatiche minime del farmaco e l'entità delle reazioni avverse al trattamento.

I risultati sono riportati nella sottostante tabella (*Tab. 7: Correlazione tra concentrazione plasmatica minima di Imatinib e tossicità; tabella estesa*).

Paziente	Cmin,ss (mg/L)	Grado massimo di tossicità
001	0,26	G1
002	0,24	G1
003	1,66	G1
004	1,49	G1
005	0,89	G0
006	2,84	G3
007	2,04	G2
008	0,87	G1
009	0,78	G1
010	1,01	G2
011	2,11	G2

(Tab. 7) Correlazione tra concentrazione plasmatica minima di Imatinib e tossicità; tabella estesa

Operando una semplificazione dei dati ed inserendo un cut-off di concentrazione plasmatica minima di 2 mg/L, possiamo ottenere la seguente tabella. (Tab. 8: *Correlazione tra concentrazione plasmatica minima di Imatinib e tossicità; tabella riassuntiva*)

	Tossicità (G2 o più)	Non tossicità (G0-1)
C _{min,ss} < 2,0 mg/L	1	7
C _{min,ss} > 2,0 mg/L	3	0

(Tab. 8) *Correlazione tra concentrazione plasmatica minima di Imatinib e tossicità; tabella riassuntiva*

Concentrazioni plasmatiche minime allo stato stazionario inferiori a 2,0 mg/L sono presenti in 8 pazienti su 11. Di questi, 7 su 8 non hanno sperimentato tossicità o hanno avuto tossicità di grado lieve, cioè pari al grado G1, mentre solo 1 paziente su 8 ha avuto tossicità di grado G2.

Di contro, la presenza di concentrazioni plasmatiche minime allo stato stazionario superiori a 2,0 mg/L sono state rilevate in 3 pazienti su 11. Tutti e 3 questi pazienti hanno sviluppato tossicità di grado più elevato, pari o superiore a G2.

Il test al χ^2 operato sulla seguente distribuzione dà un risultato $\chi^2 = 7,219$. Considerando un grado di libertà, l'analisi statistica porta ad un valore $p = 0,0072$, il che è indicativo di una significatività statistica molto alta.

3.4 CONFRONTO TRA FARMACOCINETICA ED EFFICACIA

Si è operato un confronto tra le concentrazioni plasmatiche minime del farmaco e la risposta obiettiva ottenuta nel corso del trattamento e valutata secondo i criteri RECIST (Tab. 9: *Correlazione tra concentrazione plasmatica minima di Imatinib e risposta obiettiva di malattia*).

Paziente	Cmin,ss (mg/L)	Risposta obiettiva
001	0,26	NED
002	0,24	NED
003	1,66	NED
004	1,49	NED
005	0,89	CR
006	2,84	PD
007	2,04	NED
008	0,87	NED
009	0,78	SD
010	1,01	PD
011	2,11	PR

(Tab. 9) *Correlazione tra concentrazione plasmatica minima di Imatinib e risposta obiettiva di malattia*

(NED: *Nessuna Evidenza di Malattia*; CR: *Risposta Completa*; PR: *Risposta Parziale*; SD: *Stabilità di malattia*; PD: *Progressione di malattia*)

I 6 pazienti radicalmente operati e sottoposti a terapia adiuvante con Imatinib non sono andati incontro a recidiva e/o ripresa di malattia durante il trattamento.

Analizzando più specificatamente i 5 pazienti con malattia metastatica osserviamo la seguente situazione (Tab. 10: ORR e PFS nei pazienti con malattia metastatica).

<i>Pz</i>	<i>Inizio terapia (data)</i>	<i>Fine terapia (data)</i>	<i>Durata terapia (mesi)</i>	<i>Dose (mg/dì)</i>	<i>Sedi di malattia</i>	<i>ORR</i>	<i>PFS (mesi)</i>	<i>Cmin,ss (mg/L)</i>
005	01.03. 2012	in corso	27,27	400	NED	CR	-	0,89
006	22.12. 2011	15.06. 2012	5,87	800	Fegato, Peritoneo	PD	3,03	2,84
009	19.09. 2011	10.10. 2012	12,70	200	Fegato	SD	12,43	0,78
010	02.01. 2012	26.01. 2012	0,83	400	Fegato	PD	0,83	1,01
011	03.01. 2005	30.11. 2012	94,9	400	Fegato	PR	94,57	2,11
<i>Media</i>			28,31				27,72	

(Tab. 10) ORR e PFS nei pazienti con malattia metastatica

I cinque pazienti con malattia metastatica sono stati trattati per un periodo medio di 28,31 mesi (con un range variabile da 0,83 a 94,9 mesi).

Le risposte obiettive evidenziate sono diverse: un caso di risposta completa, un caso di risposta parziale, un caso di stabilità di malattia e due casi di progressione di malattia.

Riguardo al paziente n. 010, è importante specificare che egli ha intrapreso il trattamento con Imatinib quando le sue condizioni di malattia e le sue comorbilità determinavano una prognosi decisamente negativa (si tratta, infatti, di un paziente con GIST gastrico già affetto da leucemia linfatica cronica e con sovrvertimento epatico da plurime metastasi compatibili in gran parte con localizzazione linfomatosa di malattia).

La sopravvivenza libera da progressione di malattia è risultata in media pari a 27,72 mesi (con un range variabile da 0,78 a 94,57 mesi).

CAPITOLO 4

CONCLUSIONI

Dagli studi registrativi e post-registrativi Imatinib risulta un farmaco di indiscutibile efficacia nel trattamento dei pazienti affetti da GIST radicalmente operati ed ad alto rischio di recidiva di malattia e nei pazienti con malattia metastatica.

Il suo utilizzo nei pazienti ad alto rischio di recidiva di malattia, infatti, comporta una sopravvivenza libera da recidiva di malattia maggiore rispetto ai pazienti non trattati ed il suo utilizzo nei pazienti metastatici determina un significativo miglioramento in termini sia di sopravvivenza libera da progressione di malattia che di sopravvivenza globale.

Il trattamento è generalmente ben tollerato e gravato generalmente da reazioni avverse di grado lieve.

Per questi motivi, dunque, Imatinib è da ritenere la terapia cardine del trattamento di questi pazienti.

Fermo restando quanto appena detto, il trattamento con Imatinib è diversamente tollerato e determina risposte obiettive diverse nei differenti pazienti che sono sottoposti a tale terapia e, come dimostrato da alcuni lavori presenti in letteratura, tali diverse risposte sembrano ascrivibili a variabili di ordine farmacocinetico.

Scopo di questa tesi è di valutare la presenza di una correlazione tra le concentrazioni plasmatiche minime del farmaco e la sua tolleranza ed efficacia nei pazienti trattati.

È, infatti, già noto da diverso tempo come per alcuni farmaci antitumorali e a bersaglio molecolare di impiego comune in campo oncologico, come il 5-fluorouracile e il Cetuximab, a concentrazioni plasmatiche minime di farmaco più elevate corrisponda una maggior incidenza di effetti collaterali, ma anche una maggior efficacia terapeutica. Si è, perciò, cercato di comprendere se tale relazione sia evidenziabile anche nel trattamento con Imatinib.

Infatti, pur essendo Imatinib un farmaco generalmente ben tollerato, riuscire ad individuare precocemente quei pazienti nei quali esso raggiunge concentrazioni plasmatiche minime più elevate può risultare utile per predire in maniera precoce la tollerabilità e l'efficacia del trattamento.

Abbiamo, perciò, analizzato 11 pazienti con GIST radicalmente operato e ad elevato rischio di recidiva o metastatico trattati con Imatinib. Tali pazienti sono stati sottoposti a prelievo ematico per dosaggio della concentrazione plasmatica del farmaco ed i dati ottenuti sono stati, poi, immessi in appositi software al fine di ottenere, mediante confronto con i dati di farmacocinetica di popolazione, le stime delle concentrazioni plasmatiche minime allo stato stazionario ($C_{min,ss}$) di Imatinib in tali pazienti.

I dati elaborati sono stati, infine, confrontati con le caratteristiche generali dei pazienti analizzati e la tollerabilità e l'efficacia del trattamento.

È emersa una correlazione lineare tra dosaggio di farmaco assunto e concentrazioni plasmatiche minime raggiunte. In particolare, i soggetti trattati con 800 mg/die hanno concentrazioni plasmatiche minime maggiori dei soggetti trattati con 400 mg/die ($2,44 \text{ mg/L} \pm 0,57 \text{ mg/L}$ vs $1,07 \text{ mg/L} \pm 0,66 \text{ mg/L}$).

Abbiamo notato che esiste una correlazione lineare tra sesso del paziente e concentrazione plasmatica minima del farmaco.

In particolare, infatti, i soggetti di sesso femminile hanno una concentrazione plasmatica minima di Imatinib in media più alta dei soggetti di sesso maschile ($1,73 \text{ mg/L} \pm 0,86 \text{ mg/L}$ vs $0,76 \text{ mg/L} \pm 0,29 \text{ mg/L}$). Tale dato si correla ad un valore $p = 0,111$ e, dunque, ad una buona significatività statistica.

L'analisi dei dati finora ottenuti dallo studio ha permesso di evidenziare come la presenza di concentrazioni plasmatiche minime al di sotto dei 2 mg/L correli con una buona tolleranza al trattamento con riduzione della probabilità di insorgenza di effetti collaterali o con comparsa di reazioni avverse di grado inferiore a G1.

In particolare negli 8 pazienti con $C_{min,ss} < 2 \text{ mg/L}$ si sono osservate quasi esclusivamente reazioni avverse di tipo G1 (3 casi di astenia G1, 1 caso di nausea G1, 1 caso di vomito G1, 4 casi di diarrea G1, 1 caso di congiuntivite G1, 1 caso di rash maculopapulare G1, 5 casi di edema periorbitale G1, 1 caso di edema agli arti inferiori G1) ed un solo caso di reazione avversa di grado G2 (anemia G2).

Nei 3 pazienti con $C_{min,ss} > 2 \text{ mg/L}$, invece, sono comparse anche reazioni avverse di grado più elevato (2 casi di astenia G2 ed 1 caso di astenia G3, 1 caso di diarrea G2, 1 caso di anemia G2, 2 casi di edema periorbitale G2 ed un caso di edema degli arti inferiori G2).

Possiamo, perciò, desumere con un certo grado di significatività statistica ($p = 0,0072$) che

un livello di $C_{min,ss}$ pari a 2 mg/L possa rappresentare un cut-off per separare pazienti con buona o peggiore tolleranza al trattamento con Imatinib.

Chiaramente l'esiguità del campione preso in analisi limita in parte la potenza statistica del dato, per cui è necessario proseguire in futuro gli studi per ottenere un più grande numero di dati e confermare ulteriormente il risultato emerso.

Per quanto riguarda la correlazione tra concentrazione plasmatica minima ed efficacia del farmaco, l'esiguo numero dei pazienti finora analizzati non permette di evidenziare una reale correlazione tra questi due parametri, per cui è fondamentale continuare la raccolta di nuovi pazienti ed ottenere un campione più ampio di casi.

In conclusione, nonostante Imatinib sia un farmaco caratterizzato da una generale buona tollerabilità ed esista una correlazione lineare tra dosaggio giornaliero assunto e concentrazione plasmatica minima, è presente una certa variabilità interindividuale nella farmacocinetica del farmaco e la comparsa di tossicità appare potenzialmente legata al raggiungimento di concentrazioni plasmatiche minime più elevate. Per questo motivo appare importante incentivare protocolli di monitoraggio terapeutico del farmaco nei pazienti affetti da GIST e trattati con Imatinib al fine di individuare in maniera precoce quei pazienti a maggior rischio di sviluppo di complicanze maggiori correlate al trattamento e mettere in atto le necessarie precauzioni di tipo clinico-terapeutico.

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE

I tumori stromali gastro-intestinali (GIST) sono tumori rari (meno dell'1% di tutte le neoplasie maligne) con un'incidenza media di 1,5 casi ogni 100.000 persone all'anno (in Toscana, ad esempio, si contano circa 50-60 nuovi casi ogni anno), ma rappresentano i tumori di istologia mesenchimale più comuni nel tratto gastroenterico. In questo distretto interessano nel 50% dei casi lo stomaco, nel 25% il piccolo intestino, nel 5% l'esofago e nel 5% il retto. Solo raramente interessano sedi extra-gastrointestinali.

La loro definizione istopatologica è definita dalla positività immunohistochemica per c-KIT (antigene CD117). Da un punto di vista bio-molecolare tali tumori possono presentare mutazioni a carico di KIT o di PDGFRA, seppur esista una piccola quota parte di neoplasie *wild type* per tali geni e verosimilmente associate a mutazioni di altri geni.

I GIST sono in un 20% dei casi totalmente asintomatici e rilievo occasionale di indagini eseguite per altri motivi e un 10% delle diagnosi è effettuato in corso di autopsia *post mortem*. Il 70% dei GIST sintomatici sono, comunque, spesso associati a sintomatologia vaga ed aspecifica (es. fastidio addominale, nausea, vomito, senso di sazietà precoce, calo ponderale); talora, il quadro clinico è dovuto a sanguinamento della neoplasia o a localizzazione metastatica.

Il *gold standard* per la diagnosi di GIST è rappresentato dalla TC con m.d.c., ma anche l'ecoendoscopia (talora associata ad agobiopsia ad ago sottile) e la PET costituiscono strumenti utili per l'inquadramento diagnostico. La biopsia è indispensabile laddove la chirurgia non costituisca il primo atto terapeutico.

La diagnosi di GIST deve trovare conferma istopatologica (su pezzo operatorio o su materiale da agobiopsia). L'anatomo-patologo deve corredare la conferma istologica ed immunohistochemica di GIST con alcune importanti informazioni, come la sede del tumore primitivo, le dimensioni della neoplasia e l'indice mitotico (espresso come numero di mitosi per 50 campi ad alto ingrandimento). Tali dati permettono la definizione della prognosi e del rischio di recidiva o ripresa di malattia (score prognostico secondo Miettinen).

L'approccio terapeutico al GIST è legato allo stadio di malattia e alle sue caratteristiche

intrinseche determinanti la prognosi (in particolare, sede, dimensioni e indice mitotico).

I micro-GIST (cioè tumori di dimensioni inferiori a 2 cm di diametro massimo) possono essere sottoposti a sorveglianza endoscopica a meno di comparsa di sintomatologia, la quale pone indicazione alla asportazione chirurgica (in alcuni casi anche per via endoscopica).

In caso di malattia localizzata e tecnicamente operabile la chirurgia rappresenta il trattamento di scelta ed essa deve mirare ad una resezione completa con margini liberi. L'atto chirurgico deve essere attento ed evitare in ogni modo la rottura della massa tumorale, evento che determina una prognosi peggiore.

Un trattamento medico adiuvante alla chirurgia è indicato in caso di alto rischio di recidiva o ripresa di malattia ed esso consiste nella terapia con Imatinib per 3 anni.

In caso di malattia localmente avanzata o in sedi complesse si ha indicazione alla citoriduzione con Imatinib (per circa 6-12 mesi), dopodiché il paziente deve essere indirizzato alla chirurgia radicale. A seguito dell'atto chirurgico è, infine, opportuno riprendere il trattamento medico con Imatinib (seppur la durata della terapia adiuvante non sia in questi casi totalmente condivisa).

In caso di malattia metastatica la terapia medica rappresenta il cardine terapeutico.

Esistono vari farmaci che hanno indicazione in questo *setting* di terapia.

La prima linea di trattamento è data da Imatinib, inibitore dell'attività tirosin-chinasica di vari recettori cellulari (c-KIT, PDGFRA, BCR-ABL...), somministrato alla dose di 400 mg/die continuativamente. Il dosaggio deve essere di 800 mg/die in caso di mutazione dell'esone 9 di c-KIT. Tale trattamento determina un impressionante vantaggio in termini di tempo libero da progressione di malattia e sopravvivenza globale rispetto ai pazienti non trattati.

In caso di progressione di malattia vi è indicazione ad aumentare il dosaggio di Imatinib a 800 mg/die, qualora il paziente non sia già trattato con tale schedula.

Il farmaco di seconda scelta nei pazienti progrediti in corso di terapia con Imatinib a dosaggio pieno è rappresentato da Sunitinib, altro inibitore tirosin-chinasico ad azione prevalentemente anti-angiogenetica.

La terza linea di trattamento non è ancora ufficialmente codificata. In Italia Regorafenib, molecola ad azione inibitrice dell'attività tirosin-chinasica di molteplici recettori cellulari, non è ancora registrato per l'uso in questo *setting* di pazienti, per cui una valida opzione di

trattamento è rappresentata dal riutilizzo (*rechallenge*) di Imatinib, ma anche altri inibitori tirosin-chinasici hanno dimostrato la loro efficacia nel rallentare la progressione di malattia in questi pazienti.

Imatinib, proteina ad azione inibitrice dell'attività tirosin-chinasica di molteplici recettori, tra cui KIT e PDGFRA, ha un ruolo centrale in questa patologia. Trova, infatti, indicazione nella terapia adiuvante post-operatoria della patologia ad alto rischio di recidiva, nella terapia neo-adiuvante in caso di malattia localmente avanzata o in sedi complesse e rappresenta la prima linea di trattamento della malattia metastatica.

Ha, dunque, rappresentato una svolta epocale nel trattamento dei GIST. Infatti, in epoca pre-Imatinib, i pazienti affetti da GIST avevano una prognosi pessima ed il trattamento classico con antracicline (tipicamente con adriamicina) portava ad una sopravvivenza media di 12-24 mesi. L'introduzione del farmaco nella pratica clinica, invece, ha rivoluzionato la prognosi di questi pazienti. Von Mehren ha presentato all'ASCO 2011 i risultati del follow up a 9 anni del *trial* americano B2222, uno dei primi studi effettuati per valutare gli effetti di Imatinib nei pazienti con GIST avanzato e/o metastatico. Dopo 9 anni il 17,7% dei pazienti arruolati in tale studio era ancora in vita.

Nonostante tali dati alcuni aspetti del farmaco devono essere ulteriormente studiati al fine di migliorare ancora il trattamento di tali pazienti, in particolare aumentandone l'efficacia e la tollerabilità.

Un aspetto interessante è fornito dalla farmacocinetica. Negli studi di farmacocinetica finora condotti si è evidenziata, infatti, un'ampia variabilità farmacocinetica del farmaco nei vari soggetti ed essa è verosimilmente alla base di differenze in termini di tollerabilità ed efficacia al trattamento.

Generalizzando, dopo la somministrazione della dose standard di 400 mg, Imatinib va incontro ad un rapido assorbimento con una biodisponibilità assoluta intorno al 98%. Circola legato alle proteine plasmatiche (in particolare, albumina e α 1-glicoproteina acida) data la struttura lipofila. Va incontro a metabolismo prettamente epatico, il quale determina la formazione di metaboliti, di cui uno attivo (Norimatinib), dopodiché è escreto principalmente per via fecale. Ha un'emivita plasmatica di circa 16-18 h.

Si è, però, notato che la variabilità interindividuale della farmacocinetica del farmaco è elevato e quantizzabile intorno al 40-50% e dagli studi sinora condotti essa è da ricollegare a diversi fattori, come peso corporeo, conta granulocitaria, albuminemia, emoglobina plasmatica).

Da qui il razionale dello studio. Essendo la farmacocinetica molto variabile nei diversi pazienti affetti da GIST, è plausibile che in alcuni pazienti le variazioni della cinetica siano così elevate da far sì che la somministrazione della dose standard si associ al raggiungimento di concentrazioni plasmatiche allo stato stazionario estremamente variabili, per cui l'esecuzione del monitoraggio terapeutico del farmaco (TDM) potrebbe permettere di identificare precocemente quei pazienti in cui il trattamento si associ ad una maggior probabilità di reazioni avverse o ad una risposta clinica peggiore.

L'obiettivo principale dello studio è, dunque, valutare le caratteristiche farmacocinetiche di Imatinib in pazienti affetti da GIST e sottoposti a TDM. Ad esso si aggiungono obiettivi secondari, quali identificare possibili marker predittivi di tollerabilità ed efficacia ed elaborare strategie farmacologiche per la personalizzazione del trattamento.

Gli endpoint utilizzati sono le concentrazioni plasmatiche di Imatinib e Norimatinib nel plasma dei pazienti, la valutazione della tossicità e dell'efficacia e l'elaborazione di modelli cinetico-dinamici e di algoritmi decisionali per l'ottimizzazione del trattamento farmacologico.

Nello studio possono essere inclusi pazienti di entrambi i sessi, con età compresa tra 18 e 80 anni, con comprovata diagnosi di GIST, malattia metastatica e/o non resecabile o malattia ad alto rischio di recidiva sottoposta a chirurgia radicale e successivo trattamento adiuvante, trattati attualmente con Imatinib.

Durante una Visita di Controllo di routine il paziente viene arruolato nello studio (che gli viene, dunque, attentamente esposto e descritto), vengono raccolti i dati clinici di interesse e viene eseguito un prelievo ematico per l'esecuzione delle analisi farmacocinetiche. Tali analisi sono basate sulla misurazione delle concentrazioni ematiche del farmaco e dei metaboliti mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni.

Durante le successive Visite di Controllo prosegue la raccolta dei dati clinici e l'esecuzione di eventuali ulteriori prelievi ematici per ulteriori analisi di laboratorio.

I dati ottenuti dalle analisi farmacocinetiche, in particolare le concentrazioni puntuali di Imatinib e Norimatinib, sono sottoposti ad analisi statistico-matematiche e mediante appositi software di confronto con la farmacocinetica di popolazione essi sono utilizzati per determinare le concentrazioni plasmatiche minime allo stato stazionario del farmaco. In particolare, tali software sono in grado di calcolare in base alla concentrazione puntuale

rilevata, al tempo trascorso dall'ultima somministrazione e ad alcune variabili biologiche del soggetto (es. peso corporeo, altezza, creatininemia) i valori minimali di concentrazione plasmatica del farmaco che si osservano in un determinato soggetto. I dati eventualmente ottenuti da possibili successivi prelievi ematici sono utilizzati per correggere la stima della concentrazione plasmatica minima allo stato stazionario.

In ultima istanza si procede all'analisi dei dati ottenuti, in particolare ponendo a confronto gli stessi con i dati di tollerabilità ed efficacia del farmaco.

Nello studio, che è tuttora in corso, sono stati finora arruolati 11 pazienti. La numerosità del campione è limitata, ma appare in linea con le dimensioni epidemiologiche della patologia GIST e permette comunque di trarre alcune interessanti conclusioni, che saranno chiaramente nuovamente verificate e confermate nel proseguo dello studio.

Si tratta di pazienti con età variabile tra 49 e 78 anni, di entrambi i sessi, in condizioni generali buone o discrete (ECOG PS compreso tra 0 e 2), affetti da GIST a sede primitiva variabile (stomaco, duodeno, digiuno, retto) e caratteristiche istopatologiche (dimensioni della neoplasia, indice mitotico) diverse. 5 pazienti sono affetti da malattia metastatica, con metastasi epatiche e/o peritoneali, mentre 6 pazienti sono trattati in regime adiuvante post-operatorio. I pazienti sono affetti da mutazioni attivanti KIT (10 su 11, di cui 9 a livello dell'esone 11 e 1 dell'esone 9) o PDGFRA (1 su 11). Ricevono Imatinib a dosaggio variabile (8 a 400 mg/die, 2 a 800 mg/die e 1 a 200 mg/die).

Osserviamo i dati emersi dal TDM di Imatinib nei pazienti arruolati.

Le concentrazioni plasmatiche di Imatinib rilevate risultano variabili con un range di valori compresi tra 245 µg/L e 2678 µg/L ed una media pari a 2049,46 µg/L, mentre le concentrazioni plasmatiche del metabolita Norimatinib rientrano in un range compreso tra 127 µg/L e 812 µg/L con una media di concentrazione plasmatica pari a 341,55 µg/L.

L'analisi delle concentrazioni plasmatiche di Imatinib e Norimatinib rilevate nei singoli pazienti ha permesso di effettuare una stima della concentrazione minima raggiunta dal farmaco nel sangue. I valori di concentrazione minima oscillano da 0,24 mg/L e 2,84 mg/L con un valore medio di 1,395 mg/L.

Si è tentato di stabilire la presenza di correlazione lineare tra dosaggio assunto e concentrazioni minime plasmatiche allo stato stazionario.

Gli 8 pazienti che assumono Imatinib al dosaggio di 400 mg/die hanno una C_{min,ss} media

di 1,07 mg/L \pm 0,66 mg/L, mentre i 2 pazienti che assumono Imatinib al dosaggio di 800 mg/die hanno una C_{min,ss} media di 2,44 mg/L \pm 0,57 mg/L. Il coefficiente r^2 è pari a 0,4743. I dati ci permettono, dunque, di concludere con buona significatività statistica che esiste correlazione lineare tra dosaggio assunto e concentrazione plasmatica minima allo stato stazionario.

Si è poi osservata la presenza di una differenza farmacocinetica di genere.

Gli individui di sesso maschile, infatti, hanno una C_{min,ss} media di 0,76 mg/L \pm 0,29 mg/L, mentre gli individui di sesso femminile hanno una C_{min,ss} media di 1,73 mg/L \pm 0,87 mg/L. Il coefficiente r^2 è pari a 0,3841 e si affianca ad un valore $p = 0,111$, per cui è lecito concludere che il sesso rappresenta un possibile elemento di variabilità farmacocinetica.

Si è valutato mediante Visita Clinica la presenza di eventuali tossicità correlabili al trattamento. Si conferma che Imatinib risulta essere un trattamento generalmente ben tollerato, essendo causa di reazioni avverse di entità lieve e facilmente ben gestibili dai pazienti e dai medici. Sono state, comunque, riportate da alcuni pazienti delle tossicità di grado più alto, in particolare 2 casi di astenia G2 ed un caso di astenia G3, un caso di sintomatologia diarroica di entità G2, due casi di anemizzazione di grado G2, due casi di edema periorbitale di grado G2 ed un caso di sindrome edemigena degli arti inferiori di grado G2.

Si è tentato di valutare una correlazione tra le concentrazioni plasmatiche minime del farmaco e la comparsa di reazioni avverse al trattamento.

Operando un cut-off di concentrazione di 2 mg/L, si osserva che i 3 pazienti con concentrazioni plasmatiche minime superiori a tale livello hanno sperimentato tossicità di grado pari o superiore a G2, mentre dei pazienti con concentrazioni plasmatiche inferiori a tale valore, solo 1 ha avuto tossicità di grado G2 ed i restanti 7 pazienti non hanno avuto tossicità o hanno avuto tossicità di grado G1. Analizzando tale distribuzione con il test del chi-quadro ($\chi^2 = 7,219$), considerando un grado di libertà, si ottiene un valore statistico $p = 0,0072$, che è indice di una significatività statistica molto elevata.

Si è, infine, tentato di stabilire una correlazione tra concentrazioni plasmatiche minime ed efficacia del trattamento.

Le risposte obiettive ottenute sono state molto variabili. Nei pazienti metastatici, infatti,

abbiamo osservato una progressione di malattia, una stabilità di malattia, una risposta parziale ed una risposta completa. I pazienti con malattia radicalmente operata risultano attualmente liberi da evidenza clinico-strumentale di malattia.

Tali dati non permettono allo stato attuale di trarre conclusioni definitive e necessitano di ulteriore studio.

Riassumendo i risultati, dunque, osserviamo alcuni punti interessanti.

Esiste una correlazione lineare tra dosaggio di farmaco assunto e concentrazioni plasmatiche minime raggiunte. Nella fattispecie, i soggetti trattati con 800 mg/die hanno concentrazioni plasmatiche minime in media maggiori rispetto a quelli trattati con 400 mg/die ($2,44 \text{ mg/L} \pm 0,57 \text{ mg/L}$ vs $1,07 \text{ mg/L} \pm 0,66 \text{ mg/L}$).

Si evidenzia una correlazione lineare tra sesso del paziente e concentrazione plasmatiche minime del farmaco (mediamente più alte nel sesso femminile rispetto a quello maschile): in particolare, i soggetti di sesso femminile raggiungono concentrazioni plasmatiche minime mediamente più alte di quelli di sesso maschile ($1,73 \text{ mg/L} \pm 0,86 \text{ mg/L}$ vs $0,76 \text{ mg/L} \pm 0,29 \text{ mg/L}$); il dato si associa ad un valore $p = 0,111$ e, dunque, ad una buona significatività statistica.

La presenza di concentrazioni plasmatiche minime al di sotto dei 2 mg/L correla con una buona tolleranza al trattamento con riduzione della probabilità di insorgenza di effetti collaterali o con comparsa di reazioni avverse di grado inferiore a G1. Possiamo, perciò, concludere che un livello di concentrazione minima allo stato stazionario pari a 2 mg/L rappresenta un cut-off per separare soggetti con buona o peggior tolleranza al trattamento con Imatinib.

Per quanto riguarda la correlazione tra concentrazione plasmatica minima ed efficacia del farmaco, l'esiguo numero dei pazienti finora analizzati non permette di evidenziare una reale correlazione tra questi due parametri, per cui è fondamentale continuare la raccolta di nuovi pazienti ed ottenere un campione più ampio di casi.

In conclusione, nonostante Imatinib sia un farmaco caratterizzato da una generale buona tollerabilità ed esista una correlazione lineare tra dosaggio giornaliero assunto e concentrazione plasmatica minima, è presente una certa variabilità interindividuale nella farmacocinetica del farmaco e la comparsa di tossicità appare potenzialmente legata al raggiungimento di concentrazioni plasmatiche minime più elevate. Per questo motivo appare importante incentivare protocolli di monitoraggio terapeutico del farmaco nei

pazienti affetti da GIST e trattati con Imatinib al fine di individuare in maniera precoce quei pazienti a maggior rischio di sviluppo di complicanze maggiori correlate al trattamento e mettere in atto le necessarie precauzioni di tipo clinico-terapeutico.

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Gatta G, van der Zwan JM, Casali PG et al. *Rare cancers are not so rare: the rare cancer burden in Europe*, Eur J Cancer 2011; 47(17): 2493-2511
 - ² Goettsch WG, Bos SD, Breekveldt-Postma N, Casparie M, Herings RM, Hogendoorn PC *Incidence of gastrointestinal stromal tumours is underestimated: results of a nation-wide study*, Eur J Cancer 2005; 41: 2868-2872
 - ³ Beham AW, Schaefer IM, Schüler P, Cameron S, Ghadimi BM *Gastrointestinal stromal tumors*, Int J Colorectal Dis 2012; 27: 689-700
 - ⁴ Pappo AS, Janeway KA, *Pediatric gastrointestinal stromal tumors*, Haematol Oncol Clin North Am 2009; 23(1): 15-34
 - ⁵ Zhang L, Smyrk TC, Young WF Jr et al. *Gastric stromal tumors in Carney triad are different clinically, pathologically, and behaviorally from sporadic gastric gastrointestinal stromal tumors: findings in 104 cases*, Am J Surg Pathol 2010; 34(1): 53-64
 - ⁶ Miettinen M, Fetsch JF, Sobin LH et al. *Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases*, Am J Surg Pathol 2006; 30(1): 90-96
 - ⁷ Pasini B, McWhinney SR, Bei T et al. *Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC and SDHD*, Eur J Hum Genet 2008; 16(1): 79-88
 - ⁸ Gaal J, Stratakis CA, Carney JA et al. *SDHB immunohistochemistry: a useful tool in the diagnosis of Carney-Stratakis and Carney triad gastrointestinal stromal tumors*, Mod Pathol 2011; 24(1): 147-151
 - ⁹ Liu C, Crawford JM, *Chapter "Gastrointestinal Tract" from Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 7th edition*, Elsevier 2005
 - ¹⁰ Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC, *Biology of Gastrointestinal Stromal Tumors*, J Clin Oncol 22: 3813-3825
 - ¹¹ Nilsson B et al, *Gastrointestinal stromal tumors: The incidence, prevalence, clinical course and prognostication in the pre-imatinib mesylate era*, Cancer 2005, 103: 821-829
 - ¹² Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y et al, *Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors*, Science 1998, 279: 577-580

-
- ¹³ Heinrich MC, Corless CL, Duensing A et al, *PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors*, Science 299: 708-710, 2003
 - ¹⁴ Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD et al, *Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors*, J Clin Oncol 21: 4342-4349, 2003
 - ¹⁵ Janeway KA, Kim SY, Stratakis CA et al, *Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations*, Proc Natl Acad Sci USA 2011 Jan 4, 108(1): 314-8
 - ¹⁶ Hostein I, Faur N et al, *BRAF mutation status in gastrointestinal stromal tumors*, Am J Clin Pathol 2010 Jan; 133(1): 141-8
 - ¹⁷ Miettinen M, Lasota J, *Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): definition, occurrence, pathology, differential diagnosis and molecular genetics*, Pol J Pathol 2003; 54: 3-24
 - ¹⁸ Pihorecky I, Cheney RT, Kraybill WG, Gibbs JF, *Gastrointestinal Stromal Tumors: current diagnosis, biologic behavior and management*, Ann Surg Oncol 2000; 7: 705-712
 - ¹⁹ Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW, *Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach*, Hum Pathol 2002; 33: 459-465
 - ²⁰ Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, Macapinlac HA, Burgess MA, Patel SR, Chen LL, Podoloff DA, Benjamin RS, *Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria*, J Clin Oncol 2007; 25: 1753-1759
 - ²¹ Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij, *New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)*, Eur J Cancer 2009; 45: 228-247
 - ²² Young H, Baum R, Cremerius U, Herholz K, Hoekstra O, Lammertsma AA, Pruim J, Price P, *Measurement of clinical and subclinical tumour response using [18F]-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography: review and 1999*

-
- EORTC recommendations. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PET Study Group, Eur J Cancer 1999; 35: 1773-1782*
- ²³ Akahoski K, Sumida Y, Matsui N, Oya M, Akinaga R, Kubokawa M, Motomura Y, Honda K, Watanabe M, Nagaie T, *Preoperative diagnosis of gastrointestinal stromal tumour by endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration, World J Gastroenterol 2007; 13: 2077-2082*
 - ²⁴ Miettinen M, Lasota J *Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites, Semin Diagn Pathol 2006, 23 (2): 70-83*
 - ²⁵ Rossi S, Dei Tos AP et al *Natural history of imatinib-naïve GISTs: a retrospective analysis of 929 cases with long-term follow-up and development of a survival nomogram based on mitotic index and size as continuous variables, Am J Surg Pathol, 35: 1646-1656-*
 - ²⁶ Joensuu et al, *Risk of recurrence of GIST after surgery: an analysis of pooled population-based cohorts, Lancet Oncol 2012: 13: 265*
 - ²⁷ Sepe PS, Brugge WR, *A guide for the diagnosis and management of gastrointestinal stromal cell tumors, Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2009; 6: 363-371*
 - ²⁸ Sepe PS, Moparty B, Pitman MB, Saltzman JR, Brugge WR, *EUS-guided FNA for the diagnosis of GI stromal cell tumors: sensitivity and cytologic yield, Gastrointest Endosc 2009; 70: 254-261*
 - ²⁹ Demetri GD, von Mehrem M, Antonescu CR, DeMatteo RP, Ganjoo KN, Maki RG, Pisters PW, Raut CP, Riedel RF, Scuetze S, Sundar HM, Trent Jc, Wayne JD, *NCCN Task Force report: update on the management of patients with gastrointestinal stromal tumors, J Natl Compr Canc Netw 2010; 8 Suppl 2: S1-S41*
 - ³⁰ Shim CS, Jung IS, *Endoscopic removal of submucosal tumors: preprocedure diagnosis, technical options and results, Endoscopy 2005; 37: 646-654*
 - ³¹ Chu YY, Lien JM, Tsai MH, Chiu CT, Chen TC, Yang KC, Ng SC, *Modified endoscopic submucosal dissection with enucleation for treatment of gastric subepithelial tumors originating from the muscularis propria layer, BMC Gastroenterol 2012; 12: 124*
 - ³² Park YS, Park SW, Kim TI, Song SY, Choi EH, Chung JB, Kang JK, *Endoscopic enucleation of upper-GI submucosal tumors by using an insulated-tip electro-surgical knife, Gastrointest Endosc 2004; 59: 492-496*

-
- ³³ Sun S, Ge N, Wang S, Liu X, Lü Q, *EUS-assisted band ligation of small duodenal stromal tumors and follow-up by EUS*, *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 492-496
 - ³⁴ Stamatakos M, Douzinas E, Stefanaki C, Safioleas P, Polyzou E, Levidou G, Safioleas M, *Gastrointestinal stromal tumor*, *World J Surg Oncol* 2009; 7: 61
 - ³⁵ Gouveia AM, Pimenta AP, Capelinha AF et al *Surgical margin status and prognosis of gastrointestinal stromal tumor*, *World J Surg* 2008; 32: 2375-2382
 - ³⁶ Shah P, Gao F, Edmundowicz SA, Azar RR, Early DS, *Predicting malignant potential of gastrointestinal stromal tumours using endoscopic ultrasound*, *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1265-69
 - ³⁷ DeMatteo RP, Ballman KV, Antonescu CR, Maki RG, Pisters PW, Demetri GD, Blackstein ME, Blanke CD, von Mehren M, Brennan MF, Patel S, McCarter MD, Polikoff JA, Tan BR, Owzar K, *Adjuvant imatinib mesylate after resection of localised, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*, *Lancet* 2009; 373: 1097-1104
 - ³⁸ Joensuu H et al, *Twelve versus 36 months of adjuvant imatinib (IM) as treatment of operable GIST with a high risk of recurrence: Final results of a randomized trial (SGXVIII-AIO)*, *Proc ASCO* 2011; Abstract LBA1
 - ³⁹ Casali PG et al. *EORTC-62024: Imatinib mesylate or observation only in treating patients who have undergone surgery for localized gastrointestinal stromal tumour*
 - ⁴⁰ Debiec-Rychter M, Sciot R, LeCesne A et al, *KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors*, *Eur J Cancer* 2006; 42: 1093-1103
 - ⁴¹ Heinrich MC, Owzar K, Corless CL et al, *Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the North American Intergroup Phase III trial of imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor: CALGC 150105 Study by Cancer and Leukemia Group B and Southwest Oncology Group*, *J Clin Oncol* 2008; 26(33): 5360-5367
 - ⁴² Rutkowski et al., *Neoadjuvant Imatinib in locally advanced gastrointestinal stromal tumors (GIST): the EORTC STBSG Experience*, *Ann Surg Oncol* 2013; 20: 2937-43

-
- ⁴³ Eisenberg BL, Harris J, Blanke CD et al, *Phase II trial of neoadjuvant/adjuvant imatinib mesylate (IM) for advanced primary and metastatic/recurrent operable gastrointestinal stromal tumor (GIST): early result of RTOG 0132/ACRIN 6665*, J Surg Oncol 2009; 99: 42-47
 - ⁴⁴ Fiore M, Palassini E, Fumagalli E et al, *Preoperative imatinib mesylate for unresectable or locally advanced primary gastrointestinal stromal tumors (GIST)*, Eur J Surg Oncol; 35: 739-745
 - ⁴⁵ Joensuu H et al, *Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI-451 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor*, N Eng J Med 2001; 344 (14): 1052-1056
 - ⁴⁶ Verweij J et al, *Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose Imatinib: randomized trial*, Lancet 2004; 364: 1127-34
 - ⁴⁷ Gastrointestinal Stromal Tumor MEta-Analysis Group (MetaGIST), *Comparison of two doses of Imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis of 1,640 patients*, J Clin Oncol 2010; 28: 1247-1253
 - ⁴⁸ Le Cesne A, Ray-Coquard I, Bui BN et al, *Discontinuation of Imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors after 3 years of treatment: an open-label multicentre randomised phase 3 trial*, Lancet Oncol 2010; 11(10): 942-949
 - ⁴⁹ Patrikidou A et al, *Influence of Imatinib interruption and rechallenge on the residual disease in patients with advanced GIST: results of the BFR14 prospective French Sarcoma Group randomised phase III trial*, Ann Onc 2013; 24:1087-93
 - ⁵⁰ Antonescu CR et al, *Acquired resistance to Imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation*, Clin Cancer Res 2005; 11(11): 4182-90
 - ⁵¹ Zalcberg JR; Verweij J, Casali PG et al, *Outcome of patients with advanced gastro-intestinal stromal tumours crossing over to a daily Imatinib dose of 800 mg after progression on 400 mg*, Eur J Cancer 2005; 41: 1751-1757
 - ⁵² Blanke CD, Rankin C, Demetri G et al, *Phase III randomized intergroup trial assessing Imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumor expressing the KIT receptor tyrosine kinase: S0033*, J Clin Oncol 2008; 4: 626-632

-
- ⁵³ Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR et al, *Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumor after failure of imatinib: a randomised controlled trial*, Lancet 2006; 368: 1329-1338
 - ⁵⁴ George S, Blay JY, Casali PG et al, *Clinical evaluation of continuous daily dosing of sunitinib malate in patients with advanced gastrointestinal stromal tumor after imatinib failure*, Eur J Cancer 2009; 45(11): 1959-68
 - ⁵⁵ Demetri GD, Reichhardt P, Kang Y et al, *Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial*, Lancet 2013; 381: 295-302
 - ⁵⁶ Kang YK, Ryu MH et al, *Randomized phase III trial of imatinib (IM) rechallenge versus placebo (PL) in patients (pts) with metastatic and/or unresectable gastrointestinal stromal tumor (GIST) after failure of at least both IM and sunitinib (SU): RIGHT study*, J Clin Oncol 2013; 31 (suppl): abstr LBA10502
 - ⁵⁷ Ryu MH et al, *A phase II study of sorafenib in patients with metastatic or unresectable gastrointestinal stromal tumours with failure of both imatinib and sunitinib: A KGSG study*, J Clin Oncol 2011; 29 (suppl): abstr 10010
 - ⁵⁸ Demetri GD, Casali PG et al, *A phase I study of single-agent nilotinib or in combination with imatinib in patients with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors*, Clin Cancer Res 2009; 15: 5910-5916
 - ⁵⁹ Judson I, Ma P, Peng B et al, *Imatinib pharmacokinetics in patients with gastrointestinal stromal tumour: a retrospective population pharmacokinetic study over time. EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group*, Cancer Chemother Pharmacol 2005; 55: 379-86
 - ⁶⁰ Nolden LK, Shum L, Dumont A et al, *Steady-state plasma imatinib levels in 124 GIST patients: distribution, dose escalation and response*, Connective Tissue Oncology Society Meeting 2010, Abstract 39288
 - ⁶¹ Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M, *Active transport of imatinib into and out of cells: implication for drug resistance*, Blood 2004; 104: 3739-45

Voglio dedicare questo mio lavoro a Riccardo, mio fratello, perché la sua presenza mi spinge ad essere ogni giorno una persona migliore, pronta a faticare per raggiungere i propri obiettivi e a non arrendersi di fronte alle difficoltà.

RINGRAZIAMENTI

È doveroso per me iniziare ringraziando tutte le persone che mi hanno permesso di lavorare a questa tesi: il professor Alfredo Falcone, il dottor Luca Galli, il dottor Riccardo Marconcini, ma anche tutti gli altri medici ed infermieri del Polo Oncologico dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, in particolare la dottoressa Elisa Biasco e la dottoressa Azzurra Farnesi, e le mie care colleghe, Elena e Rita.

Voglio ringraziare tutte le persone che mi stanno vicino e mi sostengono: i miei genitori, che hanno fatto tanti sacrifici per consentirmi di arrivare a questo traguardo, mia nonna, i miei zii, le mie zie ed i miei cugini, perché una famiglia come la mia non può che spronarti a dare il meglio nella vita.

Un grazie speciale, con tutto il mio cuore, a Roberta, che mi ha fatto capire in questi mesi quanto sia importante avere a fianco una persona che ti sostiene e condivide con te gioie e fatiche della vita.

Grazie a tutti i miei amici storici: Dario, con cui ho condiviso momenti di ansia pura pre-esame, giornate di studio estenuanti, ma anche momenti di vera felicità; Chiara e Alberto, perché, anche se a volte non ci vediamo per lungo tempo, sono sempre presenti nei momenti più importanti, e Susanna, che ha cercato di farmi capire qualcosa dell'ignoto mondo della Chimica, consentendo alla mia carriera universitaria di procedere. Grazie, amanti del tè corretto!

Grazie anche a tutti quelli che hanno condiviso questi sei anni insieme a me: Giulia, che è quasi una sorella per me, Alessandra, Alessandro, Dario, Alessandro, Lucrezia, Michele, Vanina e tutti gli altri che hanno sofferto insieme a me tra i banchi dell'università.

Infine, un grazie va alla mia seconda famiglia, cioè alla comunità in cui vivo e che mi accompagna nel cammino verso Gesù, che è la mia vera forza ed il mio punto di riferimento. In particolare, devo ringraziare Andrea e Barbara, Stefano ed Anna: vi conosco da poco, ma il vostro cuore è talmente grande che mi fate sentire costantemente amato ed accolto.

Grazie a don Piero, Federica, Sonia, Carla, Anna, Bianca Rosa, Giuseppe e tutte le altre persone della mia comunità: rendete la mia vita ogni giorno più bella.