



Università di Pisa
Dipartimento di Scienze Veterinarie
Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Veterinarie

Tesi di Dottorato di Ricerca

**AUC della Vinblastina e successivo Sviluppo di Limited
Sampling Strategies, per Predirne l'Esposizione in Cani
affetti da Mastocitoma**

Candidato:

Dott. Alessio Pierini

Docente guida:

Prof.ssa Veronica Marchetti

Correlatore:

Prof. Mario Giorgi

Anno accademico 2013-2015

Indice:

Riassunto		p. 4
Capitolo 1	Regimi di dosaggio, dose individuale e limited sampling strategies	p. 6
	<i>1.1 Valutazione della tossicità da chemioterapia</i>	p. 20
	<i>1.2 Metodi di aggiustamento di dose</i>	p. 23
Capitolo 2	Vinblastina. Generalità, utilizzo clinico nell'uomo e nel cane	p. 30
	<i>2.1 Utilizzo clinico in oncologia umana</i>	p. 38
	<i>2.2 Utilizzo clinico in oncologia veterinaria</i>	p. 39
Capitolo 3	Individualizzazione di dose e limited sampling strategies: applicazioni cliniche in medicina umana e veterinaria	p. 43
Capitolo 4	Scopo del lavoro	p. 51
Capitolo 5	Materiali e metodi	p. 54
	<i>5.1 Locali di svolgimento delle attività cliniche e di laboratorio</i>	p. 55
	<i>5.2 Ottimizzazione e validazione della metodica spettrometria di massa/HPLC per la ricerca di vinblastina nel siero canino</i>	p. 55
	<i>5.3 Preparazione del paziente, somministrazione chemioterapica e prelievi ematici.</i>	p. 58
	<i>5.4 Raccolta dati, valutazione di efficacia e tossicità del trattamento chemioterapico</i>	p. 59
	<i>5.5 Elaborazione dei dati raccolti</i>	p. 65
Capitolo 6	Risultati	p. 67

6.1	<i>Validazione del metodo</i>	p. 68
6.2	<i>Valutazione di tossicità e risposta a breve e lungo termine</i>	p. 69
6.3	<i>Concentrazioni plasmatiche di vinblastina, AUC e limited sampling strategies</i>	p. 74
Capitolo 7	Discussioni	p. 78
7.1	<i>Concentrazioni plasmatiche e AUC di vinblastina</i>	p. 79
7.2	<i>AUC di vinblastina e effetti collaterali acuti</i>	p. 81
7.3	<i>AUC di vinblastina e risposta clinica</i>	p. 82
7.4	<i>LSS per la vinblastina</i>	p. 84
7.5	<i>Tossicità acuta del protocollo chemioterapico</i>	p. 84
7.6	<i>Tossicità cronica del protocollo chemioterapico</i>	p. 87
7.7	<i>Risposta clinica al protocollo chemioterapico</i>	p. 89
Capitolo 8	Conclusioni	p. 91
	Bibliografia	p. 92
	Ringraziamenti	p. 132

Riassunto

L'individualizzazione del protocollo chemioterapico, tramite lo studio farmacocinetico degli agenti antitumorali e lo sviluppo di modelli di campionamento limitato (LSS), può migliorare la qualità di vita dei pazienti in terapia. Gli obiettivi di questo studio sono quelli di misurare la AUC della vinblastina (VBL) nei cani alla prima somministrazione, sviluppare un LSS e valutare l'associazione tra le AUC individuali e la presenza di effetti collaterali o di risposta tumorale. Sono stati inclusi 11 cani, trattati con VBL e ne è stata misurata la concentrazione plasmatica 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 360 minuti dopo la somministrazione. Per ogni cane è stata calcolata la AUC ed un modello LSS. Successivamente, i cani sono stati suddivisi in due gruppi in base alla presenza/assenza di effetti collaterali e di risposta clinica. La AUC media di VBL è stata $282,1 \pm 91,7$ min*ng/mL. Non si sono osservate differenze significative di AUC tra i cani che sviluppavano o meno effetti collaterali o risposta clinica. Le concentrazioni plasmatiche di VBL a 15, 30 e 60 minuti dalla somministrazione sono risultate predittive per l'esposizione sistemica al chemioterapico. Questa strategia di campionamento limitato potrebbe essere utile nel predire la AUC della VBL nel cane oncologico e quindi nell'individualizzazione del protocollo chemioterapico.

Summary

Individualized chemotherapy regimen has improved quality of life of patients with tumor. Pharmacokinetic studies and development of limited sampling strategies (LSS) for antitumor drugs are essential to achieve optimized dosing. The aims of this study are to measure the AUC of vinblastine (VBL) in dogs, develop an LSS and evaluate the association between AUC and side effects or tumor response. Eleven dogs, treated with VBL, were included. VBL plasma concentrations were measured 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 and 360 minutes after IV VBL administration. VBL AUC was calculated for each dog

*and an LSS was developed. Dogs were divided into two groups according to the presence/absence of side effects and clinical response. Mean VBL AUC was 282.1 ± 91.7 min*ng/mL. There were no associations between VBL AUC and presence of side effects or clinical response. VBL plasma concentrations at 15, 30 and 60 minutes post-treatment accurately predicted patient exposure. LSS could be useful for predicting VBL AUC in dogs and utilization of therapeutic drug monitoring to ensure optimized dosing.*

Capitolo 1 Regimi di dosaggio, dose individuale e limited sampling strategies (LSS)

I chemioterapici antitumorali sono definiti farmaci con finestra terapeutica stretta. Questa definizione prende origine dal fatto che l'intervallo tra la dose efficace e la dose che causa tossicità è molto breve, con il risultato che sovradosaggi di piccola entità possono portare a effetti avversi gravi, talvolta anche fatali. Questo determina nel medico oncologo un certo grado di preoccupazione che nel cercare di applicare i dosaggi più efficaci, incorre nel rischio di spiacevoli e imprevedibili complicazioni dovute al trattamento stesso. Nel formulare il dosaggio più adeguato, inoltre bisogna tener di conto che esiste un certo grado di diversità interindividuale, soprattutto nei pazienti malati, che aumenta le variabili relative alla farmacocinetica e farmacodinamica di un farmaco, rendendo assai più difficile predirne la tossicità. Per questi motivi, si intuiva già venti anni fa, la necessità di trovare un modo per rendere il trattamento chemioterapico "personalizzato" (deSouza 1994).

Per alcuni farmaci dalla finestra terapeutica stretta, la necessità dell'aggiustamento di dose è di routine nella pratica clinica. Per questo quando vengono prescritti e somministrati fenobarbitale, bromuro di potassio, digossina, vengono programmati dei monitoraggi delle concentrazioni plasmatiche del principio attivo o di un suo metabolita, così da aggiustare la dose qualora il livello plasmatico si trovi al di sopra o al di sotto di quello che viene considerato "range terapeutico", nel tentativo di evitare dosi tossiche o subterapeutiche (Van Warmerdan 1994)

Nonostante i chemioterapici antitumorali siano una classe di farmaci dalla finestra terapeutica stretta e che il loro impiego ne richieda l'utilizzo alla massima dose tollerata (Maximum Tolerated Dose, MTD), solo pochi studi prevedono dei monitoraggi terapeutici e aggiustamenti di dose volti anche ad aumentarla; Più spesso ci si affida a linee guida che suggeriscono una sua riduzione al verificarsi di episodi di tossicità, con il rischio di un eventuale sottodosaggio (Van Warmerdan 1994).

Ad oggi la maggior parte dei chemioterapici in medicina umana e veterinaria sono dosati sull'area di superficie corporea o più brevemente BSA (Body Surface Area) (Gustafson 2013, Collins 2011). Sebbene, il peso corporeo possa essere usato per standardizzare la dose di farmaci in alcune specie di animali da laboratorio o in stretti range di età negli uomini, questo sembra insufficiente per la standardizzazione in gruppi di persone a differente età e soprattutto in altre specie animali (Desoize 1998). Nel 1940, il Dott. Dawson propose l'utilizzo della BSA in sostituzione al peso corporeo, nella formulazione di dosaggi farmacologici in pediatria (Dawson 1940). Successivamente venne dimostrato che la BSA risultava essere un buon criterio di standardizzazione per la somministrazione dei farmaci sia nei soggetti giovani che tra le varie specie animali (Crawford 1950, Freireich 1966). L'uso della BSA nel dosaggio dei farmaci antitumorali risulta invece risalire al 1958, quando un pediatra, sulla base delle proprie esperienze cliniche, cominciò a dosare i chemioterapici per metro quadro di BSA, riscontrando che le MTD nelle varie specie si normalizzavano quando venivano espresse con questa innovativa unità di misura (Pinkel 1958). Nonostante nell'uomo (Reilly 1993, Vriesendorp 1987, Grochow 1990) e nel cane (Page 1988, Ogilvie 1989a, Rodriguez 1992, Ogilvie 1989b, Arrington 1994) non sia risultato ottimale per tutti i farmaci, questo nuovo metodo è stato trasferito in oncologia e tutt'ora è di uso routinario. Alcuni lavori hanno considerato l'uso del BSA utile solo in oncologia pediatrica e poco appropriato per il dosaggio farmacologico negli adulti (Gilles 1992, Grochow 1990, Reilly 1993). Altri addirittura hanno ottenuto risultati opposti a quelli attesi per esempio con la doxorubicina e la ciclofosfamide in soggetti adulti obesi (Powis 1987, Rodvold 1988). Gilles e colleghi, hanno inoltre dimostrato che la dose netta di doxorubicina, epirubicina e citarabina, intesa come mg totali per individuo risultava più affidabile nell'ottenere concentrazioni plasmatiche sovrapponibili negli adulti rispetto alle dosi formulate sulla superficie corporea. Nel cane è stata osservata maggior tossicità nei cani di taglia piccola rispetto ai

cani grandi con melfalan, cisplatino, carboplatino e doxorubicina (Price 1998). Oltretutto, la clearance di un farmaco non è mai stata dimostrata essere correlata alla BSA, come invece dovrebbe essere se considerassimo la BSA appropriata nell'adattamento della dose (Desoize 1994).

Bisogna considerare, infatti, che persone alte o più pesanti, che solitamente hanno un BSA più elevato, non necessariamente hanno organi come fegato e reni più grandi a giustificazione di un maggior metabolismo, e che comunque una maggior massa d'organo non si traduce direttamente in una maggior capacità di metabolizzazione del farmaco (Desoize 1994). Esiste sempre una grande varietà individuale di concentrazioni plasmatiche di farmaco, non correlate con la BSA, che non possono essere previste da una semplice valutazione di alcune caratteristiche morfologiche (Gunven 1986, Pujol 1990, Speth 1987).

Per il calcolo della BSA sono state proposte diverse formule che prevedevano la moltiplicazione del peso corporeo (PC) elevato a 0.67 per una costante "k". Nel tempo si sono susseguite diverse proposte per il valore della costante "k" (Tab 1.1).

Tabella 1.1. Differenti valori di k utilizzati per la stima del BSA dal peso corporeo nel cane e la dose di doxorubicina per un cane di 10 kg trattato a 30 mg/m² qualora fosse calcolata con queste formule

Valori di k	Dimensione popolazione di studio (n)	Dose di doxorubicina (mg)	Bibliografia
10.0	NR	13.9	Theilen 1975
11.0	1	15.3	Giaja 1928 ^b
11.2	7	15.6	Cowgill 1927
10.1	6	14.1	Thomas 1911 ^b
12.3	1	17.1	Hecker 1984 ^b
11.6	8	16.2	Rubner 1883 ^b
9.9	2	13.8	Custor 1973 ^b

NR: non riportata;^b: citati in Altman 1964

Il concetto della costante k è stato introdotto nella seconda metà del 1800 da Meeh, che propose la costante come un'espressione della relazione geometrica esistente tra il volume e la superficie di un oggetto (Travis 1988, Gehan 1970). Tuttavia all'interno della popolazione canina non esiste una "forma" regolare, infatti, passando da cani di taglia molto piccola (Es. pinscher nano) a cani definiti giganti (Es. alano), e da cani brachimorfi e piccoli (Es. carlino) a cani dolicomorfi e grandi (Es. levriero afgano), queste formule sono da considerarsi inappropriate concettualmente (Price 1998). Per quanto riguarda invece i dati pubblicati, possiamo osservare come queste formule siano state studiate su una popolazione molto limitata di cani (Tab. 1.1). Inoltre, a nostra conoscenza, nessuno ha paragonato tra loro le varie BSA, non conoscendo quindi la formula più appropriata.

Nei ratti da laboratorio è stato ipotizzato che la k potrebbe variare al variare del PC, incrementando con lo stesso (Spiers 1984). Nei gatti, al contrario, k sembra essere inversamente proporzionale al PC (Vaughan 1967). Se consideriamo il fatto che queste 2 specie sono piuttosto uniformi nella loro morfologia a prescindere dalla razza, si può comprendere come sia difficile applicare queste formule con k costante nel mondo canino (Price 1998).

Altri lavori, invece, hanno messo in discussione la costante esponenziale del PC (Cowgill 1927). Nei ratti questo esponente variava sensibilmente in funzione dell'età (Conklin 1975); parametro che non viene tenuto in considerazione dall'attuale formula utilizzata. Ancora, negli elefanti, macachi rhesus e persone è stato suggerito di inserire il parametro lunghezza (L) o altezza all'interno della formula (Sreekumar 1990, Liu 1976, DuBois 1916). In Tabella 1.2 si può osservare un esempio di applicazione di questa ultima variante e le differenze di dose ottenute in razze di cane piuttosto differenti tra di loro.

Tabella 1.2. Valori di BSA e dosi di doxorubicina in cani trattati a 30 mg/m² calcolate con le diverse formule proposte in differenti razze di cani

Formula BSA (cm²) proposta	Razza, L	Peso Corporeo (kg)	BSA (m²)	Dose doxorubicina (mg)	Bibliografia
10.0 * PC ^{0.67}	NR	30	0.97	29.0	Theilen 1975
2.268*PC ^{0.367} *L	Levriero afgano, 83.3 cm	30	0.90	26.9	Cowgill 1927
2.268*PC ^{0.367} *L	Bulldog, 68.6 cm	30	0.70	20.9	Cowgill 1927
10.0 * PC ^{0.67}	NR	10	0.46	13.9	Theilen 1975
2.268*PC ^{0.367} *L	Schnautzer nano, 48.3 cm	10	0.33	10.0	Cowgill 1927
2.268*PC ^{0.367} *L	Carlino, 40.6 cm	10	0.27	8.0	Cowgill 1927

PC: peso corporeo (kg) L: lunghezza stimata (cm); NR: non riportato

Osservando queste tabelle possiamo notare come l'inserimento della variabile L potrebbe "proteggere" le razze piccole da un sovradosaggio; tuttavia non esistono studi che abbiano verificato queste formule.

Sebbene Rubner abbia misurato la velocità metabolica basale (BMR, Basal Metabolic Rate) e il BSA in 6 cani, trovando che il BMR veniva normalizzato se espresso in BSA (Pinkel 1958, Travis 1988, Schmidt-Nielsen 1970), questa ipotesi è stata successivamente rigettata (Schmidt-Nielsen 1970), rendendo infondato l'assunto che la BSA correla con l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'escrezione del farmaco. In umana solo la clearance di 2 di 9 chemioterapici correlava con il PC o la BSA (Grochow 1990), suggerendo una grande difficoltà nel normalizzare l'esposizione e la tossicità dei farmaci anche nei cani, e che probabilmente i metodi di dosaggio dovrebbero essere dipendenti dal farmaco in analisi.

E persino qualora l'esposizione del farmaco correlasse con la BSA, risulterebbe difficile pensare che questa possa predirne la tossicità dato che è stato dimostrato che la

quantità di massa di tessuto suscettibile di tossicità, rappresentata dalle cellule staminali emopoietiche, non correlava con la BSA stessa (Vriesendorp 1987).

In medicina umana, diversi studi hanno evidenziato una correlazione tra la tossicità farmacologica ed alcuni parametri di farmacocinetica (Ratain 1986, Ackland 1989, Calvert 1994, Santini 1989, Weiss 1976, Lai-Sim 1982). In un lavoro è stato visto che la tossicità da VBL correlava positivamente con la Concentrazione steady-state (Steady-State Concentration, C_{ss}). La tossicità ematologica da doxorubicina, carboplatino e 5-FU correlavano invece con l'area sotto la curva (AUC, Area Under the Curve) (Calvert 1994, Santini 1989, Weiss 1976).

Tuttavia la farmacocinetica di un farmaco è influenzata da numerosi fattori, didatticamente racchiusi in quattro categorie, assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione, o più brevemente ADME (nda).

Per la maggior parte dei farmaci l'assorbimento si ha per diffusione passiva, anche se alcuni come il melfalan usano dei carrier specifici (Goldenberg 1979, Vistica 1983); ma questo dipende dalle proprietà chimiche del farmaco, piuttosto che da processi fisiologici. Tuttavia la biodisponibilità del farmaco potrebbe essere alterata da infiltrati infiammatori o neoplastici a livello intestinale o epatico. Per esempio in umana è dimostrato l'alterato assorbimento di alcuni farmaci in pazienti con sindromi di malassorbimento o linfoma intestinale (Shah id 1975, Houribane 1970, Swan 1974 Remy 1974). Questo potrebbe essere vero anche nel cane per quei farmaci somministrati per os come la ciclofosfamida e il metotressato.

La distribuzione del farmaco nell'organismo è influenzata da numerosi fattori: permeabilità della membrana citoplasmatica, affinità del farmaco per le proteine plasmatiche e tissutali. A livello plasmatico la porzione di farmaco legato alle proteine viene considerata inattiva perchè incapace di attraversare la membrana cellulare. Quindi risulta chiaro, che la concentrazione di proteine plasmatiche, l'affinità del farmaco per le

proteine, il numero di siti di legame proteici, e la competizione per gli stessi siti con altri farmaci contestualmente utilizzati, determinano la quota di farmaco libera e quindi capace di entrare nelle cellule tumorali. Per esempio il 5-FU nell'uomo non si lega a proteine e quindi la sua concentrazione tissutale correla con la concentrazione plasmatica (Garrett 1977); viceversa il melfalan si lega per il 90% alle albumine, un terzo del quale in modo definitivo mediante alchilazione. Questo determina un aumento progressivo della concentrazione plasmatica di melfalan libero mano a mano che i siti di legame per le albumine vengono saturati (Gera 1989). Nonostante la maggior parte dei farmaci abbia affinità per le albumine, altri hanno affinità per le globuline (vincristina e VBL in vitro Donigian 1973) ed altri ancora, come il mitoxantrone e gli alcaloidi della vinca, sembrano legare in modo permanente anche i globuli rossi (Donigian 1973, Faulds 1991, Lu 1984, Hebden 1970).

Gli stati patologici rendono difficile la decisione clinica sull'utilizzo di certi aggiustamenti di dose. Per esempio, se un farmaco cambia il suo legame dal 90 all'80%, questa variazione raddoppierà la quota di farmaco attiva, mentre un farmaco che si lega al 60% dovrà legarsi per il 20% per avere la stessa variazione plasmatica.

La concentrazione plasmatica e distribuzione tissutale dei farmaci idrofilici che si legano poco alle proteine, inoltre, risentono drasticamente della presenza di versamenti cavitari, proprio per la loro diffusione nel 3° spazio.

Un altro fattore che influenza la clearance di un farmaco è il suo metabolismo; questo può differire tra le varie specie animali ma anche tra i vari individui di una stessa specie. Per esempio la doxorubicina può essere metabolizzata dall'aldoreduttasi, citocromo P450 reduttasi, xantina ossidasi o citocromo C reduttasi a seconda della specie. Uno dei metaboliti, il doxorubicinolo, si forma per l'azione di enzimi di riduzione citoplasmatici ampiamente diffusi che hanno differenti affinità per i substrati e differenti velocità di trasformazione a seconda dei tessuti e della specie (Cummings 1984, Loveless 1978) e la

concentrazione di questi enzimi è molto elevata nel fegato, con più piccole quantità in reni, muscoli e cuore. L'affinità degli enzimi per la doxorubicina è più elevata nel fegato e reni dell'uomo rispetto ai cani e roditori, mentre la velocità di riduzione è maggiore nel cane rispetto alle persone e ai roditori (Loveless 1978). L'affinità e l'attività enzimatica non sono proporzionate alla massa corporea. Per questo la maggior tossicità da doxorubicina dosata con il metodo BSA osservata in cani di piccola taglia suggerisce un'assenza di correlazione tra la velocità di metabolizzare la doxorubicina a doxorubicinolo e la massa corporea (Arrington 1994). Nelle persone è dimostrata una diversità genetica negli enzimi di riduzione (soprattutto Cyt P450) con la presenza di isoenzimi che influenzano la tossicità farmacologica (Ratain 1993). Inoltre i farmaci vengono metabolizzati spesso per numerose vie metaboliche, e la dose basata su BSA dovrebbe tenere di conto di tutte le variazioni individuali per poter predire un dosaggio appropriato. Per esempio, secondo il metodo della BSA dovremmo aspettarci una velocità di metabolismo superiore nei mammiferi più piccoli, invece per quanto riguarda il mitoxantrone, lo ritroviamo escreto in forma di metaboliti nella bile per il 50% nel cane, 40% nei ratti e 25% nei conigli (Lu 1984, Batra 1986, MacPherson 1984, Wolf 1986, Ehninger 1985).

L'escrezione dei farmaci avviene prevalentemente a livello renale (metotressato, citarabina, sali del platino, bleomicina) e epatico/biliare (doxorubicina, alcaloidi della vinca, fluorouracile).

L'escrezione renale dei farmaci solubili in acqua e dei metaboliti avviene tramite la filtrazione glomerulare. Diverse equazioni sono state studiate per stimare la GFR tra le diverse specie (Edwards 1975, Calder 1983). Le specie di mammiferi più piccole dovrebbero avere una GFR maggiore e quindi richiedere dosaggi superiori di farmaci rispetto ai mammiferi più grandi. Sebbene questo sia considerato vero quando si valutano le diverse specie (Boxembaum 1980), non esistono studi che valutino questa relazione all'interno della stessa specie. Inoltre la filtrazione di un farmaco dipende dalla sua

capacità di legare le proteine e in condizioni normali i glomeruli sono quasi impermeabili alle proteine. Per esempio l'eliminazione renale dei sali del platino è completamente differente: i legami Cl⁻ del cisplatino vengono rapidamente liberati in ambiente acquoso determinando una carica positiva alla molecola che si lega facilmente a proteine e DNA (Zwelling 1979). Il carboplatino invece presenta una catena di carbonio più complessa che deve essere rimossa prima di poter far legare la molecola alle proteine (Gaver 1987). Per questo l'emivita del cisplatino risulta maggiore (120h cane Litterst 1976; 70h uomo Koeller 1986) rispetto a quella del carboplatino (2h in uomo Koeller 1986). Inoltre, poiché la clearance dei sali del platino non legati alle proteine è stata dimostrata correlare con la creatinina (Reece 1987), ci aspetteremmo una diretta correlazione con il BSA, dato che invece non è confermato nel cane in cui, nonostante sia un mammifero a peso inferiore, l'emivita del cisplatino è superiore a quella dell'uomo, suggerendo una possibile affinità per le proteine specie-specifica.

I chemioterapici vengono inoltre eliminati con gli acidi e le basi organiche sia a livello renale che epatico. A livello del tubulo prossimale renale si ha secrezione mediante trasporto attivo o diffusione passiva. A livello biliare invece il trasporto sembra quasi esclusivamente attivo. Il tasso di escrezione biliare dipende da molteplici fattori: perfusione tissutale e quindi disponibilità del farmaco per i siti di legame, diversa affinità per le proteine carrier rispetto alle proteine plasmatiche, grado di saturazione delle proteine carrier e la velocità di trasporto attraverso le membrane cellulari. I regimi di dose basati su BSA assumono che la velocità di trasporto sia correlata alla velocità metabolica, e implica che l'influenza netta di tutti i fattori sopracitati sia correlati alla massa corporea. Vincristina, doxorubicina e mitoxantrone sono riportati essere eliminati per via biliare in ratti, cani e umani (Castle 1976, Yesair 1972, Batra 1986, Chiccarelli 1984, Savaraj 1982, Richard 1989), ma in nessun lavoro c'è evidenza di correlazione tra velocità di escrezione e massa corporea. Anzi, è stato riportato che nel cane dopo 24 h si ha la secrezione biliare

di circa il 50-60% della dose di mitoxantrone, mentre nei ratti servono 120 h per avere un'eliminazione del 50% (Batra 1986, Chiccarelli 1984, Savaraj 1982). Nel 1982 è stata pubblicata una review sugli effetti dell'insufficienza renale ed epatica sulla farmacocinetica dei chemioterapici (Powis 1982). In caso di insufficienza renale o epatica il trattamento solitamente viene sottodosato in rapporto ai livelli sierici di creatinina o bilirubina (Adair 1986, Evans 1981, Reece 1987, Reich 1978). Altri studi hanno invece osservato che per la valutazione dell'escrezione biliare gli enzimi epatici sembrano essere più accurati della bilirubinemia. (Johnson 1992, Twelves 1992). Ma questo sistema non è un vero e proprio adattamento della dose, piuttosto è un tentativo di evitare effetti collaterali gravi in pazienti affetti da malattia renale o epatica. Tuttavia occasionalmente, è stata osservata una stretta correlazione tra la funzionalità renale e i parametri di farmacocinetica (Collins 2011). Numerosi studi hanno sviluppato un modello predittivo per l'aggiustamento di dose del carboplatino in funzione della creatinina sierica, che viene utilizzato di routine nella pratica clinica (Calvert 1989, Egorin 1985, Egorin 1987, van den Bongard 2000).

Il fegato funziona anche come organo di metabolizzazione, attivazione e detossificazione di alcuni farmaci come per esempio la ciclofosfamide e fluorouracile, e questo potrebbe determinare un'insufficiente produzione di farmaco in forma attiva o una sua inefficiente detossificazione. (Juma 1984, Lennard 1987, Evans 1991)

Inoltre alcune malattie o comorbidità possono alterare la perfusione renale o epatica, o la secrezione biliare determinando un'alterazione nella clearance dei farmaci. Per esempio è stata dimostrata correlazione tra la velocità di escrezione biliare e la clearance di alcuni farmaci (Gregus 1987). L'utilizzo contemporaneo di più farmaci, siano essi chemioterapici in regimi di polichemioterapia, siano essi farmaci utilizzati per il controllo o la cura delle comorbidità, potrebbe modificare la farmacocinetica di uno o più di essi, aumentandone o inibendone la clearance o il metabolismo (Collins 2011). Per

esempio le molecole che sono metabolizzate dal sistema del citocromo P450 a livello epatico sono particolarmente predisposte ad avere la propria farmacocinetica influenzata e alterata dalla contemporanea somministrazione di induttori o soppressori dello stesso citocromo (Tab. 1.3) (Van Meer 1995, Markowitz 2003, McCune 2000, Bannwarth 1996, Evans 1985, Wood 1991).

Tabella 1.3. Interazioni farmaco-farmaco clinicamente significative

Chemioterapico antitumorale	Altro farmaco coinvolto	Effetti sulla clearance del chemioterapico	Probabile meccanismo
Ciclofosfamide	Fenobarbitale	↑	Induzione Cyt P450
Doxorubicina	Ciclosporina A	↓	Inibizione escrezione biliare
Etoposide Irinotecan Paclitaxel	Fenitoina	↑	Induzione Cyt P450
		↑	
		↑	
6-Mercaptopurina	Allopurinolo Metotressato	↓	Inibizione xantina ossidasi
		↓	
Metotressato	Aspirina	↓	Inibizione secrezione tubulare
	Probenecid	↓	
Paclitaxel	Verapamil	↓	Inibizione Cyt P450
Topotecan	Cisplatino	↓	Inibizione secrezione tubulare
Vinblastina	Eritromicina	↓	Inibizione Cyt P450

Cyt P450: citocromo P450

Inoltre il fegato produce albumina, e in caso di gravi ipoalbuminemie, dato che la maggior parte dei farmaci si lega alle proteine plasmatiche, questo potrebbe determinare un eccesso di farmaco attivo in circolo (Stewart 1990); per questi ultimi meccanismi non esistono linee guida per l'adattamento di dose.

Anche l'età sembra incidere sulla cinetica dei farmaci, ma non è prevedibile misurare quanto incida dato che le variabili sono molteplici e che possono o non possono essere presenti tutte contemporaneamente: è riconosciuto che gli anziani hanno una massa

epatica minore, un flusso sanguigno epatico minore, una GFR minore, spesso hanno comorbidità che necessitano trattamenti che possono competere con i chemioterapici per il loro legame con le proteine plasmatiche. E' riconosciuto inoltre che gli adolescenti hanno una MTD per molti farmaci superiore di 1.3 volte quella degli adulti (Marsoni 1985).

Il tempo di emivita di un farmaco potrebbe essere più utile della BSA, perchè tiene di conto del metabolismo e dell'escrezione, tuttavia risulta difficile comparare le emivite di 2 farmaci dato che possono essere influenzate dalla modalità di somministrazione. Inoltre alcuni farmaci come la ciclofosfamide e la dacarbazina richiedono un'attivazione metabolica per la loro azione antitumorale. Per questo i loro metaboliti attivi dovrebbero essere misurati contemporaneamente nelle valutazioni cinetiche. I lavori che hanno evidenziato correlazione tra i livelli di ciclofosfamide e BSA, infatti, non hanno considerato i suoi metaboliti attivi determinando un errore di concetto nell'espressione di un risultato di dosaggio considerato adeguato (Nelson 1980). Inoltre per i farmaci a degradazione non enzimatica (come il melfalan) è stato dimostrato una correlazione con il peso corporeo piuttosto che con la BSA (Page 1988).

Un altro adattamento importante dovrebbe essere quello che tiene conto della quantità di farmaco che raggiunge le cellule tumorali. Purtroppo questa misura è spesso impraticabile per inaccessibilità di campionamento dei tumori, per motivi etici e per eterogeneità intratumorale. La concentrazione intratumorale dipende principalmente da tre fattori: la dose di farmaco somministrata, il flusso sanguigno all'interno del tumore, la capacità del farmaco di passare la membrana citoplasmatica. Solitamente i tumori sono irregolarmente irrorati con aree scarsamente vascolarizzate, mentre altri organi come fegato, reni e midollo osseo sono molto irrorati, per questo la concentrazione di farmaco intratumorale avrebbe dei limiti nel predire la tossicità. Non solo, alcuni lavori hanno mostrato come la concentrazione di farmaco a livello tumorale possa essere solo un indice

di chemioresistenza del tumore con maggiori livelli nei tumori chemiosensibili, ma comunque non sembravano correlare con l'efficacia (Desoize 1994).

L'uso della concentrazione plasmatica invece sembra essere più realistico degli altri metodi nel predire un adattamento di dose; inoltre i prelievi ematici trovano meno problemi etici e pratici nel poter essere eseguiti. La correlazione tra la concentrazione plasmatica e quella intratumorale non è stata ben studiata ma esistono buone correlazioni con la doxorubicina (Gunven 1986, Speth 1987) (anche se le modalità di somministrazione potrebbero influenzare la correlazione Monjanel 1979), mentre per il cisplatino questa correlazione non è stata osservata (Pujol 1990, Hecquet 1985, Troger 1991).

Nonostante diversi fattori influenzino il trasporto dal plasma al compartimento intracellulare del farmaco, come la lipofilità dello stesso, o meccanismi carrier o l'espressione delle proteine di resistenza multipla ai farmaci (MultiDrugResistance, MDR), è abbastanza chiara la correlazione tra efficacia e concentrazione plasmatica (antraciline, cisplatino, vinca alcaloidi) (Evans 1989, Robert 1993). Solitamente vengono prese in considerazione la AUC o il suo inverso, la clearance plasmatica totale.

La AUC rappresenta un importante parametro quantitativo di stima dell'esposizione sistemica ai farmaci. Il suo valore espresso in $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ descrive l'esposizione dell'organismo (considerato in volumi) al farmaco (considerato in peso) in funzione del tempo. Viene calcolato mediante la descrizione della farmacocinetica di un farmaco con la costruzione di un grafico che ha in ascissa la concentrazione plasmatica di farmaco e in ordinata il tempo. Ogni singolo parametro di concentrazione/tempo viene numericamente integrato mediante il metodo trapezoidale. La somma cumulativa di tutte le aree trapezoidali sotto la curva del grafico concentrazione/tempo dal tempo zero a infinito è la stima dell'esposizione sistemica a quel determinato farmaco. Da questo si intuisce bene come un maggior numero di prelievi e distribuiti in un arco di tempo piuttosto lungo possano permettere una migliore stima della AUC "reale" (Collins 2011).

Le correlazioni tra farmacocinetica ed efficacia tuttavia non sono fortissime e raramente superano 0,7 lasciando molto spazio all'influenza intrinseca molecolare delle cellule tumorali nell'interazione con i farmaci. Alcuni lavori hanno dimostrato una variabilità della AUC fino a 10 volte tra i pazienti oncologici sottoposti a chemioterapia somministrata allo stesso regime di dose (Eksborg 1990, Ratain 1987, Ratain 1991b). Molto più documentata è la correlazione tra la farmacocinetica e la tossicità da chemioterapia (Bennet 1987, Ratain 1989, Stewart 1991, Conley 1989, Desai 1982, Egorin 1984).

Anche le modalità di somministrazione endovenosa possono incidere sui parametri di farmacocinetica (Tab. 1.4-1.5). Con il bolo rapido si ha un picco plasmatico elevato che potrebbe avere importanti conseguenze sia su efficacia che tossicità, mentre per le infusioni lente con gli antimetaboliti, che sono fase dipendenti ed hanno una emivita breve, è stata dimostrata un forte miglioramento dell'efficacia senza variazioni o addirittura diminuzione di tossicità (Seifert 1975). Questo fa pensare che la AUC sia utile nel determinare l'efficacia antitumorale, mentre il picco plasmatico potrebbe essere più correlato alla tossicità (Ratain 1987).

Tabella 1.4. Relazione tra farmacocinetica e farmacodinamica di alcuni agenti antitumorali: dati relativi l'efficacia del farmaco.

Farmaco	Parametro farmacodinamico	Bibliografia
Cisplatino	PIC, AUC	Desoize 1991, Vermorken 1986
Citarabina	PIC	Van Pooijen 1977
Metotressato	AUC	Evans 1986
5-fluorouracile	AUC	Santini 1989
Doxorubicina	PIC, AUC	Preisler 1984, Robert 1982
Epirubicina	AUC	Hu 1989
Etoposide	AUC	Desoize 1990
Teniposide	AUC	Rodman 1987
Vinblastina	AUC	Lu 1983

PIC: clearance plasmatica; AUC: area sotto la curva

Tabella 1.5. Relazione tra farmacocinetica e farmacodinamica di alcuni agenti antitumorali: dati

relativi alla tossicità del farmaco.

Farmaco	Parametro farmacodinamico	Tossicità	Bibliografia
Cisplatino totale	PIC, AUC	GI, Renale	Reece 1987, Desoize 1991
Carboplatino	AUC	Ematologica	Calvert 1989, Egorin 1985
Metotressato	PIC	Ematologica	Stoller 1977
5-fluorouracile	AUC	GI, ematologica, cardiaca	Robert 1991, Gamelin 1991
Doxorubicina	Css	Ematologica	Ackland 1989
Epirubicina	AUC	Ematologica	Jakobsen 1991
Etoposide	AUC	Ematologica	Ratain 1989, 114
Teniposide	AUC	Ematologica	Evans 1989
Vinblastina	Css	Ematologica	Ratain 1986
Vincristina	AUC	Neurotossicità	Desai 1982

PIC: clearance plasmatica; AUC: area sotto la curva; Css: concentrazione allo steady-state;

Questa “regola” non è applicabile per tutti i farmaci. Per la doxorubicina per esempio è stato visto che si riduce la tossicità acuta aumentando il tempo di infusione, anche se per raggiungere una più elevata efficacia i tempi di infusione devono diventare molto lunghi (Muller 1993, Bieling 1991)

1.1 Valutazione della tossicità da chemioterapia

La maggior parte dei chemioterapici antitumorali presenta degli effetti collaterali acuti che se non controllati o previsti, talvolta possono essere rischiosi per la vita dell'individuo (nda). Un effetto collaterale è considerato qualsiasi evento sfavorevole, segno clinico, malattia o anomalia clinicopatologica temporaneamente associata con l'uso di chemioterapia. In medicina veterinaria, i numerosi effetti avversi da chemioterapia conosciuti o potenziali sono stati raccolti e pubblicati dal *Veterinary Cooperative Oncology Group* (VCOG). In queste linee guida gli effetti collaterali sono stati categorizzati per apparato, dalla cute al midollo osseo, dalla funzionalità renale a quella epatica, ecc... e classificati con una scala di 5 gradi dal grado 1 o di tossicità minima, al grado 5 che identifica la morte dovuta al trattamento (Fig. 1.1) (VCOG 2011).

BLOOD/BONE MARROW					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Bone marrow cellularity	Mildly hypocellular; <25% reduction from normal cellularity for age	Moderately hypocellular; > 25 to <50% reduction from normal cellularity for age	Severely hypocellular; >50% reduction from normal cellularity for age	—	Death
Definition: A disorder characterized by the inability of the bone marrow to produce haematopoietic elements.					
Haemoglobin	Dog: 10 g dL ⁻¹ to <LLN Cat: 8.0 g dL ⁻¹ to <LLN	Dog: <10–8.0 g dL ⁻¹ Cat: <8.0–6.5 g dL ⁻¹	Dog: <8.0–6.5 g dL ⁻¹ Cat: <6.5–5.0	Dog: <6.5 g dL ⁻¹ Cat: <5.0	Death
Haemolysis	Laboratory evidence of haemolysis only (e.g. direct antiglobulin test; DAT; Coombs' test; schistocytes)	Evidence of haemolysis and ≥2 g decrease in haemoglobin.	Transfusion or medical intervention indicated (e.g. steroids)	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by laboratory test results that indicate widespread erythrocyte cell membrane destruction.					
Packed cell volume	Dog: 30% to <LLN Cat: 25% to <LLN	Dog: 20 to <30% Cat: 20 to <25%	Dog: 15 to <20% Cat: 15 to <20%	Dog: <15% Cat: <15%	Death
Neutropenia	1500 μL ⁻¹ to <LLN	1000–1499 μL ⁻¹	500–999 μL ⁻¹	<500 μL ⁻¹	Death
Neutrophilia	—	50 000–100 000 μL ⁻¹	>100 000 μL ⁻¹	Clinical manifestations of leucostasis; urgent intervention indicated	—
Thrombocytopenia	100 000 μL ⁻¹ to <LLN	50 000–99 000 μL ⁻¹	25 000–49 000 μL ⁻¹	<25 000	Death
Other (Specify, _____)	Mild	Moderate	Severe	Life-threatening; disabling	Death

Figura 1.1 Categoria della tossicità ematologica: nella colonna di sinistra si osservano i vari parametri che vengono presi in considerazione nella valutazione della tossicità per questa categoria. Nelle colonne di destra si può osservare la descrizione dei criteri da investigare per la corretta classificazione della tossicità che sviluppa uno specifico parametro ematologico (da VCOG 2011)

Le tossicità da chemioterapia vengono suddivise in tre grandi categorie in base al tempo di insorgenza: immediata, si sviluppa entro 24-48 ore dalla somministrazione; acuta ritardata, solitamente si sviluppa entro le prime due settimane; tardiva, che solitamente si può sviluppare anche mesi dopo la somministrazione di chemioterapico (Gustafson 2013). Per quanto riguarda le tossicità immediate e acute ritardate, queste sono frequenti, più semplici da riconoscere, riproducibili, spesso reversibili e più facilmente correlabili al trattamento chemioterapico. Le tossicità tardive invece, sono infrequenti, difficili da riconoscere per l'andamento cronico che raramente porta a scompenso acuto, scarsamente riproducibili per il lungo follow up che richiedono e per la loro scarsa incidenza e per questo difficilmente correlabili con il trattamento (nda).

Per la valutazione delle tossicità acute ci si avvale della valutazione del sito di iniezione del chemioterapico, per i farmaci ad infusione endovenosa, per lo sviluppo di tossicità cutanea da stravasato o flebiti, del racconto anamnestico e visita clinica per la raccolta di informazioni riguardo l'insorgenza di fenomeni che possano aver modificato le grandi funzioni organiche giornaliere dell'individuo come modificazioni nell'appetito,

nella sete, nell'attività fisica, nella defecazione e urinazione o insorgenza di conati/vomito, diarrea, tosse, febbre, tremori o qualsiasi altro sintomo insolito e non correlabile con la malattia per la quale l'individuo è sotto trattamento. Per la valutazione di alcune tossicità che talvolta possono essere asintomatiche vengono eseguite delle analisi ematobiochimiche routinarie con delle tempistiche piuttosto standardizzate con l'obiettivo di svelare delle tossicità altrimenti difficilmente riconoscibili volte a modificare il protocollo chemioterapico per minimizzarne al massimo i rischi. Per questo per esempio, in medicina veterinaria, il trattamento con la maggior parte dei chemioterapici antitumorali richiede una valutazione ematologica a una settimana dalla somministrazione del farmaco, perchè anche in assenza di febbre o di qualunque altro sintomo il cane e il gatto potrebbero sviluppare neutropenie o trombocitopenie gravi che richiedono il ritardo nella somministrazione del successivo trattamento o una riduzione di dose. Inoltre, dato che in oncologia i farmaci vengono somministrati alla MTD, la valutazione della tossicità permette al clinico di prendere decisioni di aggiustamento di dose non solo in caso di una loro presenza ma anche se assenti. E' stato osservato per esempio che i cani con linfoma di alto grado che sviluppavano neutropenie gravi vivevano in media più a lungo dei cani che non sviluppavano questa tossicità (Fig 1.2)

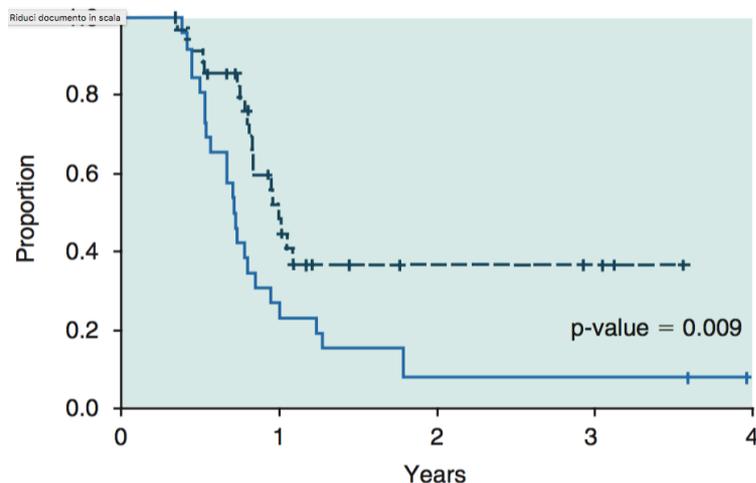


Figura 1.2 Rappresentazione grafica con curve di sopravvivenza Kaplan-Meier di cani con linfoma trattati con protocollo di radio-chemioterapia suddivisi in due gruppi: gruppo che sviluppava neutropenia grave (linea tratteggiata) e gruppo che non la sviluppava (linea continua). Si può

osservare come il gruppo che sviluppava tossicità ematologica presentava dei tassi di sopravvivenza medi migliori rispetto all'altro gruppo (da Gustafson 2013)

La valutazione della tossicità da chemioterapia non solo permette al clinico di prendere decisioni a tutela della salute del paziente con riduzione di dose o aumento dell'intervallo intersomministrazione, piuttosto permette al clinico di modificare la dose anche quando la tossicità non viene osservata, mettendo in atto schemi di dose-escalation (Fig. 1.3)

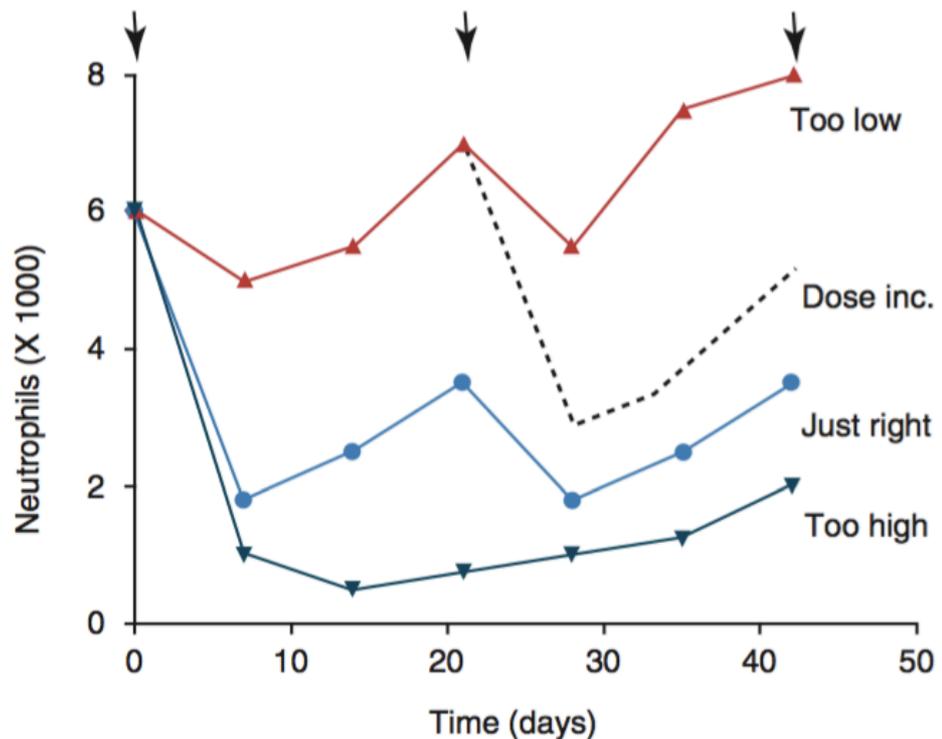


Figura 1.3 Rappresentazione schematica della dose ottimale di chemioterapico in base alla valutazione della tossicità ematologica settimanale in un protocollo di somministrazione ogni 3 settimane. Le frecce nere rappresentano i momenti di somministrazione della chemioterapia, le linee dello stesso colore rappresentano l'ipotetico andamento dei neutrofili secondo diversi schemi di dosaggio. Osserviamo come la linea blu scura più bassa, rappresenti uno schema di dosaggio troppo elevato, perchè lascia l'individuo esposto ad elevato rischi secondari alla neutropenia. La linea rossa invece rappresenta un individuo che non sviluppa mai tossicità e per il quale è auspicabile un incremento di dose (rappresentato dalla linea tratteggiata), che probabilmente permetterà al protocollo di essere più efficace. La linea centrale azzurra invece, rappresenta la dose "giusta" o ideale, per la quale si osserva una tossicità lieve che non necessita di ritardi di somministrazione o di riduzioni di dose (da Gustafson 2013)

1.2 Metodi di aggiustamento di dose

Nel 1998, il Dott. Desoize considerava il dosaggio per superficie corporea una pratica così diffusa e radicata difficile da modificare (Desoize 1998). A circa 20 anni di

distanza la situazione ha subito un deciso cambiamento in medicina umana e la ricerca scientifica si è concentrata sulla personalizzazione del trattamento chemioterapico; tuttavia, in oncologia veterinaria ancora poco è stato fatto (nda). Nei primi anni '80, alcuni autori dichiararono che “al momento è inconcepibile condurre studi di ricerca clinica sulla chemioterapia antitumorale senza la misurazione di dati di farmacocinetica adeguati”; questo assunto appare ancora più forte oggi (Donelli 1984, Collins 2011). Gli obiettivi che al momento dovrebbero essere presi in considerazione nel contesto di trial clinici di fase I e II in oncologia umana sono: caratterizzazione iniziale del comportamento farmacocinetico dei nuovi farmaci oggetto di studio nell'uomo; valutare se il regime di somministrazione produce o meno un pattern efficace nel predire l'esposizione sistemica al farmaco; determinare il grado di variabilità inter e intraindividuale dei parametri farmacocinetici; valutare se alcune caratteristiche individuali influenzano la biodisponibilità del farmaco; stabilire correlazioni di previsione tra i parametri farmacocinetici e gli effetti biologici; determinare le interazioni farmaco-farmaco in protocolli polichemioterapici (Collins 2011). Solitamente è più facile dimostrare una correlazione tra tossicità di un protocollo e i parametri di farmacocinetica. Sebbene l'AUC, sia il parametro più spesso utilizzato per stimare la dose ottimale, alcuni lavori hanno osservato come anche la concentrazione massima (C_{max}) e la durata di tempo della concentrazione plasmatica al di sopra di un livello ben preciso siano direttamente connesse con la tossicità (Gianni 1995). Ad oggi, il dosaggio individuale ha significativamente migliorato l'outcome e minimizzato la tossicità del metotressato nei bambini affetti da leucemia linfoblastica acuta B (Evans 1998; Collins 2011).

Nei prossimi paragrafi verranno affrontati alcuni argomenti riguardanti i metodi di aggiustamento di dose sviluppati in medicina umana.

- Metodo della dose test

E' stato sviluppato un metodo per individuare la dose efficace e poco tossica di metotressato in bambini con osteosarcoma. Questo metodo prevede la somministrazione di 50 mg di metotressato seguito da 9 prelievi nelle prime 30 ore post iniezione così da determinare la clearance del farmaco. Sapendo che la concentrazione plasmatica ottimale è 10^{-5} mol/L per 36 h una semplice equazione permette di definire il dosaggio migliore. (Monjanel 1979, Stoller 1977, Evans 1986). Questo ha permesso di avere effetti avversi meno frequenti con range terapeutici elevati di 1-2 g/m². Lo stesso metodo è stato usato per predire la dose di melfalan (Tranchand 1982)

- Aggiustamento di dose durante somministrazione in infusione continua

Questo procedimento necessita di pompe ad infusione per mantenere un flusso regolare e della conoscenza del tempo necessario a raggiungere la C_{ss}. Con questo metodo sono stati sviluppati dei protocolli di aggiustamento di dose per il fluorouracile, cisplatino ed etoposide. (Desoize 1991, Santini 1989)

- Aggiustamento di dose su studi di popolazione e Limited sampling strategies

La AUC è un parametro farmacocinetico importante, che riesce a misurare l'esposizione sistemica dell'organismo al farmaco. Per misurare la AUC di un farmaco in un individuo è necessario valutare le concentrazioni seriali, plasmatiche e/o nei fluidi biologici (urine, feci), a specifici time point. Una volta misurate le concentrazioni dell'analita in oggetto viene costruita una curva concentrazione-tempo (Fig. 1.4) (Reed 1999).

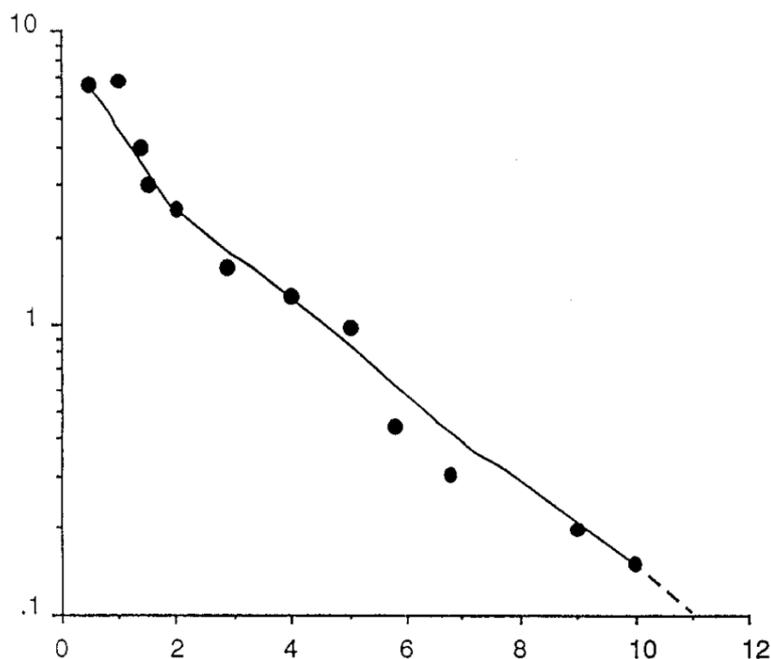


Figura 1.4. Grafico concentrazione-tempo semi-logaritmica costruito con 12 misurazioni. In ordinata il logaritmo delle concentrazioni plasmatiche del farmaco; in ascissa il tempo in ore. (Da Reed 1999)

L'AUC è intesa come l'area al di sotto della curva nel grafico concentrazione-tempo. Naturalmente non potendo misurare la concentrazione in modo continuo, utilizzando quindi infiniti time point, la curva della AUC risulta essere la curva che meglio descrive, in termini probabilistici e secondo modelli matematici, le misurazioni osservate. Risulta chiaro quindi che ove più misurazioni sono disponibili, maggiore è il grado di accuratezza della AUC stimata (Reed 1999). Purtroppo un numero elevato di campionamenti non è sempre applicabile nella pratica clinica per diversi motivi: elevati costi, conflitti etici, numero di campionamenti e quantità di sangue da prelevare. Per questi motivi sono stati sviluppati dei metodi di approssimazione della AUC che prevedono campionamenti limitati (Fig. 1.5) (Long 1987, Drusano 1988, Drusano 1994, Kashuba 1996).

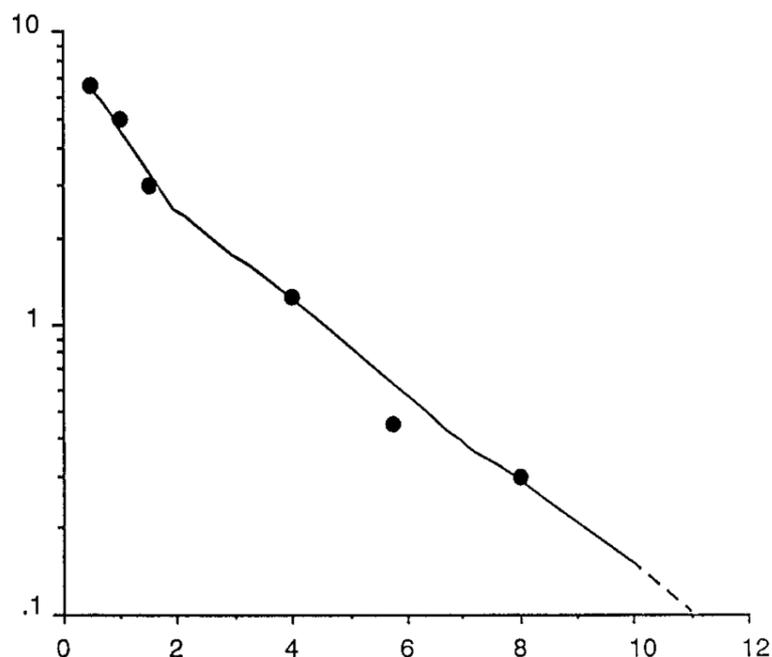


Figura 1.5. Stesso grafico concentrazione-tempo semilogaritmico di Fig. 1, ma costruito con metodo di campionamento limitato. In questo caso la curva è descritta da soli sei misurazioni. In ordinata il logaritmo delle concentrazioni plasmatiche del farmaco; in ascissa il tempo in ore. (Da Reed 1999).

Le strategie di campionamento ottimale prevedono dei modelli matematici che sono capaci di individuare il numero minimo di campionamenti da effettuare, a specifici time point, con l'obiettivo di restituire la AUC più "verosimile", in termini probabilistici, possibile. Questo modello richiede tuttavia, una descrizione della farmacocinetica di un farmaco su larga scala, sulla quale sia possibile estrapolare questi dati (Reed 1999). E con il passare del tempo e l'aumentare dei dati di farmacocinetica disponibili in letteratura, aumentano l'accuratezza di questa procedura. Non solo ma questa metodica può tenere di conto di molte altre variabili come il peso, l'età, l'altezza, il sesso, ecc... Solitamente questo metodo integra al suo interno il metodo Bayesiano, come modello matematico di stima della AUC, a partire da un database ricco di dati di farmacocinetica per una determinata molecola, ma difficili da confrontare tra loro (Thompson 1992, Ette 1993, Samara 1997, Dodge 1993).

Sono stati proposti dei metodi di stima della cinetica di popolazione come la stima bayesiana per numerosi farmaci e il relativo metodo di campionamento minimo (Tab. 1.6).

Tabella 1.6. Farmaci per i quali è stato determinato un metodo di campionamento minimo o una stima Bayesiana

Farmaco	Bibliografia
Ciclofosfamide	Egorin 1989
Thiotepa	Ackland 1988
Cisplatino	Favre 1982
Carboplatino	Sorensen 1993
Metotressato	Iliadis 1985
Fluorouracile	Santini 1989
Doxorubicina	Ratain 1991b
Epirubicina	Jakobsen 1991
Etoposide	Sorensen 1993
Vinblastina	Ratain 1987

Un altro metodo di stima della AUC viene definito come limited sampling strategies (LSS) o strategia di campionamento limitato. Questo metodo, più semplice del modello Bayesiano, assume che la AUC possa essere stimata tramite la costante “k” (intercetta nella curva del grafico concentrazione-tempo) conoscendo la concentrazione ad ogni time point. In alcuni lavori si sono usati da un minimo di 15 a un massimo di 29 pazienti per predire la AUC (Ratain 1987, ratain 1991b, Egorin 1989). Il LSS porta alla stima della AUC senza la necessità di eseguire numerosi prelievi, ma misurando la concentrazione del farmaco dopo la somministrazione da uno a tre time point ben definiti. Dopo aver collezionato i campioni si misura la AUC e poi tramite una regressione lineare si correla la AUC ad ogni singola concentrazione. La concentrazione corrispondente al time point con il più alto coefficiente di correlazione viene usato per la stima della AUC (Van Warmerdan 1994). Successivamente possono essere aggiunti altri time point per migliorare l’accuratezza della correlazione.

Una fase importante è poi la validazione del metodo applicandolo ad un’altra serie di pazienti. Per i quali viene sempre misurata la AUC e correlata con le precedenti. Tuttavia con lo studio della correlazione non è possibile mettere in evidenza alcuni errori provocati dalla stima stessa. Per questo sono stati introdotti i concetti di errore di

predizione medio (MPE, mean prediction error) e scarto quadratico medio dell'errore di predizione (RMSE, Root mean square prediction error) e le relative formule matematiche per il loro calcolo. Un modello di stima della AUC viene considerato buono se ha un RMSE <15%.

Tuttavia il modello LSS ha dei limiti. Questo metodo dovrebbe essere usato solo per predire la AUC in una serie di casi con stesso regime di dose e stessa velocità di infusione. Inoltre questo metodo non tiene di conto delle alterazioni farmaco-farmaco e quindi la contemporanea somministrazione di altri farmaci non è consigliata. Ancora, il campionamento a determinati time point è cruciale. Lo scostamento anche di poco da quelli che sono i time point prefissati potrebbe modificare in modo essenziale la stima della AUC.

In medicina umana LSS è stato sviluppato per diversi agenti antitumorali con un numero di campionamenti che variava da uno a 3 (Sorenson 1993, Egorin 1989, Ratain 1991b, Moore 1993, Ratain 1987). Tuttavia nella maggior parte di questi studi veniva misurata la concentrazione della molecola d'origine senza considerare i suoi metaboliti, rendendo difficile una valutazione accurata della farmacocinetica e farmacodinamica del farmaco stesso.

Nonostante la AUC possa aiutare il clinico ad ottenere regimi di dose personalizzati, esiste un potenziale problema nel predire la tossicità in una piccola parte di pazienti che presentano una differente sensibilità intrinseca degli organi sani (per es. midollo osseo) all'esposizione di alcuni farmaci. Per esempio Secondo Calvert et al., la AUC ottimale del carboplatino si riduceva di circa il 30% tra pazienti al primo trattamento e pazienti pretrattati (Calvert 1989).

Capitolo 2 Vinblastina. Generalità, utilizzo clinico nell'uomo e nel cane

La vinblastina (Fig. 2.1) è una molecola di origine vegetale, ad azione antitumorale, appartenente alla categoria degli alcaloidi della vinca, all'interno del gruppo degli agenti antiblastici ad azione antimicrotubulari. È stata isolata per la prima volta da Robert Noble e Charles Thomas Beer dalla pianta di pervinca o *Vinca rosea* (*Catharanthus roseus*) del Madagascar nel 1958 (Fig. 2.2).

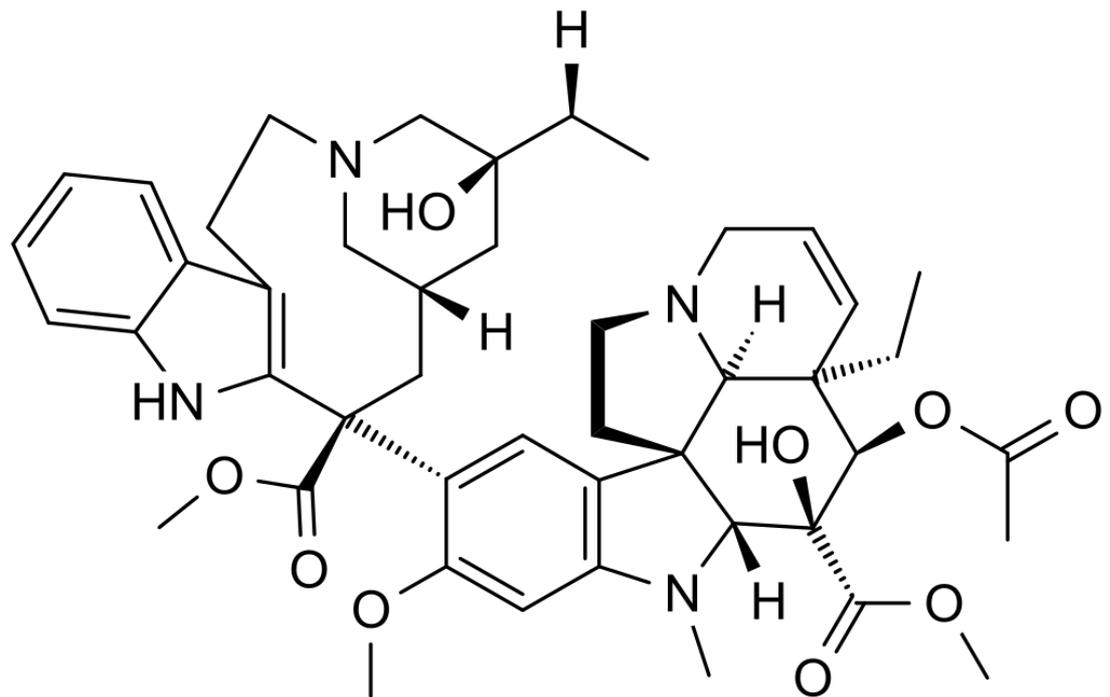


Figura 1 Struttura molecolare della vinblastina (immagine da <https://en.wikipedia.org/wiki/Vinblastine>)



Figura 2.2 Pianta della pervinca del Madagascar, *Catharanthus roseus* (Da https://en.wikipedia.org/wiki/Catharanthus_roseus#/media/File:Catharanthus_roseus_001.jpg)

La pervinca veniva usata inizialmente per il controllo delle emorragie, il trattamento dello scorbuto, del mal di denti, la guarigione delle ferite croniche e il trattamento del diabete. Per questi motivi, i primi studi sulle peculiarità della pervinca posero la loro attenzione sulle possibili proprietà ipoglicemizzanti di questo vegetale testandone gli estratti su conigli da laboratorio; in realtà, una volta iniettato l'estratto, gli animali tendevano a morire per setticemie, secondarie a gravi leucopenie e furono quindi scoperte le capacità antiblastiche oggi sfruttate nella lotta al cancro (Johnson 1968, Johnson 1963, Dancey 1995, Joel 1996, Gridelli 2002, Domenech 2001, Budman 1997), in particolare nel trattamento delle malattie linfoproliferative (Noble 1958, en.wikipedia.org).

Gli alcaloidi della vinca sono costituiti da sostanze naturali, vinblastina (VBL) e vincristina (VCR), e da derivati semisintetici, vindesina (VDS), vinorelbina (VRL) e vinflunina (VFL) (Rowinsky 2011). Tutte queste sostanze sono composte da un dimero formato dalla vindolina (maggior alcaloide presente nella pervinca) e dalla catarantina

(Fig. 2.3). La VCR e la VBL condividono la stessa struttura di catarantina, e differiscono solo per un sostituente (R1) attaccato all'atomo di azoto della vindolina; mentre nella VCR abbiamo un gruppo formilico, nella VBL troviamo un gruppo metilico. Questa piccolissima differenza strutturale determina però enormi differenze di attività biologica. Le matrici semisintetiche invece possono differire dalle sostanze naturali non solo per i sostituenti della vindolina, ma anche per la struttura chimica della catarantina stessa (Rowinsky 2011).

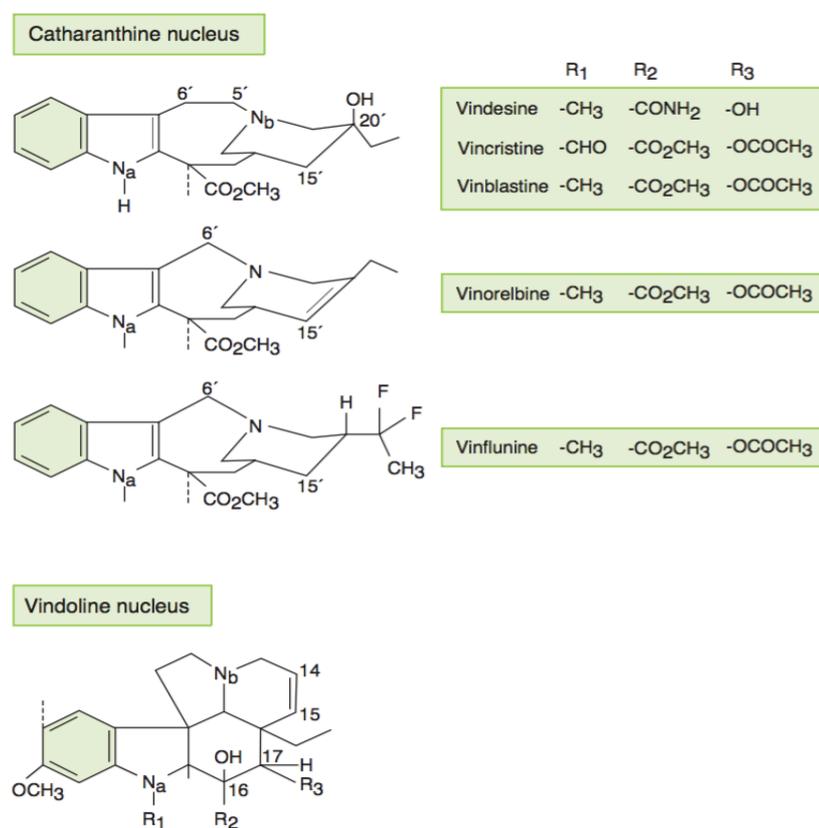


Figura 2.3 Differenze strutturali del nucleo di vindolina e della molecola di catarantina nei vari alcaloidi della vinca (immagine da Rowinsky 2011)

Gli alcaloidi della vinca inducono la loro tossicità cellulare interagendo con la tubulina e ostacolando la funzione dei microtubuli (Jordan 2004, Jordan 2007, Correja 2001, Gascoigne 2009, Pellegrini 2005, Rowinsky 1992, Wilson 1994, Johnson 1968, Johnson 1968, Budman 1997, Yun-San 2008, Jordan 2008, Bellmunt 2008, Bennouna 2008, Toso 1993, Himes 1973, Tucker 1977). Inoltre, hanno anche altre azioni biologiche

che possono o meno essere correlate ai loro effetti sui microtubuli come il trasporto intracellulare di amminoacidi, sintesi di DNA, RNA e proteine, metabolismo lipidico, ossidazione del glutatione, glicolisi cellulare, rilascio di ormoni o altre sostanze chimiche (ADH, istamina, adrenalina) e integrità della membrana cellulare (Pellegrini 2005, Beck 1984, Crossin 1981, Rowinsky 1992, Johnson 1968, Budman 1997). Tuttavia, questi ultimi meccanismi d'azione si osservano a concentrazioni non raggiungibili in vivo, mentre a concentrazioni nanomolari, più vicine a quelle che si ottengono nella pratica clinica, l'effetto è principalmente antimicrotubulare (Rowinsky 2011).

Gli alcaloidi della vinca legano i microtubuli in due siti, denominati siti ad elevata o scarsa affinità. I primi sono localizzati nelle porzioni terminali dei microtubuli, mentre i secondi nella lunghezza del microtubulo (Jordan 2007, Gascoigne 2009, Himes 1991, Jordan 1986, Jordan 1990, Singer 1989). Il legame con i siti ad alta affinità avviene a concentrazioni inferiori a 1 millimolare, bloccando i processi dinamici dei microtubuli senza influenzare la massa totale di polimeri. In particolare attivano la porzione terminale a lento accrescimento, inibendo la parte terminale a rapido accrescimento, determinando così una situazione "stazionaria" che provoca un vero e proprio blocco della mitosi in metafase (Jordan 2004, Jordan 2007, Correia 2001, Himes 1991, Jordan 1986, Jordan 1990, Singer 1989). Durante una normale mitosi, la fine di questo evento è associata a una rapida degradazione della ciclina B1. Tuttavia, se si dovessero instaurare "perturbazioni" che non permettano un'ottimale stabilità del fuso o che possano ridurre la tensione dello stesso, queste impedirebbero la progressione nel ciclo cellulare dalla metafase all'anafase, determinando l'attivazione dei meccanismi di morte cellulare programmata (Jordan 2004, Gascoigne 2009, Wilson 1999, Bhalla 2003, Zhai 1996, Yvon 1999).

Tuttavia le concentrazioni di ciclina B1 possono, nonostante tutto, rimanere elevate e la cellula può passare alla successiva interfase con nuova decondensazione della cromatina e formazione di nuclei multilobati (Jordan 2004, Jordan 2007, Gascoigne 2009,

Jordan 1991). Inoltre, benché la cellula sia arrestata in metafase, non è detto che si attivi l'apoptosi. Quest'ultimo infatti, è un meccanismo regolato da un delicato equilibrio tra induzione di geni proapoptotici e soppressione di geni antiapoptotici. La proteina p53 (proteina proapoptosi) sembra avere un ruolo chiave nell'attivazione dell'apoptosi nelle cellule in fase M bloccata per un periodo prolungato (Gascoigne 2009, Bhalla 2003, Fan 1998, Blagosklonny 2000, Ngan 2001, Jordan 1992, Upreti 2006). Il legame, invece, nei siti a scarsa affinità con concentrazioni superiori a 1 millimolare determina depolimerizzazione della tubulina e quindi una riduzione della quantità totale di microtubuli.

In ultimo gli alcaloidi della vinca mostrano attività antiangiogenetica in vitro a dosi molto basse (VBL 0,1-1 pmol/L), caratteristica ancora poco studiata in vivo (Ngan 2001, Vacca 1999, Braguer 2008, Meissner 2008, Pasquier 2007, Pasquier 2016, Camerini 2015)

Sebbene i vari alcaloidi della vinca mostrino differenti affinità di legame per i microtubuli (VCR > VBL > VRL > VFL) questa non influenza la loro attività farmacologica (Jordan 2008, Kruczynski 1998). Anzi, recentemente è stata dimostrata una maggior efficacia della VFL rispetto alla VCR su numerosi tumori murini e umani. Inoltre l'attività biologica delle varie sostanze potrebbe essere dettata anche dai differenti isotipi di microtubuli esistenti nei vari tessuti, dalla permeabilità e ritenzione cellulare, dalla concentrazione intracellulare delle proteine associate ai microtubuli (MAPs, *Microtubule-Associated Proteins*) e dalle diverse modificazioni post-traduzionali determinando per questo differenti sensibilità tissutali alla loro esposizione (Beck 1984, Ngan 2001a, Lobert 1996, Bowman 1988, Ferguson 1985, Lobert 2008, Bowman 1986, Gout 1984). Per esempio, in colture tissutali di cellule leucemiche umane, la VCR ha una ritenzione cellulare più elevata rispetto alla VBL, motivo per il quale si ipotizza la sua maggior efficacia nel breve periodo post trattamento (Bowman 1988, Ferguson 1984, Gout 1984).

Nonostante gli alcaloidi della vinca siano rapidamente captati dalle varie cellule la loro concentrazione all'equilibrio tra ambiente intra- ed extracellulare può variare da 5- a 500-volte, dipendentemente dal tipo cellulare (Bowman 1988, Bleyer 1975, Bowman 1986, Lengfeld 1982, Zhou 1994). La caratteristica più importante che determina accumulo intracellulare e ritenzione del farmaco è la lipofilia (Zhou 1994, Rahmani 1993), sebbene altri meccanismi, sconosciuti, intrinseci al tipo di tessuto cellulare potrebbero essere altrettanto importanti. Anche se la concentrazione del farmaco e la durata del trattamento sembrano essere decisivi per il suo accumulo intracellulare, la durata di esposizione al di sopra di uno specifico limite sembra la causa più importante di citotossicità di queste molecole (Ferguson 1984, Jackson 1979). A parità di durata di trattamento la concentrazione extracellulare di farmaco sembra direttamente proporzionale all'efficacia: per la VCR è dimostrata una capacità di inibizione del 50% con concentrazioni di 1-5 nmol/L (Jackson 1979).

I meccanismi di resistenza sono essenzialmente due. Il primo è denominato multiresistenza (MDR, multidrug resistance), innata o acquisita. La maggior parte delle proteine che mediano questo meccanismo rientrano nella categoria delle proteine ABC trasportatrici, che hanno il compito di veicolare numerose sostanze attraverso la membrana cellulare (Inaba 1981, Greenberger 1987, Choi 1988, Peterson 1983, Pieters 1992, Cornwell 1987, Fojo 1987, Beck 1979, Lockart 2003, Fojo 2007, Kavallaris 2008). Le proteine maggiormente studiate sono la glicoproteina di permeabilità (Pgp, permeability glycoprotein) o proteina MDR1 (ABC sottofamiglia B1 o ABCB1) e la proteina MRP1. La MDR1 è una proteina di membrana di 170 kDa, considerata una pompa di efflusso di membrana che regola il trasporto extracellulare di un gran numero di sostanze dal citosol, portando ad un ridotto accumulo intracitoplasmatico. La Pgp è fisiologicamente sovraespressa in alcuni tessuti (epitelio tubulare renale, midollare surrenalica, mucosa del

colon e altri) ed è stata documentata la sua sovraespressione in molte condizioni tumorali in altri tessuti (linfomi, leucemie e mielomi multipli) (Rowinsky 2011).

MDR1, è una proteina di circa 190 kDa, localizzata all'interno della membrana plasmatica e a livello del reticolo endoplasmatico, suggerendo un suo ruolo nel sequestro e trasporto extracellulare attraverso sistemi vescicolari (Lockhart 2003, Fojo 2007, Kavallaris 2008, Nooter 1995, Beck 1983, Bender 1982, Safa 1986, Grant 1994, Scheper 1993, Etiévant 1998, Kruh 1995, Hifpner 1999, Zaman 1994). Tuttavia, questi meccanismi di resistenza sembrano essere reversibili in vitro, quando vengono utilizzati farmaci che legano MDR1 o MPR1 come farmaci bloccanti i canali del calcio, inibitori della calmodulina, ecc... (Betrand 1992, Pinkerton 1996, List 2004) In questo modo però aumenta anche la concentrazione del farmaco nelle cellule dei tessuti normali, aumentandone notevolmente la tossicità.

Il secondo meccanismo è condizionato dagli isotipi di tubulina. Sappiamo che i mammiferi hanno sei isotipi di alfa-tubulina e 7 della beta. Modificazioni post-traduzionali o genetiche che portano a modifiche strutturali della tubulina sono state registrate in tumori resistenti agli alcaloidi della vinca (Raff 1993, Khan 2003, Toso 1993, Fojo 2007, Kavallaris 2008, Amos 1979, Rai 1998, Orr 2003, Hari 2003, Gan 2008, Minotti 1991, Cabral 1986, Cabral 1989, Cabral 1991).

VCR e VBL possono andare incontro a degradazione molto facilmente e i prodotti di degradazione possono essere misurati con HPLC (Sethi 1985). Le tecniche di RIA e ELISA che sono state sviluppate non permettevano comunque di poter distinguere le molecole madri dai derivati. (Castle 1976, Bender 1977, Culp 1977, Owellen 1977, Owellen 1977a, Jackson 1978) La spettrometria di massa tandem con HPLC ha aumentato la sensibilità delle metodiche di misurazione molecolare (Ramirez 1997, Van Tellingen 1991, Ylinen 1990, Rahmani 1987).

Gli alcaloidi della vinca vengono somministrati prevalentemente endovena tramite bolo rapido. Solitamente le caratteristiche farmacocinetiche degli alcaloidi della vinca esibiscono una distribuzione trifasica (Rowinsky 1992). Le caratteristiche includono un grande volume di distribuzione, una clearance trifasica dal plasma subito dopo la somministrazione con una clearance iniziale molto rapida seguita poi da un tempo di emivita più prolungato e eliminazione dei principali metaboliti tramite metabolismo epatico ed escrezione biliare. Nell'uomo, alla normale dose utilizzata nell'adulto il picco di concentrazione plasmatico varia da 100 a 500 nmol, persiste per pochi minuti ma comunque i livelli rimangono al di sopra di 1-2 nmol per una durata piuttosto prolungata (Rowinsky 1992, Owellen 1977, Owellen 1977a, Jackson 1978, Nelson 1980, Rahmani 1993, Leveque 2007). E' stata documentata un'ampia variabilità interindividuale e intraindividuale del comportamento farmacologico, attribuibile a molti fattori, come il legame con le proteine plasmatiche, metabolismo epatico e clearance biliare. Nell'uomo la VBL ha la più elevata clearance e il tempo di emivita terminale più breve (Fig. 2.4).

	Vincristine sulfate	Vinblastine sulfate	Vindesine sulfate	Vinorelbine tartrate	Vinflunine ditartrate
Standard adult dosage range (mg/m ² /wk)	1.0–1.4 mg/m ² /wk	6–8 mg/m ² /wk	3–4 mg/m ² /wk	15–30 mg/m ² /wk	320 mg/m ² every 3 wk
Pharmacokinetic behavior	Triexponential	Triexponential	Triexponential	Triexponential	Triexponential
Elimination half-lives					
a (min)	<5	<5	<5	<5	<5
b (min)	50–155	53–99	55–99	49–168	—
g (h)	23–85	20–64	20–24	18–49	38.7
Clearance (L/h/kg)	0.16	0.74	0.25	0.4–1.29	0.64
Primary mechanism of disposition	Hepatic metabolism and biliary excretion				

Figura 2.4 Parametri farmacocinetici degli alcaloidi della vinca (immagine da Rowinsky 2011)

La VBL è stata riportata avere un legame con le proteine plasmatiche tendenzialmente superiore al 90% (Rowinsky 1992, Owellen 1977, Nelson 1980, Rahmani 1993, Steele 1983, Hebden 1970, Creasey 1975). Dopo circa 20 minuti dalla somministrazione circa il 50% della VBL risulta legata alle piastrine, globuli rossi e globuli bianchi (Steele 1983, Hebden 1970, Creasey 1975). Il rapido calo di

concentrazione plasmatica ($t_{1/2} < 5$ min) è giustificato dall'elevata e rapida distribuzione tissutale (Owellen 1977).

La VBL viene ampiamente sequestrata a livello tissutale tanto da avere una ritenzione del 73% dopo 6 giorni di somministrazione (Owellen 1977). La principale via metabolica è epatica e l'escrezione biliare (Rowinsky 1992, Owellen 1977, Nelson 1980, Rahmani 1993, Leveque 2007, Creasey 1975, Zhou-Pan 1993). Nelle feci si riescono a rilevare solo piccole quantità della molecola madre a giustificazione dell'intenso metabolismo epatico. Almeno un metabolita, la desacetilvinblastina è stata identificata nel cane e nell'uomo come metabolita attivo della VBL, e piccole quantità sono state ritrovate nelle urine e nelle feci (Hamscher 2010)

2.1 Utilizzo clinico in oncologia umana

La posologia della VBL è di 6 mg/m²/giorno, ma la dose iniziale di solito prevede di iniziare con 2,5-3,7 mg/m², seguita da dose escalation con 1,8-1,25 mg/m² ogni settimana fino a raggiungere la dose limite di 12,5-18,5 mg/m². La tossicità varia ampiamente da individuo a individuo (Rowinsky 2011)

In umana, la VBL viene impiegata come componente di protocolli polichemioterapici come il PVB (cisplatino-VBL-bleomicina) nel trattamento dei tumori delle cellule germinali e il ABVD (doxorubicina, bleomicina, VBL-dacarbazina) nel linfoma di Hodgkin, oltrechè nel sarcoma di Kaposi, carcinomi della vescica, mammari e polmonari (Rowinsky 2011).

I profili di tossicità degli alcaloidi della vinca sono differenti tra loro nonostante le loro similitudini strutturali e farmacologiche. La VCR è la molecola a maggior tossicità neurologica periferica, mentre la VBL, VRL e VFL sono a maggior tossicità midollare (Rowinsky 2011). La neutropenia è la tossicità principale e dose-limitante, mentre la trombocitopenia e l'anemia sono meno comuni e meno gravi. Il nadir neutropenico si ha tra i 7 e gli 11 giorni e solitamente si ha un recupero completo in 2-3 settimane (Rowinsky

2011). La VCR può aumentare la conta piastrinica come risultato di endoreplicazione megacariocitaria (Bunn 1975). Costipazioni e ileo paralitico sono spesso frequenti con la VCR probabilmente come espressione di neuropatia (Sharma 1988). Le mucositi, stomatiti e faringiti sono più comuni con VBL che con VRL e rare con VCR. Nausea vomito e diarrea sono poco comuni (Rowansky 2011). La pancreatite è stata riportata con la VRL (Tester 1997).

La VBL è riportata poter dare iper e ipotensioni, soprattutto quando associata a sali del platino e bleomicina (Hirvonen 1988, Gottlieb 1971, Carmichael 1970). La VBL è associata a frequenti fenomeni di Reynaud sintomatici (fenomeni di vasocostrizione periferica grave associata a stimoli freddi) che migliorano con l'uso di farmaci bloccanti i canali del calcio (Hansen 1989, Hantel 1988). Sono riportati anche ischemie miocardiche e infarti.

Gli alcaloidi della vinca sono potenti vescicanti e possono causare gravi danni in caso di stravasamento. Eritema e dolore sono i segni più comuni. Irritazioni locali e segni di flebite possono ritrovarsi lungo il tragitto della vena dove è stata somministrato il farmaco come segno di sclerosi. Il rischio di flebite aumenta se il lavaggio con soluzione salina successivo al trattamento non è sufficiente (Hohneker 1994, Dorr 1985, Bellone 1990, Pattison 2002, Goolsby 2006). La VBL, inoltre, può causare irritazione corneale e fotosensibilizzazione (Rowansky 2011).

2.2 Utilizzo clinico in oncologia veterinaria

Nel cane la VBL è considerato il farmaco di prima scelta per il trattamento del mastocitoma, in regime di single-agent o in associazione ad altri farmaci come prednisone, ciclofosfamide, lomustina e toceranib. Anche se ancora poco studiata, la VBL sembra avere un ruolo anche nel trattamento del carcinoma a cellule transizionali della vescica e nel linfoma ad alto grado.

La VBL viene somministrata endovena in boli rapidi ad un dosaggio variabile da 2 a 3,5 mg/m² ad intervalli settimanali o più prolungati anche fino a ogni 4 settimane a seconda del protocollo di trattamento.

La tossicità midollare della VBL è considerata dose limitante e si presenta con frequenze ed intensità variabili indipendentemente dalla dose utilizzata. Quando si parla di tossicità midollare facciamo riferimento alla valutazione di tre caratteristiche fondamentali dell'emogramma: la conta neutrofilica, la conta piastrinica e la presenza o meno di anemia. Dato che i pochi studi che hanno osservato la tossicità piastrinica ed eritrocitaria riportano eventi rari e di lieve entità, da questo punto in avanti per tossicità midollare o ematologica si intenderà neutropenia. Sfortunatamente, non tutti i lavori pubblicati riportano la frequenza di tossicità basata sul numero di eventi per il numero totale di dosi somministrate, ma più spesso abbiamo dei dati parziali con la sola valutazione del numero dei soggetti che sviluppavano un certo grado di tossicità. Queste informazioni mancanti potrebbero essere alla base di errate valutazioni durante la discussione dei seguenti trial clinici. Quando somministrata a 2 mg/m² in regimi di monochemioterapia associata o meno a prednisone, che tendenzialmente prevedono una somministrazione settimanale per quattro volte e poi per altre quattro volte a settimane alterne, la tossicità midollare della VBL viene riportata essere poco frequente e di lieve entità (Tab. 2.1).

Tabella 2.1 Frequenza e gravità di tossicità midollare osservata in cani trattati con 2 mg/m² di VBL endovenosa somministrata in bolo rapido

Pololazione	N. cani con tossicità (%)	N. cani con tossicità G3-4 (%)	Bibliografia
61	8 (13.0)	4 (6.5)	Thamm 2006
41	8 (19.5)	2 (4.8)	Thamm 1999
24	0 (0.0)	0 (0.0)	Vickery 2008
25	5 (20.0)	0 (0.0)	Rassnick 2008

Inoltre, un lavoro del 2004, osservava tossicità ematologica solo nell'11% dei trattamenti, su 206 trattamenti totali, e con tossicità grave solo nel 1% (Davies 2004).

Quando utilizzata in regimi di polichemioterapia sempre a 2 mg/m² con intervalli intersomministrazione di 3-4 settimane la tossicità midollare riportata diventa difficile da valutare per la possibile interazione con gli altri farmaci. Tuttavia anche in questi casi viene considerata infrequente e lieve (Tab. 2.2)

Tabella 2.2 Frequenza e gravità di tossicità midollare osservata in cani trattati con 2 mg/m² di VBL endovenosa somministrata in bolo rapido in protocolli di polichemioterapia

Pololazione	N. cani con tossicità (%)	N. cani con tossicità G3-4 (%)	Bibliografia
35	5 (14.3)	0 (0.0)	Camps-Palau 2007
57	8 (14.0)	0 (0.0)	Cooper 2009
21	NR	0 (0.0)	Lejeune 2013

Vickery et al., in uno studio del 2008, hanno riportato le tossicità della VBL quando questa veniva utilizzata in regime di dose escalation. L'incidenza della tossicità ematologica lieve variava da 8.3%, 29.2%, 14.3% e 17.7% rispettivamente a 2, 2.33, 2.67 e 3 mg/m² rispettivamente. Mentre la tossicità grave si osservava solo con dosi di 2.67 e 3 mg/m², rispettivamente nel 9.5 e 5.9% dei casi.

Un altro lavoro del 2008, valutava la tossicità di due gruppi di cani trattati rispettivamente con 2 mg/m² a schema 4+4 come riportato sopra oppure con 3.5 mg/m² a settimane alterne. Quest'ultimo gruppo sviluppava numerosi eventi di tossicità grave in 14 (54%) di 26 cani, con un totale di eventi avversi neutropenici di 22/26 (85%) cani, mentre nel gruppo a basse dosi non si evidenziava mai tossicità grave (Rassnick 2008).

Un lavoro sempre del 2008, ha infine tentato di valutare la massima dose tollerata della VBL utilizzando uno schema di valutazione della tossicità che includeva tre cani alla volta, e definiva come MDT la dose immediatamente più bassa a quella che determina

tossicità ematologica dose limitante in 2 cani su 3. Per questo erano stati arruolati prima 3 cani trattati a 3 mg/m^2 , i quali avevano sviluppato solo in 2 casi tossicità di grado lieve, poi 16 cani trattati con 3.5 mg/m^2 che avevano sviluppato in 7 casi tossicità lieve e in 4 tossicità grave, e come dose eccessiva è stata considerato il trattamento con 4 mg/m^2 che ha portato in 2 casi su 4 a tossicità di grado grave (Bailey 2008).

Sulla base di questi risultati la MDT di 3.5 mg/m^2 è stata poi utilizzata in un regime di polichemioterapia che comprendeva anche prednisone e lomustina somministrata a 70 mg/m^2 . Il protocollo prevedeva cicli di 3 settimane in cui si somministrava la VBL il giorno 1 e la lomustina il giorno 14 per 6 mesi. Sorprendentemente la stessa quota di cani sviluppava tossicità ematologica di grado 1 e 4, precisamente il 29%, mentre il 22% non sviluppava tossicità (Rassnick 2010).

Tuttavia, recentemente la tossicità della VBL è risultata scarsamente tollerata alla dose di 3 mg/m^2 ogni due settimane, in cani affetti da TCC, con solo il 33% dei pazienti che riusciva a proseguire il protocollo senza riduzione di dose per il sopraggiungere di tossicità ematologica grave (Arnold 2011).

La tossicità gastroenterica viene considerata prevalentemente come calo dell'appetito (anoressia), vomito o diarrea ed anche questa viene riportata essere lieve (grado 1-2) e poco frequente (<20%) in corso di trattamento con VBL (Rassnick 2008, Rassnick 2010).

Altri tipi di tossicità come neuropatie periferiche e vasosclerosi sono segnalati essere rari (Camps-Palau 2007, Robot 2012), tuttavia la loro reale incidenza rimane sconosciuta per l'oggettiva difficoltà che ha il clinico nel riconoscerle se non in stadi gravi (nda).

Capitolo 3 Individualizzazione di dose e limited sampling strategies: applicazioni cliniche in medicina umana e veterinaria

In ambito oncologico, l'utilizzo di regimi chemioterapici basati sulla somministrazione della MTD, porta con sé la difficoltà di stabilire una correlazione tra la reale concentrazione plasmatica di farmaco nell'individuo e la risposta antitumorale o la tossicità, aspetto che sarebbe essenziale per il clinico per personalizzare il protocollo chemioterapico (de Jonge 2005).

La misurazione della risposta antitumorale non è semplice da interpretare, perchè influenzata da una serie di variabili indipendenti intrinseche al tumore stesso, come la chemioresistenza, disomogenea vascolarizzazione intratumorale, differenti tempi di risposta delle cellule neoplastiche, (Moore 1987) oppure dovute allo schema terapeutico, soprattutto nei protocolli polichemioterapici, dove dovremmo tenere di conto del peso di ogni farmaco e dell'interazione farmaco-farmaco. Se è vero che la risposta antitumorale è difficile da interpretare, la tossicità da chemioterapia, principalmente quella ematologica, si riesce a misurare in modo più oggettivo, tendenzialmente è riproducibile e solitamente si sviluppa con delle tempistiche note (nadir) (nda). Per questo negli ultimi 30 anni sono stati pubblicati numerosi lavori che hanno dimostrato una certa correlazione tra la farmacocinetica/farmacodinamica di numerosi chemioterapici antiblastici e lo sviluppo di effetti collaterali (Ratain 1990, Van Den Bongard 2000, Evans 1989, Galpin 1993, Masson 1997). Visto che in oncologia, si utilizza la massima dose di chemioterapia tollerata dal paziente, per il principio del "*more is better*" (Hryniuk 1988), rimane logico pensare che utilizzare come target la tossicità, possa portare ad ottimizzare il regime di dosaggio.

I modelli di ottimizzazione di dose di alcuni chemioterapici, come carboplatino, busulfan, metotressato, fluorouracile e etoposide sono stati ampiamente valutati, anche in studi prospettici, e sono entrati a far parte dei moderni schemi di dosaggio (de Jonge 2005).

Così per esempio, negli ultimi 15 anni numerosi lavori hanno rivolto l'attenzione

all'ottimizzazione di dose del 5-fluorouracile, dato che è un farmaco a degradazione enzimatica e che l'espressione enzimatica è estremamente variabile da individuo a individuo nella popolazione umana. Inizialmente, per ridurre i costi e il disagio dei pazienti a sottoporsi a numerosi prelievi ematici, è stato sviluppato un sistema LSS, tramite un metodo Bayesiano (Climente-Martí 2003).

Successivamente, alcuni autori hanno osservato una riduzione di tossicità da chemioterapia e una miglior efficacia in pazienti trattati con individualizzazione di dose rispetto al dosaggio standard basato su BSA. Un lavoro, ad esempio, riporta i risultati di uno studio prospettico e randomizzato in pazienti con carcinoma colon-rettale metastatici suddivisi in due gruppi di regime di dosaggio (Gamelin 2008). Il gruppo di controllo riceveva 5-fluorouracile a 1500 mg/m²/settimana mentre il gruppo sperimentale dopo aver ricevuto la prima dose come il gruppo di controllo le successive venivano “aggiustate” in base a modelli matematici nel tentativo di mantenere la concentrazione plasmatica all'interno di un range definito efficace e poco tossico (Fig 3.1)

In the Absence of Toxicity			In the Presence of Toxicity*
FU Plasma Concentration (µg/L)	AUC (mg·h·L ⁻¹)	FU Dose Adjustment (± % of previous dose)	
< 500	< 4	+70	Grade II toxicity: dose decreased by 200 mg Grade III toxicity: 1 week break, then dose decreased by 300 mg
500-1,000	4 to < 8	+50	
1,000-1,200	8 to < 10	+40	
1,200-1,500	10 to < 12	+30	
1,500-1,800	12 to < 15	+20	
1,800-2,200	15 to < 18	+10	
2,200-2,500	18 to < 20	+5	
2,500-3,000	20 to < 24	Unchanged	
3,000-3,500	24 to < 28	-5	
3,500-3,700	28 to < 31	-10	
> 3,700	> 31	-15	

Abbreviations: FU, fluorouracil; AUC, area under the curve.
*Using the WHO grade scale.

Figura 3.1 Schema di aggiustamento di dose del 5-fluorouracile sulla base dei risultati di concentrazione plasmatica rilevati dopo il primo ciclo di chemioterapia (modificato da Gamelin 2008)

Gli autori osservarono che il gruppo sperimentale nonostante ricevesse in media una dose maggiore rispetto al gruppo di controllo (1790 mg/m²/settimana Vs 1500 mg/m²/settimana), sviluppava minori eventi di tossicità e migliori tassi di risposta. Ma il

dato più interessante è l'estrema eterogeneità dei dosaggi da somministrare ad ogni paziente per ottenere la concentrazione di fluorouracile all'interno del range terapeutico nel gruppo sperimentale (Fig. 3.2) e il fatto che solo 4 di 49 pazienti del gruppo di controllo avesse concentrazioni plasmatiche di fluorouracile all'interno dello stesso range.

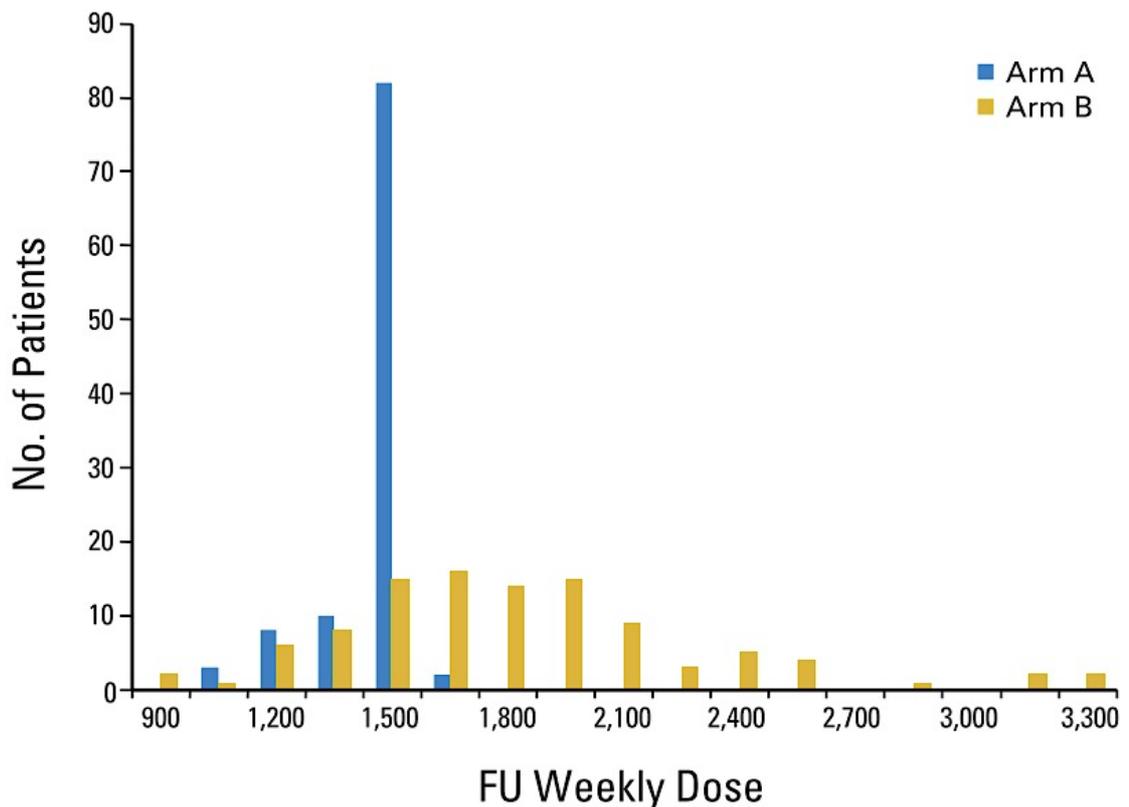


Figura 3.2 Rappresentazione grafico della distribuzione dei dosaggi nei 2 gruppi. Arm A (colonne blu) rappresenta il gruppo di controllo con dosaggio standard basato sulla superficie corporea. Arm B (colonne gialle) rappresenta il gruppo sperimentale con l'adattamento di dose basato sulla AUC. (modificato da Gamelin 2008)

Questi dati sono stati confermati anche più recentemente in uno studio condotto da un gruppo di medici americani (Kline 2014) (Fig. 3.3, 3.4)

Group	BSA Method	PK Monitoring
Patients With Grade 3 Toxicity, Total n (%)	11 (69)	6 (32)
Dose-Limiting Toxicity		
Diarrhea, n (%)	8 (50)	3 (16)
Nausea	1	0
Vomiting	2	0
Dehydration	3	0
Hand-foot syndrome	0	1
Mouth sore	0	1
Weight loss	1	0
Syncope	1	0
Neutropenia, n (%)	2 (12)	3 (16)

Figure 3.3 Tassi di tossicità di grado 3 sviluppati dai pazienti trattati con dose standard (BSA Method) e pazienti trattati con aggiustamento di dose (PK Monitoring). (modificato da Kline 2014)

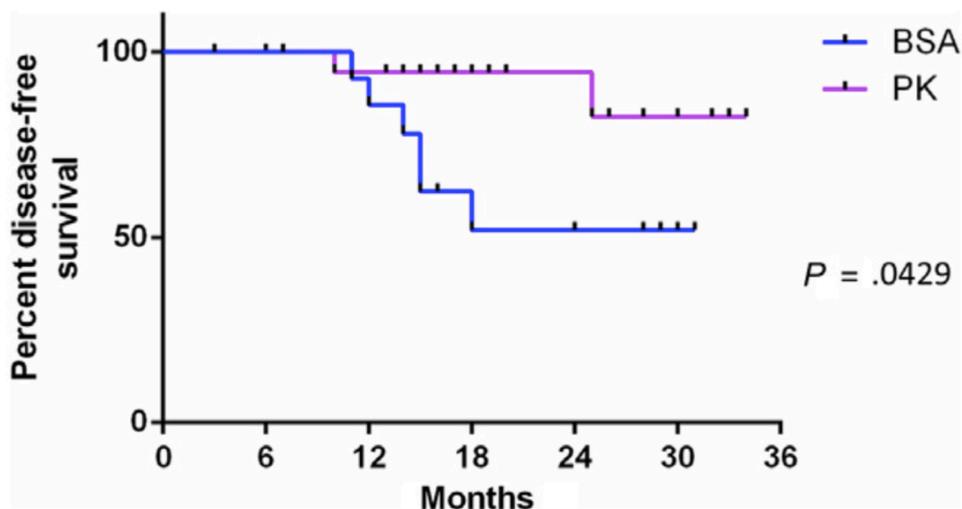


Figura 3.4 Curve di sopravvivenza dei pazienti trattati con dosaggio standard di fluorouracile (BSA, linea blu) e trattati con aggiustamento di dose (PK, linea viola) (modificato da Kline 2014)

Non solo l'utilizzo di un monitoraggio farmacocinetico permette di migliorare l'esposizione individuale al chemioterapico raggiungendo i target terapeutici prefissati, in

alcuni lavori è stato addirittura osservato che aumentando il numero di aggiustamenti di dose per individuo si aumenta la possibilità di far rientrare lo stesso individuo all'interno del range di concentrazione plasmatica prefissato (de Jonge 2005). Così come alcuni autori avevano osservato che l'aggiustamento di dose dopo il secondo ciclo di trattamento con busulfan riusciva a portare tutti i pazienti all'interno del range terapeutico, mentre solo il 54% raggiungeva tale obiettivo con l'individualizzazione di dose dopo il primo ciclo, più recentemente altri autori hanno osservato che riuscivano a rendere più omogenea la distribuzione dei target terapeutici ottenuti solo dopo quattro osservazioni farmacocinetiche con un errore inferiore al 20% e limitando al minimo l'esposizione di alcuni soggetti a dosi estremamente troppo alte o troppo basse di chemioterapico (Fig 3.5). (Bolinger 1999, Saam 2011)

AUC Category (in mg·h/L)	Samples							
		1		2	3			4
≤ 9	6	9.68%	5	8.06%	4	6.45%	3	4.84%
10-14	13	20.97%	7	11.29%	4	6.45%	2	3.23%
15-19	23	37.10%	15	24.19%	19	30.65%	16	25.81%
20-24*	3	4.84%	18	29.03%	16	25.81%	23	37.10%
25-29	5	8.06%	8	12.90%	11	17.74%	14	22.58%
30-34	8	12.90%	6	9.68%	3	4.84%	3	4.84%
≥ 35	4	6.45%	3	4.84%	5	8.06%	1	1.61%
N	62		62		62		62	
Mean	19.79		20.76		21.15		21.35	
Std Dev	10.59		9.21		8.48		6.49	
Range	2-60		1-51		2-51		2-35	

Figura 3.5 Aggiustamenti di dose ripetuti in un gruppo di pazienti trattati con fluorouracile. Si può osservare come l'AUC media rientri nel range terapeutico dopo la 4° valutazione e come la deviazione standard e il range si riducono, migliorando la precisione della misurazione. Inoltre si osserva come si riducano sensibilmente i pazienti esposti a dosaggi troppo elevati (modificato da saam 2011)

Riguardo alla VBL, vista l'elevata variabilità farmacocinetica interindividuale di questa, nel tempo sono stati proposti protocolli di dosaggio differenti volti ad individualizzare la dose, cercando di minimizzare la tossicità e ottimizzando i tassi di risposta.

Uno studio, per esempio, ha valutato se l'infusione continua di VBL potesse migliorare e "stabilizzare" la quota di farmaco libero in circolo e quindi disponibile per le cellule tumorali, rispetto a somministrazioni in bolo (Lu 1983). Questo studio infatti, si prefiggeva di mantenere la C_{ss} elevata; dato che la VBL presenta un'elevata clearance e un grande volume di distribuzione per l'elevata affinità alla tubulina tissutale, in questo modo si pensava di poter saturare i legami extravascolari aumentando la concentrazione di farmaco libera in circolo (Owellen 1975). Paragonando quindi una modalità di infusione di 1-2 mg/m²/die per cinque giorni consecutivi con un bolo rapido di 7,5 mg/m², si osservava che i pazienti con infusione continua avevano una emivita di farmaco più lunga, e una clearance più lenta nonostante una elevata variabilità interindividuale (Fig. 3.6).

Patient	Dose (mg/sq m)	<i>t</i> _{1/2}		V (liters/kg)	V _{ss} (liters/kg)	C x t (ng/ml/hr)	Clearance (ml/kg/hr)
		Initial (hr)	Terminal (days)				
<i>Continuous infusion</i>							
1	1.0	2.6	72.2	42.5	41.0	1622	17
2	1.0	2.4	15.2	19.0	18.8	757	36
3	2.0	0.9	7.8	9.2	9.0	1612	34
4	2.0	2.8	22.2	44.6	43.7	933	58
		2.2 ± 0.4 ^a	29.4 ± 14.6	28.8 ± 8.7	28.1 ± 8.5	1231 ± 226	36 ± 8
5	1.7	0.1	3.4	9.9	9.9	541	85
6	1.6	1.1	8.8	42.4	42.5	309	140
7	1.7	0.4	7.0	45.3	46.6	253	186
		0.5 ± 0.3	6.4 ± 1.6	32.5 ± 11.3	33.0 ± 11.6	368 ± 88	137 ± 2.9
8	2.0	2.8	2.7	17.2	16.8	295	183
9	1.7	0.1	2.8	29.4	29.2	153	300
10	1.7	0.1	2.7	64.7	64.5	66	701
11	1.7	1.3	2.0	51.0	49.7	65	722
12	1.5	2.2	1.1	29.9	27.9	51	797
		1.3 ± 0.5	2.3 ± 0.3	38.4 ± 8.5	37.6 ± 8.6	126 ± 46	541 ± 124
<i>Bolus administration</i>							
1	7.5	0.3	0.5	10.7	13.3	321	674
2	7.5	0.3	0.7	27.6	20.3	158	1197
13	7.5	0.7	2.1	25.7	23.0	530	357
		0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.5	21.3 ± 5.3	18.9 ± 2.9	336 ± 108	743 ± 245

Figure 3.6. Confronto dei parametri di farmacocinetica nei 2 gruppi di pazienti trattati con VBL ad infusione continua o con bolo rapido (da Lu 1983)

Inoltre, all'interno del gruppo con infusione continua, si ottenevano tassi di risposta migliori in pazienti con AUC maggiore e clearance inferiore, mentre il volume di distribuzione non sembrava avere nessuna influenza (Fig. 3.7).

Patient	Dose (mg/sq m)	$t_{1/2}$		V (liters/kg)	V_{ss} (liters/kg)	C × t (ng/ml/hr)	Clearance (ml/kg/hr)	Urinary ex- cretion	Response
		Initial (hr)	Terminal (days)						
<i>Continuous infusion</i>									
								<i>% in 96 hr</i>	
1	1.0	2.6	72.2	42.5	41.0	1622	17	16.9	Partial
2	1.0	2.4	15.2	19.0	18.8	757	36	14.5	Partial
3	2.0	0.9	7.8	9.2	9.0	1612	34	12.6	Partial
4	2.0	2.8	22.2	44.6	43.7	933	58	14.1	Partial
		2.2 ± 0.4^a	29.4 ± 14.6	28.8 ± 8.7	28.1 ± 8.5	1231 ± 226	36 ± 8	14.5 ± 0.9	
5	1.7	0.1	3.4	9.9	9.9	541	85	22.0	Stable
6	1.6	1.1	8.8	42.4	42.5	309	140	10.8	Stable
7	1.7	0.4	7.0	45.3	46.6	253	186	7.3	Stable
		0.5 ± 0.3	6.4 ± 1.6	32.5 ± 11.3	33.0 ± 11.6	368 ± 88	137 ± 2.9	13.0 ± 4.4	
8	2.0	2.8	2.7	17.2	16.8	295	183	3.2	No
9	1.7	0.1	2.8	29.4	29.2	153	300	19.9	No
10	1.7	0.1	2.7	64.7	64.5	66	701	NC ^b	No
11	1.7	1.3	2.0	51.0	49.7	65	722	25.4	No
12	1.5	2.2	1.1	29.9	27.9	51	797	11.3	No
		1.3 ± 0.5	2.3 ± 0.3	38.4 ± 8.5	37.6 ± 8.6	126 ± 46	541 ± 124	15.0 ± 4.9	

Figure 3.7. Confronto dei parametri di farmacocinetica nei pazienti divisi per gruppi di risposta clinica (da Lu 1983)

Uno studio successivo (Ratain 1986) ha osservato la tossicità in pazienti trattati con infusioni continue permanenti con sistemi di erogazioni a flusso costante sottocutaneo, cercando di mantenere la concentrazione plasmatica citotossica superiore a 1 ng/ml così come dimostrato in vitro (Ludwig 1984). Lo studio si prefiggeva di trovare la MTD e la correlazione con la C_{ss} di VBL. Per questo i pazienti venivano trattati con dosi crescenti di VBL da 0,5 a 0,7 mg/m²/die e rivalutati ogni 2-3 settimane. Gli autori ottennero dei dati molto interessanti, trovando una C_{ss} media di VBL significativamente più alta nel gruppo di pazienti che sviluppava tossicità (1,99 ng/ml Vs 1,00 ng/ml). Inoltre cinque di 6 pazienti con C_{ss} superiore a 2 ng/ml sviluppava leucopenia grave contro 1 paziente su 15 che invece la sviluppava a concentrazioni inferiori a 1,45 ng/ml (Fig 3.8).

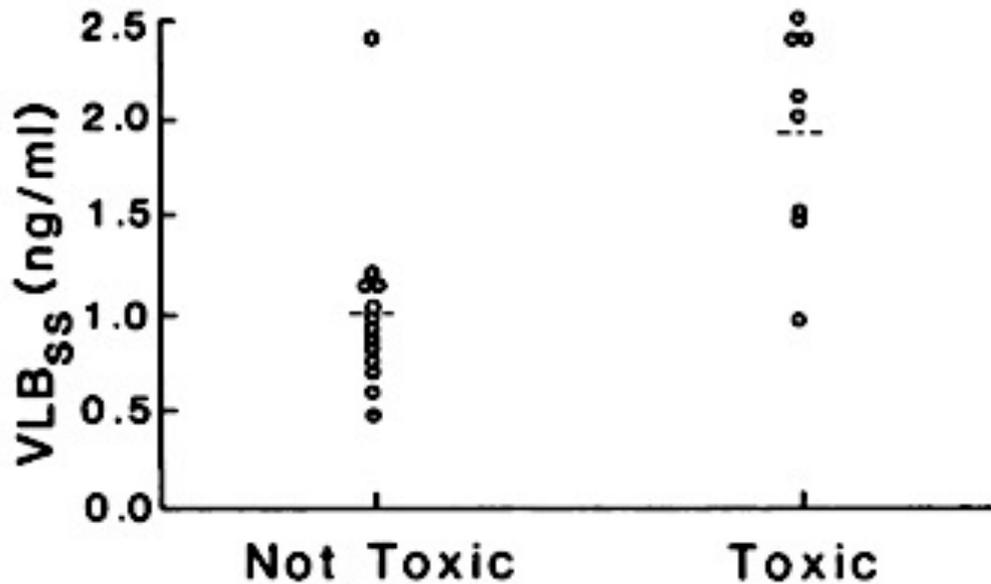


Fig 3.8 Comparazione delle Css di VBL tra i due gruppi di pazienti trattati. Si osserva come la Css media (linea tratteggiata) risultasse superiore nel gruppo dei pazienti con episodi di tossicità (gruppo “*Toxic*”) (da Ratain 1986)

L’anno successivo, gli stessi autori sviluppavano e validavano un modello di limited sampling strategies, riducendo da 16 a soli due campionamenti ematici i time point necessari a predire la farmacocinetica della VBL nell’uomo ($r=0,94$, $p<0,0001$) (Ratain 1987).

Nonostante in letteratura si possano trovare numerose pubblicazioni relative la ricerca di individualizzare la dose di VBL nel paziente oncologico, nessun dato attualmente è disponibile riguardo l’applicabilità clinica né riguardo correlazioni tra parametri farmacocinetici e osservazioni di tossicità o efficacia in studi prospettici o caso controllo.

Ad oggi in oncologia veterinaria, esistono solo sporadiche segnalazioni riguardo i parametri di farmacocinetica/farmacodinamica per l’esposizione ai chemioterapici nei cani in chemioterapia, in particolare sono studi che riguardano la farmacocinetica della doxorubicina (Selting 2006, Wittenburg 2014). Più spesso, la ricerca della dose “giusta” passa da trial di dose-escalation di farmaco. Con questa modalità piccoli gruppi di cani

(solitamente costituiti da almeno tre soggetti), vengono trattati con dosi crescenti di chemioterapico fino a che una certa dose è considerata eccessivamente tossica. A questo punto una più ampia popolazione viene trattata con la dose immediatamente inferiore a quella considerata eccessiva. Se i profili di tossicità ottenuti su quest'ultima popolazione vengono considerati "sicuri", quel dosaggio di farmaco viene considerato come MTD. Si intuisce quindi come l'aggiustamento di dose venga eseguito *a posteriori* sulla base di profili di tossicità studiati su popolazioni, spesso numericamente piccole, e che non necessariamente si finalizza con l'individualizzazione del regime di dosaggio per quello specifico soggetto (Bailey 2008).

Capitolo 4 - Scopo del lavoro

Sin dagli anni 40-50 del XX secolo, quando venne proposto l'utilizzo della BSA in sostituzione al peso corporeo nella formulazione di dosaggi farmacologici in pediatria oncologica, la maggior parte dei chemioterapici in oncologia umana e veterinaria vengono dosati per unità di BSA (Dawson 1940, Pinkel 1958, Gustafson 2013, Collins 2011). Tuttavia, ad oggi, non esiste una documentazione chiara riguardo la correlazione tra i parametri di farmacocinetica e il dosaggio per unità di BSA, rendendo quest'ultimo metodo spesso fallace, e in alcuni casi contraddittorio, nel predire efficacia e tossicità di un determinato trattamento (Desoize 1994, Reilly 1993, Powis 1987, Rodvold 1988).

Anche in Medicina Veterinaria, per esempio, è stata osservata maggior tossicità nei cani di taglia piccola rispetto ai cani grandi con melfalan, cisplatino, carboplatino e doxorubicina, se i farmaci venivano dosati per unità di BSA (Price 1998).

Per questi motivi, nelle ultime decadi del '900, molta ricerca in campo oncologico si è focalizzata sullo studio di modelli che riuscissero a predire con una buona approssimazione il comportamento farmacocinetico delle molecole più comunemente utilizzate con l'obiettivo di affinare i protocolli chemioterapici, non solo per categorie tumorali ma anche per classi di individui. L'uso della concentrazione plasmatica post somministrazione, e relativo calcolo dell'AUC o Cmax, è sembrato essere il metodo più realistico nel determinare la farmacocinetica di un chemioterapico (Evans 1989, Robert 1993). Tuttavia, alcuni lavori hanno dimostrato una variabilità dell'AUC fino a 10 volte tra i pazienti sottoposti allo stesso regime di dose di chemioterapico, rendendo assai complicato lo sviluppo di un metodo di dosaggio efficace e sicuro per una intera popolazione di soggetti (Eksborg 1990, Ratain 1987, Ratain 1991b). Di conseguenza, la ricerca ha spostato il proprio target sullo sviluppo di

modelli matematici che riuscissero a predire, con un certo grado di accuratezza, la dose ottimale di farmaco individuo per individuo (Collins 2011). Questa nuova concezione di farmacoterapia, prevede nella maggior parte dei casi, di studiare alcuni parametri di farmacocinetica ben precisi (AUC, Cmax, Css), paziente per paziente, dopo la prima somministrazione di chemioterapia. Questi parametri verranno poi comparati con dati di farmacocinetica definiti “ideali”, perché considerati efficaci e poco tossici, così da modificare i dosaggi successivi e personalizzare quindi il protocollo chemioterapico (Long 1987, Drusano 1988, Drusano 1994, Kashuba 1996).

Per superare gli svantaggi di questa procedura, che richiedendo numerosi prelievi ematici viene considerata poco applicabile nella pratica clinica sia per i costi che per il disagio arrecato al paziente, sono stati studiati e validati dei metodi di campionamento limitato (*limited sampling strategies*) che, con la misurazione delle concentrazioni plasmatiche a soli 2-3 time point prefissati, riescono a fornire informazioni di farmacocinetica con approssimazioni superiori all'80% (Van Warderman 1994). L'applicazione clinica in oncologia umana, di questi nuovi metodi di “individualizzazione” del dosaggio chemioterapico hanno prodotto risultati sorprendenti nel ridurre la tossicità da chemioterapia, talvolta riuscendo a migliorare l'efficacia del trattamento stesso (Gamelin 2008, Kline 2014, Saam 2011).

Nel cane la VBL è considerato il farmaco di prima scelta per il trattamento del mastocitoma, e viene utilizzata in regimi mono o polichemioterapici. Le pubblicazioni scientifiche riportano tossicità estremamente variabili all'interno delle varie popolazioni in studio, che fa presupporre un comportamento farmacocinetico molto differente da cane a cane, così come dimostrato nell'uomo (Arnold 2011, Rassnick 2008, Bailey 2008, Lu 1983, Ratain 1986).

L'obiettivo di questo studio è quello di studiare la farmacocinetica della VBL alla prima somministrazione in cani affetti da mastocitoma cutaneo e sviluppare una *limited sampling strategy* per predirne l'esposizione. Il secondo obiettivo del lavoro è quello di valutare se esiste un'associazione tra i valori di AUC individuali e la presenza di tossicità indotta da chemioterapia, principalmente ematologica e gastroenterica e i tassi di risposta tumorale.

Capitolo 5 Materiali e metodi

In questo lavoro sono stati inclusi tutti i cani di proprietà afferiti all'Ospedale Didattico Veterinario "M. Modenato" dell'Università di Pisa, nel periodo compreso tra Novembre 2013 e Maggio 2016, con diagnosi di mastocitoma cutaneo, sottoposti a trattamento chemioterapico con VBL, i cui proprietari hanno acconsentito alla partecipazione allo studio.

I cani venivano arruolati previa sottoscrizione da parte dei proprietari di un consenso informato concernente i rischi derivanti dal trattamento chemioterapico e dalle procedure eseguite in questo studio sperimentale.

Venivano esclusi quei pazienti che, per indole aggressiva o per eccessivo stress emotivo, richiedessero sedazioni, dato che la durata della procedura era stimata essere di circa 6 ore. Venivano inoltre cani con comorbilità (es. insufficienza epatica, insufficienza renale) che potessero influenzare la AUC di vinblastina.

La parte sperimentale è stata condotta seguendo le procedure di tutela del benessere e della salute animale (approvazione Organismo per il Benessere Animale, Università di Pisa, Prot. 9777)

5.1 Locali di svolgimento delle attività cliniche e di laboratorio

La parte di studio analitico della spettrometria di massa/HPLC per la ricerca di VBL nel siero canino si è svolta presso i laboratori del Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica, dell'Università di Pisa in collaborazione con il Dott. Saba.

La parte di raccolta dei campioni ematici, somministrazione di chemioterapia, stoccaggio dei campioni e gestione a lungo termine dei casi si è svolta presso l'Ospedale Didattico Veterinario "M. Modenato", del Dipartimento di Scienze Veterinarie, dell'Università di Pisa.

5.2 Ottimizzazione e validazione della metodica spettrometria di massa/HPLC per la ricerca di VBL nel siero canino

La metodica di spettrometria di massa è stata basata sulla quantificazione di molecole di transizione per la VBL e per la vinorelbina considerata come standard interno (SI). Le transizioni monitorate erano 406,2 --> 376,2, 406,2 --> 271,6, 406,2 --> 255,2 per la VBL e 390,3 --> 122,2 m/z, 390,3 --> 658,1, 390,3 --> 357,1 m/z per la vinorelbina. La fase mobile era costituita da una miscela di acido formico 0,1 % in acetonitrile/metanolo 80/20 v/v e acido formico 0,1% in acqua. La velocità di flusso era di 0,5 mL/min attraverso una colonna C18 1,7 µm 2,1 x 50 mm. Per la quantificazione delle concentrazioni di VBL venivano utilizzati i rapporti di aree dei picchi della VBL e del SI. La validazione del metodo è stata eseguita secondo le linee guida dell'European Medicines Agency (EMA 2011). Per questo sono state valutate il limite di quantificazione (LOQ), la ripetibilità intra-day e inter-day, effetto in matrice, tasso di recupero e la stabilità in matrice per i campioni congelati. La stabilità al congelamento è stata valutata a 1, 3, 9, e 14 mesi dal prelievo del campione.

- *Tecnica di estrazione*

La tecnica di estrazione in fase liquida prevedeva l'uso di diclorometano (VWR Prolabo®, Milano, Italia) come descritto precedentemente (Hamsher 2010). Un mL di acqua distillata addizionata con VBL (Vinblastina Teva°, Tevaitalia, Milano, Italia) e standard interno (vinorelbina, Navelbine, Pierre Fabre Pharma, Milano, Italia) a concentrazioni note veniva mescolato per 1 minuto con 1,2 mL di soluzione tampone (Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 9,5). Venivano quindi aggiunti 6 mL di diclorometano e mescolato intensivamente per un minuto. Successivamente la soluzione veniva posta in un agitatore per 15 minuti e successivamente centrifugata a 1000 g (3300 rpm) per 10 minuti. La fase organica veniva separata e trasferita in tubi di vetro. La metodica veniva

ripetuta con altri 6 mL di diclorometano. Successivamente tutta la fase organica recuperata veniva evaporata e portata a secco con N₂ a 30-40°C. Dopo alcuni tentativi di estrazione con la metodica descritta abbiamo deciso di ridurre il volume di diclorometano da 6 mL a 3 mL e di aggiungere dell'alcol 2-isopropilico (VWR Prolabo®, Milano, Italia) in rapporto 1:6 v/v per ridurre la formazione di emulsione durante l'agitazione dei campioni e ottimizzare la metodica. La fase organica veniva poi prelevata al di sotto del menisco di separazione per un totale di 3 mL a fine delle 2 estrazioni. Il residuo secco veniva quindi recuperato con 200 µL di una soluzione di ammonio acetato 5 mM, metanolo e acetonitrile (2:1:1 v/v/v). Infine il campione veniva trasferito in piastre da autocampionamento per la spettrometria di massa e stoccate a 15°C in attesa di essere analizzati. Tutti i campioni venivano analizzati entro 6 ore dalla preparazione.

I campioni di plasma dei cani oggetto di studio venivano costituiti in questo modo: 0,5 mL di plasma, una volta scongelato, veniva addizionato con 0,5 mL di SI alla concentrazione di 25 ng/mL. Successivamente i campioni venivano trattati con la metodica di estrazione sopradescritta, portati a secco, risospesi con soluzione di ammonio acetato, acetonitrile e metanolo e analizzati. La concentrazione finale di VBL in ogni campione veniva estrapolata tramite la curva di calibrazione e le aree dei picchi misurate.

- *Curva di calibrazione*

Per la curva di calibrazione venivano allestiti campioni in triplo a concentrazione nota di VBL da 0,39 ng/mL a 50 ng/mL (0,39 - 0,78 - 1,56 - 3,12 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50) con 12,5 ng/mL di SI in plasma di cani sani, non sottoposti ad alcun trattamento farmacologico. Questi campioni venivano trattati con la metodica di estrazione ed iniettati allo stesso modo dei campioni di plasma dei cani trattati e inclusi

nello studio.

5.3 Preparazione del paziente, somministrazione chemioterapica e prelievi ematici.

Il giorno del primo trattamento chemioterapico ai cani, previa tosatura di aree di pelo localizzate in prossimità di almeno due vene periferiche di facile accesso e seguendo le comuni procedure di disinfezione locali, venivano applicati due cateteri venosi temporanei di dimensioni idonee alla taglia del paziente. Uno dei due cateteri veniva utilizzato per la somministrazione di chemioterapia e identificato con una lettera “C” posta a pennarello indelebile sul nastro adesivo utilizzato per fissare e bloccare l’accesso venoso. L’altro catetere invece veniva utilizzato per l’esecuzione dei prelievi ematici.

Tutti i cani venivano pretrattati con Maropitant (Cerenia®, Zoetis, Louvain-la-Neuve, Belgio) alla dose di 1 mg/kg sottocute oppure alla dose di 2 mg/kg *per os*.

Il trattamento chemioterapico prevedeva l’utilizzo di VBL (Vinblastina Teva®, Tevitalia, Milano, Italia) somministrata a 2 mg/m² endovena in bolo rapido (circa 30-60”). La dose necessaria di chemioterapico veniva preparata sotto cappa di aspirazione biologica di II tipo a flusso di aspirazione verticale, presso l’edificio preposto ai trattamenti chemioterapici del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell’Università di Pisa. Per la preparazione e somministrazione di farmaci antitumorali venivano utilizzati sistemi chiusi (Teva®, Milano, Italia) e i necessari dispositivi di sicurezza individuale come richiesto dalle attuali linee guida per la manipolazione di farmaci antitumorali a potenziale rischio cancerogeno (ECVIM 2007).

Subito prima del trattamento chemioterapico veniva collezionato un campione di sangue venoso e suddiviso in un’ aliquota da 1 mL in provette contenenti EDTA e in un’altra da 2,5 mL in provette contenenti litio eparina. Il primo campione veniva

utilizzato per eseguire un profilo ematologico completo pretrattamento mediante IDEXX Procyte Dx®, valutazione morfologica e conta differenziale dello striscio ematico.

Il secondo campione veniva conservato a temperatura ambiente in attesa del collezionamento dei campioni successivi. In ogni soggetto, venivano poi prelevati 2,5 mL di sangue venoso a 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 360 minuti dopo la somministrazione di VBL e collezionati in provette contenenti litio eparina. Tutti i campioni ematici eparinizzati venivano poi centrifugati a 3000 rpm per 4 minuti, e la quota di surnatante separata e trasferita in eppendorf da 1,5 mL, identificate mediante la trascrizione della data di campionamento, numero di cartella clinica del paziente e una sigla costituita dalla lettera “T” riferita alla variabile “tempo”, seguita da un numero tra 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 360, riferito al momento di prelievo di sangue. “T0” veniva considerato il campione di plasma pretrattamento.

Le aliquote di plasma ottenute venivano poi congelate e stoccate a -80° per un massimo di 14 mesi.

Subito dopo l’ultimo prelievo ematico, entrambi i cateteri venosi venivano poi rimossi, avendo cura di ridurre al minimo le possibili contaminazioni ambientali mediante l’utilizzo di ipoclorito di sodio al 10% come inattivante chimico.

5.4 Raccolta dati, valutazione di efficacia e tossicità del trattamento chemioterapico

Dei pazienti arruolati venivano raccolti il segnalamento, il peso, il grado istologico e lo stadio clinico del mastocitoma classificato secondo lo scoring proposto da World Health Organization (Owen 1980) (Tab. 5.1).

Tabella 5.1 Stadiazione clinica mastocitoma canino

Descrizione

<i>Stadio I</i>	Tumore unico confinato nel derma, senza interessamento dei linfonodi regionali.
<i>Stadio II</i>	Tumore unico confinato nel derma, con interessamento dei linfonodi regionali.
<i>Stadio III</i>	Tumori dermici multipli o grosso tumore infiltrante, con o senza interessamento dei linfonodi regionali.
<i>Stadio IV</i>	Qualsiasi tumore con metastasi a distanza o recidiva con metastasi (incluso l'interessamento del sangue periferico e del midollo osseo).

Per ogni stadio esiste un sottostadio "a" o "b" in base alla assenza o presenza di sintomi sistemici, rispettivamente.

Per quanto riguarda la tossicità indotta dal trattamento chemioterapico i cani sono stati monitorati nei primi 7 giorni mediante contatti telefonici con i proprietari e raccogliendo informazioni riguardanti gli effetti collaterali associati all'impiego di VBL. Veniva posta attenzione al sito di inoculo per tossicità da stravasamento o flebite; venivano poste domande riguardo la presenza o meno di modificazioni nelle normali abitudini di vita quotidiana del cane con particolare attenzione all'interazione sociale e all'affaticabilità e nelle grandi funzioni organiche intese come appetito e sete, defecazione e urinazione. Inoltre veniva raccolta qualsiasi altra informazione che poteva essere correlata con il trattamento chemioterapico.

La presenza e gravità delle tossicità veniva classificata secondo le linee guida pubblicate dal *Veterinary Cooperative Oncology Group* (VCOG 2011) (Tab 5.2).

Tabella 5.2 Stadiazione delle tossicità secondo la classificazione del *Veterinary Cooperative Oncology Group*. In questa tabella sono riportate e riassunte solo le categorie di tossicità più frequenti riportate con l'impiego di VBL (modificata da VCOG 2011)

Effetto collaterale	Grado di tossicità				
	1	2	3	4	5
Reazione locale	Indolenzimento	Eritema con segni di flebite	Ulcerazione/necrosi	C.R.V.	Morte
Anoressia	Cambiamento di dieta per manetene appetito	Assunzione giornaliera ridotta per <3 giorni	Durata >3 giorni con dimagrimento del 10%	C.R.V.	Morte
Diarrea	>2 defecazioni/die oltre il normale o calo consistenza	3-6 defecazioni/die oltre il normale	>6 defecazioni/die oltre il normale	C.R.V.	Morte
Vomito	<3 episodi in 24h	3-10 episodi in 24h, <5/die, massimo per 48h	Episodi multipli o della durata >48h	C.R.V.	Morte
Nausea	Ridotto appetito	Salivazione o masticazioni a vuoto <3 giorni	Salivazione o masticazioni a vuoto 3-5 giorni	Salivazione o masticazioni a vuoto >5 giorni	Morte
Abbattimento	-	Sonnolenza che non modifica abitudini quotidiane	Ottundimento del sensorio, stupor	Coma	Morte
Neuropatia periferica	Asintomatica	Debolezza sintomatica che non modifica abitudini quotidiane	Debolezza che modifica abitudini quotidiane	Paralisi	Morte

n= numero assoluto di cellule; L.I.= limite inferiore di riferimento del laboratorio; C.R.V.: Complicazione a Rischio di Vita

A 7 giorni dalla somministrazione di chemioterapia, veniva eseguito il primo controllo clinico e ripetuto un'esame ematologico per valutare la tossicità ematologica. La presenza e gravità della tossicità ematologica veniva indicate come riportato in Tabella 5.3.

Tabella 5.3 Stadiazione della tossicità ematologica secondo la classificazione del *Veterinary Cooperative Oncology Group* (modificata da VCOG 2011)

Effetto collaterale	Grado di tossicità				
	1	2	3	4	5
HGB (g/dL)	10 - L.I.	10 - 8	8 - 6,5	<6,5	Morte
HCT (%)	30 - L.I.	20 - 29,9	15 - 19,9	<15	Morte
NEU.filia (K/ μ L)	-	50 - 100	>100	Segni clinici da leucostasi	Morte
NEU.penia (n/ μ L)	1500 - L.I.	1000 - 1499	999 - 500	<500	Morte
PLT (K/ μ L)	100 - L.I.	50 - 99	25 - 49	<25	Morte

HGB: emoglobina; HCT: ematocrito; NEU: neutrofilii; PLT: piastrine; n: numero assoluto di cellule; L.I.: limite inferiore di riferimento del laboratorio

In caso di malattia macroscopica, il tumore primario veniva misurato il giorno del trattamento chemioterapico nonché nei successivi 7 e 28 giorni. L'efficacia veniva valutata e classificata secondo le recenti linee guida pubblicate dal *Veterinary Cooperative Oncology Group* (Nguyen 2013) (Tab. 5.4)

Tabella 5.4 Valutazione della risposta tumorale alla terapia oncologica secondo la classificazione del *Veterinary Cooperative Oncology Group* (modificata da Nguyen 2013)

Dimensioni massa primaria	Nuove lesioni	Risposta
Non misurabile	Assenti	CR
Ridotto >30%	Assenti	PR
Ridotto <30%	Assenti	SD
Aumentato <20%	Assenti/Presenti	PD
Aumento >20%	Presenti	PD

CR: Remissione completa. PR: Remissione Parziale. SD: Malattia stabile.
PD: Malattia progressiva

Per risposta completa (CR, *Complete remission*) si intende la completa scomparsa clinica o mediante tecniche strumentali della lesione tumorale target associata all'assenza di nuove lesioni o metastasi regionali o a distanza. Per remissione parziale (PR, *Partial Remission*) si intende la riduzione del volume o diametro della lesione target di almeno il 30% in assenza di nuove lesioni o metastasi regionali o a distanza. Per malattia stabile (SD, *Stable Disease*) si intende la riduzione del tumore inferiore al 30% del volume/diametro iniziale o un aumento delle dimensioni inferiore al 20% in assenza di nuove lesioni o metastasi regionali o a distanza. Per malattia progressiva (PD, *Progressive Disease*) si intende l'aumento di dimensioni tumorali di almeno il 20% o la presenza di nuove lesioni o metastasi regionali o a distanza. Venivano inoltre raccolti i dati riguardanti lo sviluppo di tossicità croniche/tardive seguendo i pazienti con follow-up clinici trimestrali ed eseguendo esami ematobiochimici e/o di diagnostica per immagini periodici. I controlli venivano eseguiti

durante le 12 settimane di trattamento chemioterapico e poi a 1, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 mesi dalla fine del trattamento e poi ogni 6 mesi, seguendo le linee guida recentemente pubblicate sulla gestione del mastocitoma canino (Blackwood 2012). Infine, venivano valutati i tempi di sopravvivenza mediani (MST, Median survival Time) e i tempi di malattia libera (DFI, Disease Free Interval) o tempo di progressione tumorale (TTP, Tumor Time Progression). MST è stato considerato il tempo dal giorno della diagnosi di mastocitoma al giorno della morte dell'animale. DFI è stato considerato come il tempo intercorso dall'escissione chirurgica allo sviluppo di recidiva o metastasi. Infine, TTP è stato considerato come il tempo intercorso tra il momento dell'inizio del trattamento su malattia macroscopica e la progressione della malattia.

5.5 Elaborazione dei dati raccolti

I dati relativi ai rapporti tra le aree del picco di VBL e di standard interno sia delle soluzioni usate per la curva di calibrazione che per i campioni sono stati analizzati mediante l'analisi della regressione lineare pesata $1/x$. La AUC della VBL (AUC_m, AUC misurata) è stata calcolata in ogni paziente tramite il metodo trapezoidale mediante il programma WinNonlin v. 5.3 per dati di plasma iniettati in bolo endovenoso con modello di analisi non compartimentale (NCA Model 201). La AUC_m veniva calcolata con almeno 4 punti.

Mediante una regressione lineare multipla è stato calcolato un metodo di limited sampling strategies. Sono stati inseriti nel modello tutte le possibili terzine di time point per ogni singolo caso, e infine è stata considerata la terzina con il valore di R^2 superiore associato a una significatività $p < 0,05$. Il modello di regressione multipla restituiva poi, una formula in grado di predire la AUC (AUC_p, AUC predetta) dalla valutazione della concentrazione plasmatica a quei precisi *time point*:

$$\text{AUC}_p (\text{min} \cdot \text{ng/mL}) = a + b \cdot C_{T_x} + c \cdot C_{T_y} + d \cdot C_{T_z}$$

dove “a”, “b”, “c” e “d” sono coefficienti resi dal modello, e C è la concentrazione plasmatica di VBL misurata ad ogni *time point* (Tx, Ty, Tz).

In seguito mediante il test di correlazione di Spearman è stata correlata la AUCp alla AUCm.

I cani sono stati separati in due gruppi in base alla tossicità ematologica, in cani con effetti collaterali e cani senza effetti collaterali. I cani con malattia misurabile sono stati divisi in pazienti con risposta clinica evidente a 7 e 28 giorni se la risposta prevedeva PR o CR, in caso di SD o PD i soggetti rientravano nel gruppo con assenza di risposta misurata a 7 e 28 giorni dal trattamento. Il Mann-Whitney U test per campioni indipendenti è stato utilizzato per valutare l’associazione tra il peso e lo sviluppo di tossicità ematologica. Lo stesso test è stato utilizzato per valutare l’associazione tra la AUCm e la tossicità ematologica e risposta clinica a 7 e 28 giorni dal trattamento nei rispettivi gruppi. Per la tossicità acuta ematologica, il test Wilcoxon per dati appaiati è stato utilizzato per confrontare i valori di globuli bianchi totali (WBC, white blood cell), neutrofili assoluti (NEUT), piastrine (PLT, platelet) prima e 7 giorni dopo il trattamento chemioterapico. Per la tossicità cronica ematologica e organica, il test Friedman è stato utilizzato per confrontare le modificazioni nel tempo delle variabili emoglobina (HGB), ematocrito (HCT), fosfatasi alcalina (ALP), alanino transaminasi (ALT), gamma-glutamilttransferasi (GGT), bilirubina totale (BILT), creatinina (CREA) e urea (U).

E’ stata infine misurata la correlazione tra il peso degli animali e lo sviluppo di tossicità mediante la correlazione per dati non parametrici di Spearman.

Capitolo 6 Risultati

Tra novembre 2013 e maggio 2016, presso l'Ospedale Didattico Veterinario M. Modenato dell'Università di Pisa sono stati trattati con VBL 13 cani. A tutti i proprietari è stato offerto di poter essere inclusi in questo studio sperimentale ma in due occasioni i proprietari non hanno accettato di parteciparvi e per questo motivo in totale ne sono stati inclusi undici cani.

Degli undici cani inclusi nello studio nove erano cani di razza pura (2 golden retriever, 2 boxer, 1 alaskan malamute, 1 setter inglese, 1 labrador, 1 barboncino, 1 springer spaniel) e due erano meticci. I cani avevano un'età media di 9,8 anni (range: 5,4-11,2 anni); sette erano maschi, di cui 6 interi, e 4 erano femmine, di cui 3 sterilizzate. Il peso medio dei cani era di 30,2 kg (range: 5-54 kg) (Tab 6.1).

Sei cani avevano una diagnosi istologica mentre in 5 casi era disponibile solo la diagnosi citologica. In tutti e sei i casi erano di grado istologico 2. Tre cani erano classificati in stadio clinico I, uno in II, 6 in III, e un cane aveva metastasi viscerali (stadio IV).

Tutti i cani ricevevano una dose di VBL di 2 mg/m². Al momento della somministrazione di chemioterapia, nove cani su 11 erano in terapia con antiistaminici (ranitidina 2 mg/kg, BID, PO e ciproeptadina 0,3 mg/kg, BID, PO, in tutti i casi) e 2 cani erano anche in terapia con corticosteroidi (metilprednisolone o prednisone 1-1,5 mg/kg/die PO).

Tabella 6.1 Dati demografici dei cani inclusi nello studio

Caso	Età (anni)	Peso (kg)	Farmaci (P, A)	Grado istologico	Stadio clinico
1	9,2	54	no	2	1
2	12,2	14	(A)	2	1
3	5,4	20	(A)	2	1
4	12,6	34	(P, A)	cito	3

5	11,2	38	(A)	cito	3
6	6,8	46	no	2	2
7	8,1	35	(A)	2	3
8	10,6	29	(A)	cito	4
9	11,8	37	(P, A)	cito	3
10	8,3	20	(A)	2	3
11	12	5	(A)	cito	3

P: prednisone; A:antistaminici

6.1 Validazione del metodo

L'accuratezza e la precisione intraday per campioni iniettati 3 volte dalle ore 8:00 alle ore 22:00 nello stesso giorno e l'accuratezza e la precisione interday misurata 3 volte nell'arco di 14 mesi erano superiori al 80% per il campione con concentrazione al LOQ e superiori all'85% per i campioni con concentrazione superiori (Tab 6.2). Il LOQ è stato di 0,5 ng/mL.

Tabella 6.2 Valutazione della precisione e della accuratezza intra- ed interday nella misurazione strumentale della vinblastina con la metodica di spettrometria di massa

	CONCENTRAZIONE NOMINALE	CONCENTRAZIONE OSSERVATA	PRECISIONE (%)	ACCURATEZZA (%)
INTRADAY	0,5	0,53 ± 0,05	9,34	94,3
	2	1,96 ± 0,08	4,25	98,0
	10	10,14 ± 0,76	7,50	98,6
	50	52,91 ± 1,36	2,57	94,5
INTERDAY	0,5	0,49 ± 0,07	15,17	98,1
	2	2,07 ± 0,12	5,83	96,6
	10	11,71 ± 0,61	5,20	85,4
	50	53,59 ± 1,46	2,72	93,3

L'effetto matrice calcolato era del 61,2% ± 6,7% per la VBL e 72,3% ± 4,5% per la vinorelbina (Tab 6.3). La capacità di recupero medio era 67,5% ± 4,4% per la VBL e 69,2% ± 3,4% per la vinorelbina.

Tabella 6.3 Misurazione dell'effetto matrice della capacità di recupero della vinblastina e vinorelbina con la metodica di estrazione utilizzata nel presente studio e misurazione analitica con spettrometria di massa

	VINBLASTINA (%)	VINORELBINA (%)
Effetto matrice	61,2 ± 6,7	72,3 ± 4,5
Capacità di recupero	67,5 ± 4,4	69,2 ± 3,4

6.2 Valutazione di tossicità e risposta a breve e lungo termine

I dati riguardanti i parametri ematologici pretrattamento e 7 giorni dopo sono stati riassunti nella tabella 6.4.

Nessun cane presentava leucopenia, neutropenia, piastrinopenia o ipoprotidemia a T0. Sei di 11 cani (54,5 %) sviluppavano neutropenia (4 di grado 1, 2 di grado 2) sette giorni dopo la somministrazione. In tutti i casi la neutropenia era asintomatica e non necessitava alcun tipo di trattamento. Nessun cane sviluppava piastrinopenia. Non è stata trovata associazione tra il peso corporeo e lo sviluppo di effetti collaterali (Mann-Whitney test). Non è stata trovata alcuna associazione tra lo sviluppo di tossicità e i valori di globuli bianchi, neutrofili, piastrine e proteine totali a T0 (test Mann-Whitney). Non è stata trovata associazione tra l'uso di cortisone e lo sviluppo di tossicità (test esatto di Fisher). Prima del trattamento il numero di globuli bianchi, neutrofili e piastrine erano in media $11,57 \pm 5,8$ k/ μ L, $9,04 \pm 5,6$ k/ μ L e 378 ± 162 k/ μ L, rispettivamente. Dopo il trattamento risultavano $6,16 \pm 2,7$ k/ μ L, $3,90 \pm 2,2$ k/ μ L e 376 ± 202 k/ μ L, rispettivamente. E' stata trovata una differenza significativa tra il numero di globuli bianchi e di neutrofili prima e dopo la somministrazione di chemioterapia ($p=0,001$ e $p=0,002$ rispettivamente, test Wilcoxon per dati appaiati) (Fig. 6.1 e 6.2).

Tabella 6.4 Dati ematologici dei cani prima e dopo la chemioterapia (VBL 2 mg/m² endovenosa in bolo rapido). In azzurro i casi che sviluppavano tossicità ematologica

Caso	N.o dosi VBL	GB-T₀ (K/μL)	NEUT-T₀ (K/μL)	PLT-T₀ (K/μL)	Ptot-T₀ (g/dL)	WBC-T₁ (K/μL)	NEUT-T₁ (K/μL)	PLT-T₁ (K/μL)
1	8	12,53	8,02	305	7,8	6,25	3,00	371
2	8	6,33	4,66	323	6,8	3,47	2,29	427
3	8	12,85	11,01	504	7,5	4,69	2,99	440
4	4	24,83	22,32	815	7,0	6,82	5,43	892
5	6	6,02	3,90	291	6,7	5,58	4,58	238
6	8	10,00	8,25	307	6,8	4,81	1,43	325
7	3	6,19	3,29	438	7,0	4,26	1,98	445
8	8	6,39	4,60	271	6,8	2,17	1,00	348
9	8	17,81	14,96	255	6,9	9,21	7,29	176*
10	2	12,42	8,93	314	8,4	10,9	6,26	362
11	3	11,87	9,52	335	5,8	9,64	6,68	115*

WBC: Globuli bianchi; NEUT: Neutrofili; PLT: Piastrine; Ptot: proteine totali; T₀: tempo zero (pretrattamento); T₁: dopo 7 giorni; *:parametri confermati essere sottostimati per presenza di aggregati piastrinici

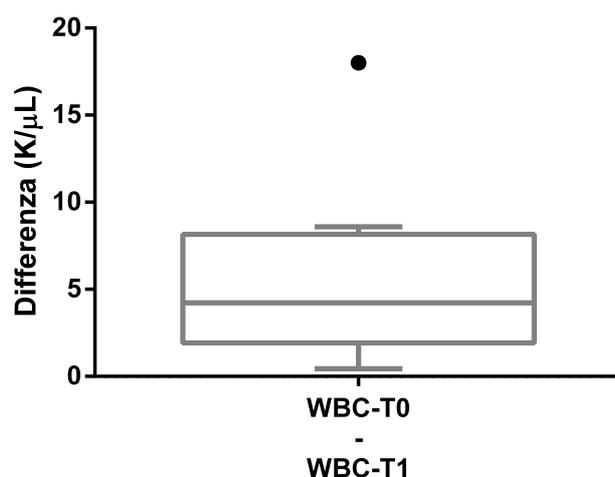


Figura 6.1 Rappresentazione grafica della differenza significativa tra i valori di globuli bianchi totali (WBC) prima (T0) e dopo (T1) la somministrazione di chemioterapia (test Wilcoxon per dati appaiati)

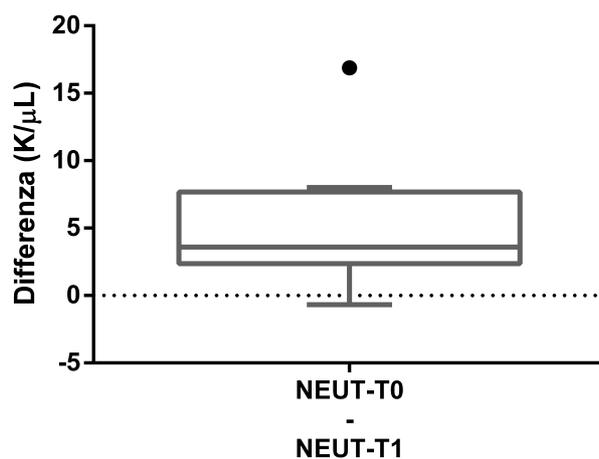


Figura 6.2 Rappresentazione grafica della differenza significativa tra i valori di neutrofilii (NEUT) prima (T0) e dopo (T1) la somministrazione di chemioterapia (test Wilcoxon per dati appaiati)

Solo due cani sviluppavano tossicità gastroenterica, in entrambi i casi considerata di grado 1. Un cane presentava conati non produttivi senza alterazione dell'appetito per una durata inferiore alle 48 ore, l'altro mostrava feci molli a due defecazioni consecutive entro 24 ore con risoluzione spontanea della sintomatologia. Nessun cane sviluppava tossicità d'organo o cronica, direttamente correlabile all'impiego di VBL, durante il periodo di follow-up (mediana 425 giorni; range 33-

1156 giorni). Un cane sviluppava tossicità renale di grado 2 (creatinina 2.3 mg/dL) 15 mesi dopo il trattamento chemioterapico. Un altro sviluppava tossicità epatica asintomatica di grado 2 con incremento di fosfatasi alcalina, alanino transaminasi e gamma-glutamilttransferasi entro il primo mese di terapia che si risolse con terapia di supporto. Infine un cane sviluppava ipertrigliceridemia persistente 18 mesi dopo il protocollo.

La risposta clinica era valutabile in otto (72,7%) soggetti su 11 dopo 7 giorni (R₇) e 7 di 11 dopo 28 giorni (R₂₈). In tre casi la risposta clinica non era valutabile per l'impiego della chemioterapia successivamente ad un'escissione completa del tumore. Un cane non poteva essere monitorato dopo 28 giorni perchè il proprietario decideva di uscire dal protocollo dopo 14 giorni dall'inizio del trattamento e veniva perso il follow-up. Di 8 cani 4 avevano una risposta clinica a 7 giorni per un tasso di risposta del 50%, in particolare si osservavano 3 remissioni parziali e una remissione completa. Dopo 28 giorni il tasso di risposta era del 57% con 3 cani in malattia progressiva. I tassi di risposta sono stati riassunti in tabella 6.5.

Tabella 6.5 Tasso di risposta a 7 e 28 giorni dall'inizio del trattamento chemioterapico

Caso	R₇	R₂₈
1	NV*	NV*
2	PR	PD
3	SD	PR
4	PR	PR
5	SD	PD
6	SD	PR
7	SD	NV•
8	PR	PD
9	CR	CR
10	NV*	NV*
11	NV*	NV*

R: Risposta; CR: Remissione completa;
PR: Remissione parziale; SD; malattia

stabile; PD: malattia progressiva; NV:
non valutabile; *: risposta non valutabile
per chemioterapia adiuvante su malattia
microscopica; •: risposta non valutabile
per perdita follow-up

Nessuna associazione è stata trovata tra i cani con risposta clinica e la presenza o meno di tossicità ematologica o gastroenterica (test esatto di Fisher).

Sei di 11 cani hanno completato il trattamento con 8 somministrazioni di VBL, per un totale di 66 trattamenti. Tre cani hanno interrotto il trattamento prima del termine per malattia progressiva. Un cane ha interrotto il protocollo su decisione dei proprietari per insorgenza di tossicità gastroenterica lieve dopo la sesta somministrazione. In un caso invece è stato interrotto il protocollo dopo due somministrazioni per decisione dei proprietari in assenza di effetti collaterali. I cani sono stati seguiti con un follow-up mediano di 425 giorni (range 33-1156 giorni). Sei cani erano morti alla fine dello studio con un tempo mediano di sopravvivenza di 172 giorni (range 33-560). Il mastocitoma è stato la causa di morte in quattro dei sei casi, mentre negli altri due casi i cani avevano sviluppato altre neoplasie. Un cane aveva sviluppato una neoplasia orale non indagata ulteriormente, mentre un cane aveva sviluppato un sarcoma retroperitoneale, un chemodectoma e un nuovo mastocitoma 14 mesi dopo la diagnosi. Questi ultimi due cani erano stati trattati in regime neoadiuvante e non mostravano segni di progressione della malattia il giorno della morte. In un caso è stato perso il follow-up dopo 126 giorni, mentre 4 cani erano vivi alla conclusione dello studio con tempi di follow-up mediani di 1030 giorni (range 798-1156 giorni). Il DFI dei 3 cani trattati con chemioterapia adiuvante era di 923, 1137 e 1156 giorni e tutti i cani erano vivi e in remissione completa al termine dello studio. I cani trattati con chemioterapia neoadiuvante avevano un TTP mediano di 86 giorni (range 28-923 giorni) e tutti i cani erano morti al termine dello studio.

6.3 Concentrazioni plasmatiche di vinblastina, AUC e limited sampling strategies

Complessivamente sono stati raccolti 110 campioni di plasma. Dal rapporto dei picchi di aree di VBL e di standard interno, tramite la curva di calibrazione sono state calcolate le concentrazioni di VBL ai vari *time point* (Tab 6.6, Fig 6.3)

Tabella 6.6 Dati riguardanti le concentrazioni di vinblastina medie e le rispettive deviazioni standard ai vari *time point*

Tempo (min)	Concentrazione VBL media (ng/mL)	DS (ng/mL)
5	4,48	1,62
15	2,58	0,89
30	1,62	0,52
45	1,56	0,50
60	1,24	0,52
90	1,25	0,52
120	1,19	0,56
180	1,00	0,47
360	0,55	0,11

VBL: vinblastina; DS: deviazione standard

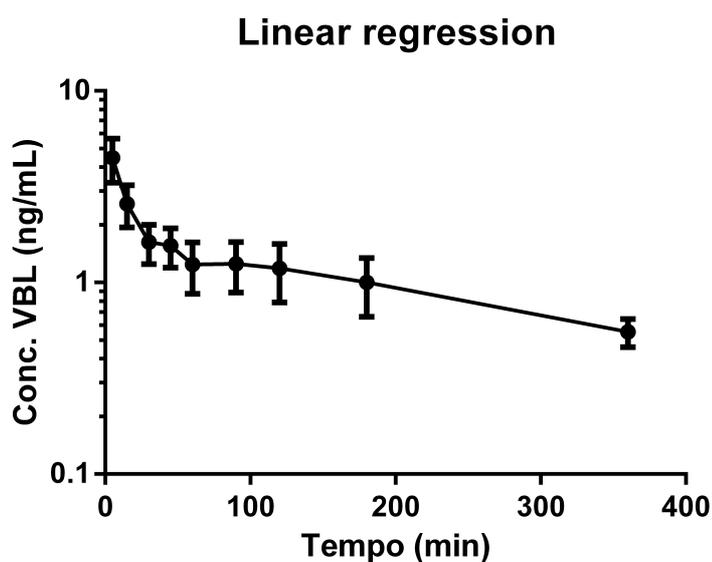


Figura 6.3 Il grafico rappresenta il logaritmo della concentrazione media di VBL in funzione del tempo. Le barre rappresentano l'intervallo di confidenza al 95%.

La AUC_m media è stata 282,1 ± 91,7 min*ng/mL. La AUC_m media del gruppo di cani che sviluppava effetti collaterali è risultata tendenzialmente superiore al gruppo di controllo, ma non statisticamente significativo (305,2 ± 113,4 min*ng/mL e 254,4 ± 56,4 min*ng/mL, rispettivamente; Mann-Whitney U test) (Tab. 6.7).

Tabella 6.7 AUC_m dei singoli casi associati a effetti collaterali e risposte cliniche.

Caso	AUC _m (min*ng/mL)	Effetti		
		collaterali	R ₇	R ₂₈
1	343,0	SÌ	NV	NV
2	357,7	SÌ	PR	PD
3	76,9	SÌ	SD	PR
4	298,5	NO	PR	PR
5	248,7	NO	SD	PD
6	324,0	SÌ	SD	PR
7	367,1	SÌ	SD	NV
8	364,6	SÌ	PR	PD
9	294,0	NO	CR	CR
10	159,5	NO	NV	NV
11	272,0	NO	NV	NV

R: Risposta; CR: Remissione completa; PR: Remissione parziale; SD; malattia stabile; PD: malattia progressiva; NV: non valutabile

Nei gruppi di cani suddivisi in base alla risposta a 7 e 28 giorni la AUC_m media non risultava differente. Nei gruppi con risposta clinica a 7 e 28 giorni la AUC_m media era 328,3 ± 37,4 min*ng/mL e 248,0 ± 115,4 min*ng/mL, rispettivamente. Nei gruppi dove non si osservava risposta invece era 253,8 ± 128,3 min*ng/mL a 7 giorni e 323,0 ± 65,1 min*ng/mL a 28 giorni. (Tab 6.8).

Tabella 6.8 AUC_m media dei cani suddivisi in gruppi per presenza o assenza di effetti collaterali e risposta clinica.

	Effetti collaterali		Risposta 7 giorni		Risposta 28 giorni	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO
AUC _m media ± DS (min*ng/mL)	305,2 ± 113,4	254,4 ± 56,4	328,3 ± 37,4	253,8 ± 128,3	248,0 ± 115,4	323,0 ± 65,1

DS: deviazione standard

Per lo sviluppo di un limited sampling strategy (LSS), la terzina costituita da T15, T30 e T60 è risultata la terzina con il più alto fattore di regressione (R^2 aggiustato= 0,8577; $p= 0,0018$). La formula resa dal modello ci ha permesso di calcolare la AUC_p e corrispondeva a:

$$\text{AUC}_p (\text{min} \cdot \text{ng/mL}) = 25,01 + 10,96 \cdot (\text{Conc}_{T15}) + 110,09 \cdot (\text{Conc}_{T30}) + 50,39 \cdot (\text{Conc}_{T60})$$

La AUC_p media calcolata era $281,7 \pm 89,1$ min*ng/mL. La correlazione tra AUC_m e AUC_p per ogni singolo caso risultava essere buona ($R^2 = 0,9227$) (Fig. 6.4).

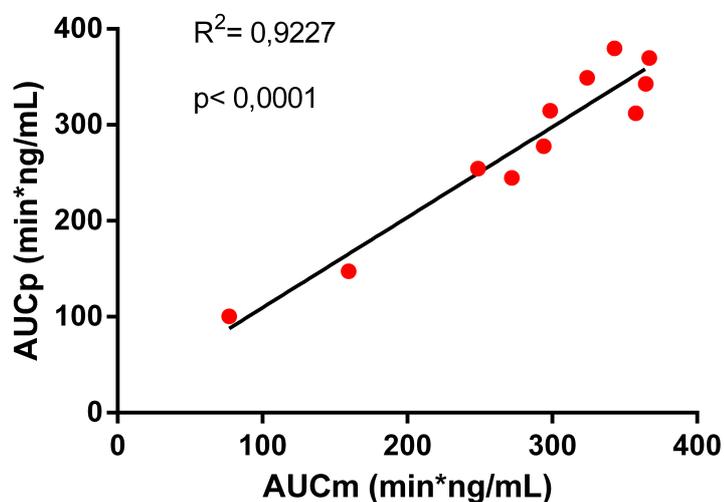


Figura 6.4. Correlazione tra AUC_p calcolata mediante la formula ricavata con i tre *time point* selezionati (T15, T30 e T60) e la AUC_m.

Capitolo 7 Discussioni

In oncologia umana, l'impiego di modelli di dosaggio chemioterapico "individualizzato" ha prodotto risultati sorprendenti nel migliorare la qualità di vita dei pazienti in terapia. Diversi autori, a tal proposito, ne hanno riportato la capacità di ridurre il numero di eventi di tossicità associati a chemioterapia e la loro gravità (de Jonge 2005). Tuttavia, questa nuova metodica deve attraversare diverse fasi sperimentali con l'obiettivo iniziale di conoscere a fondo le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche degli agenti antitumorali nell'uomo ed in seguito di sviluppare dei protocolli applicabili nella pratica clinica quotidiana. La prima fase ha come limite il fatto di necessitare di numerosi prelievi ematici, aumentando il disagio del paziente e i costi per il sistema sanitario (Climente-Martí 2003). La seconda fase ha come obiettivo quello di sviluppare dei modelli matematici che possano predire l'esposizione individuale ai farmaci tramite pochi prelievi ematici a dei prestabiliti *time points* (Van Warmerdan 1994). Uno di questi modelli viene definito *limited sampling strategy* (LSS).

In medicina veterinaria, l'impiego di dosaggi basati sulla BSA è dibattuto, per l'enorme eterogeneità della popolazione canina che passa da animali molto piccoli che possono pesare anche poche unità di kg fino ad animali considerati giganti che possono raggiungere diverse decine di kg, basti pensare all'enorme differenza morfologica tra un pincher nano e un alaskan malamute. Alcuni autori infatti, hanno messo in dubbio la capacità del BSA di riuscire a predire e uniformare la tossicità da chemioterapia, non tenendo di conto, ad esempio, delle differenze farmacocinetiche e farmacodinamiche di queste molecole tra le varie razze (Price 1998). Per questo motivo ad oggi alcuni chemioterapici possono ancora essere dosati su unità di peso corporeo (es. clorambucile, melfalan) mentre altri ancora cambiano regime di dosaggio in base a

valori soglia di peso corporeo (es. doxorubicina). Se, infine, ci soffermiamo a considerare che nell'uomo è stato ampiamente documentato che le differenze farmacocinetiche tra individuo e individuo possono influenzare notevolmente lo sviluppo di tossicità da chemioterapia (Van Den Bongard 2000), si intuisce come sia ancora più necessario calzare *ad hoc* i protocolli antitumorali cane per cane (nda).

Per quanto riguarda la valutazione della tossicità da chemioterapia in base all'esposizione al farmaco, ad oggi in medicina veterinaria, esiste scarsa letteratura. A conoscenza dell'autore, è stato riportato un modello predittivo di esposizione alla doxorubicina nel cane, tramite LSS (Wittenburg 2014), mentre è stato riportato l'andamento delle concentrazioni plasmatiche della VBL in sei cani (Achanta 2013). In entrambi i casi, tuttavia, non sono state valutate le implicazioni cliniche associate agli aspetti farmacocinetici, come tossicità ed efficacia.

7.1 Concentrazioni plasmatiche e AUC di vinblastina

Nel presente studio è stata valutata l'esposizione della VBL in cani affetti da mastocitoma tramite la misurazione dell'AUC del farmaco nelle 6 ore successive la sua somministrazione endovenosa in bolo ad una dose di 2 mg/m^2 . Confrontando i risultati del nostro studio con quelli disponibili in letteratura osserviamo come la concentrazione massima riscontrata nel nostro lavoro sia circa 10 volte inferiori rispetto a quella riportata nel 2013 da Achanta e coll. Questa differenza in concentrazione massima può trovare diverse motivazioni. Per prima cosa, lo studio di riferimento utilizzava delle dosi di chemioterapia differenti dal nostro studio. Mentre i cani venivano precedentemente trattati con $0,075 \text{ mg/kg}$ di VBL, il nostro protocollo prevedeva 2 mg/m^2 . Provando a comparare i due protocolli, possiamo evincere che, se standardizzato per BSA, il trattamento adottato nel precedente studio variava da $2,8 \text{ mg/m}^2$ nel cane più grande a $1,18 \text{ mg/m}^2$ nel più piccolo, rendendo molto complicato

fare una comparazione diretta tra i risultati dei due studi. Inoltre gli autori riportano solo il valore di concentrazione massima non caratterizzando in quale dei soggetti sia stata ritrovata né a quale *time point* corrispondeva. Un secondo motivo potrebbe essere l'impiego di differenti *time points*. È noto, come generalmente dopo la somministrazione endovenosa in bolo di un farmaco, la sua concentrazione plasmatica abbia un repentino abbassamento nei primi minuti, principalmente, per la distribuzione nei vari tessuti (Riviere 2011). Per esempio, valutando i nostri dati possiamo evincere già come tra i primi due prelievi ci sia quasi un dimezzamento della concentrazione plasmatica di VBL. Considerando quindi che la velocità di diminuzione della concentrazione di farmaco è massima immediatamente dopo la somministrazione per poi ridursi gradualmente, è ipotizzabile che nel nostro caso l'assenza di campioni prelevati dopo solo 2 minuti, così come avvenuto nel precedente studio, possa rendere questi dati scarsamente paragonabili. Un'altra giustificazione può essere che l'elevata variabilità interindividuale dimostrata nell'uomo (Lu 1983), possa essere presente anche nel cane, determinando semplicemente una difficoltà oggettiva nel paragonare risultati riportati da studi preliminari con una popolazione ridotta che potrebbero non rappresentare effettivamente la popolazione *in toto*. Nello studio sopracitato, ad esempio, l'AUC di VBL somministrata in bolo rapido nell'uomo variava di circa 3 volte da soggetto a soggetto (Lu 1983). In ultimo, questa differenza tra i nostri risultati e quelli riportati in precedenza, potrebbe essere dovuto alla differente metodica di estrazione utilizzata e alle differenze di strumentazioni. Nel precedente lavoro, infatti, l'estrazione della VBL veniva eseguita in fase solida (Achanta 2013), mentre nel nostro in fase liquida con diclorometano. C'è da sottolineare tuttavia che i tassi di recupero per le due metodiche sono risultati simili e che l'utilizzo dello standard interno in entrambi i casi rende questa ipotesi poco probabile.

Il suddetto lavoro ha riportato l'andamento nell'arco di 24 ore delle concentrazioni plasmatiche della VBL. Tuttavia gli autori non hanno riportato dati relativi all'AUC. A conoscenza dell'autore, il presente studio è il primo a valutare l'AUC della VBL in cani affetti da mastocitoma.

7.2 AUC di vinblastina e effetti collaterali acuti

In medicina umana, lo schema di dosaggio di alcuni agenti antitumorali si è modificato negli ultimi decenni passando dal principio del “more is better”, sfruttando la MDT del farmaco, al principio di ottimizzazione della dose e “individualizzazione” del protocollo chemioterapico (Hryniuk 1988, de Jonge 2005). Questa nuova concezione ha l'obiettivo di somministrare la MDT calcolata per ogni singolo individuo e non una MDT media stabilita su una larga popolazione. Lo scopo è quello di andare a “proteggere” quegli individui che potrebbero risentire di un sovradosaggio con effetti collaterali eccessivi, i quali potrebbero compromettere la buona riuscita del protocollo o addirittura influenzare negativamente le sopravvivenze. Secondariamente andare a “soddisfare” e raggiungere quella dose minima ritenuta efficace in quei soggetti, dove per esempio, per aumentata clearance, il farmaco potrebbe avere una cinetica insufficiente per il trattamento di quello specifico tumore. Con questo scopo, nell'uomo, numerosi studi hanno focalizzato l'attenzione su alcuni parametri farmacocinetici individuali come AUC, clearance plasmatica e C_{ss} per valutare l'esposizione sistemica individuale ad un farmaco e per calcolare dei cut-off ritenuti “ideali” per tossicità ed efficacia (Evans 1989, Ratain 1986). Nella pratica questo si è tradotto in schemi chemioterapici meno tossici anche se non sempre più efficaci rispetto ai tradizionali (Patel 2015). Per esempio, è stato osservato che il dosaggio di 5-fluorouracile basato sulla valutazione dell'AUC si è dimostrato più efficace e meno tossico rispetto ad uno schema di dosaggio per superficie corporea (Gamelin 2008, Kline 2014). Allo stesso

modo l'ottimizzazione della dose del metotressato è risultata essere, rispettivamente, più efficace e meno tossica in bambini con leucemia linfoblastica acuta e in adolescenti con osteosarcoma (Evans 1998, Crews 2004).

Nel presente lavoro l'AUC media di VBL nel gruppo dei pazienti che hanno sviluppato effetti collaterali era superiore, ma non differiva significativamente dal gruppo che non ne sviluppava. Le motivazioni per questo risultato e possono essere molteplici. L'elevata variabilità individuale all'esposizione di VBL, così come riportata nell'uomo (Lu 1983), e lo scarso numero di soggetti nei due gruppi possa aver inciso nel non riuscire ad ottenere un risultato statisticamente significativo. Alcuni autori, hanno inoltre notato che l'infusione continua (5 giorni) sembrava incrementare l'AUC e ridurre la clearance di VBL nell'uomo, probabilmente per la capacità di questo schema di somministrazione di aumentare la quota di farmaco libera, saturando i legami extravascolari dovuti all'elevata affinità della VBL per la tubulina tissutale (Owellsen 1975, Lu 1983); ciò suggerisce quindi uno schema di somministrazione completamente differente rispetto a quello attualmente adottato nel cane. Un lavoro successivo, invece, ha osservato che la C_{ss} potrebbe essere uno dei parametri più importanti da prendere in considerazione nel predire la tossicità da VBL, se impiegata in protocolli terapeutici con infusioni continue e prolungate (superiori alle 2 settimane) (Ratain 1986).

7.3 AUC di vinblastina e risposta clinica

Il trattamento di prima scelta in corso di mastocitoma cutaneo canino è la chirurgia. La radioterapia e la chemioterapia vengono più spesso impiegate in corso di mastocitoma ad alto rischio o metastatico (Sledge 2016, Blackwood 2012). Nel presente studio i cani trattati con chemioterapia adiuvante hanno avuto le sopravvivenze più lunghe (> 2 anni) ed erano ancora vivi al termine dello studio. I cani in cui la chemioterapia è stata impiegata come neoadiuvante invece, hanno avuto sopravvivenze

e tempi di progressione della malattia molto variabili. Nel presente lavoro l'AUC media non era differente tra il gruppo di cani che mostravano o meno un'oggettiva risposta antitumorale sia a 7 che a 28 giorni. E' interessante osservare che le recidive e le metastasi si sono verificate entro i 3 mesi dall'inizio del protocollo chemioterapico, mentre i cani che hanno avuto risposte prolungate non hanno avuto riprese della malattia oltre 14 mesi dal trattamento.

Questo divario di sopravvivenze e scarsa capacità dell'AUC nel predire una risposta potrebbe essere giustificato da vari fattori intrinseci ed estrinseci al tumore stesso. Per quanto riguarda i fattori intrinseci c'è da dire che, a parità di concentrazione plasmatica di farmaco raggiunta, la concentrazione di chemioterapico intratumorale è dipendente dalla vascolarizzazione del tumore stesso e dalla capacità del farmaco di penetrare la membrana cellulare e permanere all'interno della cellula neoplastica (Desoize 1994). E' noto che i tumori solitamente sono strutturalmente eterogenei con aree ipervascolarizzate e aree scarsamente irrorate oltre ad aree necrotiche, più estese nei tumori più aggressivi (Desoize 1994). E' inoltre noto che i meccanismi di resistenza delle cellule tumorali per alcuni farmaci chemioterapici, tra cui la VBL, sono la sovraespressione di proteine di membrana che fungono da proteine di efflusso dall'ambiente intracitoplasmatico a quello extracellulare (Evans 1989, Robert 1993). Queste eterogeneità potrebbero quindi, giustificare la variabilità di risposta alla chemioterapia. Tra i fattori estrinseci al tumore invece c'è da tenere di conto della variabilità farmacocinetica e farmacodinamica individuale che può portare a differenti concentrazioni plasmatiche e tissutali di chemioterapico, complicando ulteriormente la valutazione dell'efficacia sul breve e lungo periodo. Infatti, anche se un lavoro sull'uomo aveva riportato che una maggiore AUC e una clearance ridotta erano associate a una miglior risposta antitumorale, il differente schema di somministrazione

rispetto al nostro studio (infusione continua per 5 giorni consecutivi verso infusione in bolo rapida), non ne permette una comparazione diretta (Ratain 1986).

7.4 LSS per la vinblastina

Il limite maggiore nello studio della farmacocinetica individuale di un farmaco risiede nella necessità di numerosi prelievi ematici entro le prime ore dalla somministrazione, aumentando i costi per il servizio sanitario e il disagio per il paziente e rendendo tale procedura scarsamente applicabile nella routine clinica. Per questo si è reso necessario lo sviluppo di LSS con l'obiettivo di fornire informazioni di farmacocinetica con approssimazioni superiori all'80% (Van Warden 1994). In medicina umana è stato sviluppato un LSS per la VBL che prevedeva solo due prelievi a 10 e 36 ore dopo la somministrazione con una stima dell'AUC superiore all'85% (Ratain 1987). In medicina veterinaria non sono disponibili dati relativi un LSS in grado di predire l'esposizione alla VBL nei cani. Solo recentemente è stato sviluppato un modello predittivo per l'esposizione alla doxorubicina in cani con linfoma (Wittenburg 2014). Il presente studio ha calcolato un modello di LSS per predire l'esposizione alla VBL con 3 campionamenti 15, 30 e 60 minuti dopo la somministrazione. Un limite al modello qui proposto, sta nel fatto che sarebbe necessaria una validazione utilizzando un nuovo set di soggetti indipendenti dalla matrice originale e quindi non utilizzati per calcolare il modello di LSS. Questo nuovo metodo di LSS, successivamente ad una ulteriore validazione, potrebbe migliorare la capacità del medico oncologo di adattare il protocollo chemioterapico ad ogni singolo paziente riducendo gli episodi di tossicità e migliorando, dove possibile, l'efficacia antitumorale.

7.5 Tossicità acuta del protocollo chemioterapico

Nel presente studio più della metà dei cani sviluppava tossicità ematologica dopo la somministrazione di VBL e si osservava una significativa differenza tra la conta

leucocitaria e neutrofilica prima e dopo la somministrazione di chemioterapia. Tale tossicità si osservava solo a carico della conta dei neutrofilici e veniva classificata di grado 1 in 4 casi, di grado 2 e di grado 3 negli altri due cani. Se comparata con i dati disponibili in letteratura, la tossicità ematologica osservata nel nostro studio sembra avere un'incidenza piuttosto alta seppur nella maggior parte dei casi di grado lieve (Thamm 2006, Rassnick 2008). Un'ipotesi, per un'incidenza così alta potrebbe risiedere nella grande variabilità di risposta individuale che si può osservare dopo la somministrazione di questo farmaco, così come dimostrato nell'uomo (Lu 1983). Ma se valutiamo gli studi di fase 2 e 3 relativi all'uso della VBL nel cane, emergono dei risultati conflittuali e poco proporzionali con il dosaggio chemioterapico impiegato. Ritroviamo per esempio tossicità midollari in circa il 20% dei cani trattati con 2 mg/m^2 , e per lo più lieve (Thamm 2006, Rassnick 2008) e tossicità sempre in circa il 20% dei soggetti nonostante un aumento di dose del 150% (Vickery 2008). Tuttavia un lavoro piuttosto recente ha osservato una scarsa tollerabilità dei cani alla VBL impiegata a questo dosaggio (Arnold 2011). Gli episodi di tossicità sembrano, invece, aumentare drasticamente quando la VBL viene somministrata a dosi di almeno $3,5 \text{ mg/m}^2$ (175% maggiore della dose impiegata in questo lavoro) con il 50-80% di incidenza (Bailey 2008, Rassnick 2010). E' opinione dell'autore che vista la differente tossicità riportata per questo farmaco, i nostri risultati possano essere influenzati dalla variabilità campionaria dovuta allo scarso numero di pazienti inclusi nello studio. Non per ultimo, l'elevata differenza individuale allo sviluppo di tossicità potrebbe indicare un'oggettiva necessità di ricercare un LSS che possa predire l'esposizione al farmaco alla prima somministrazione così da poter ottimizzare il dosaggio paziente per paziente. Un altro motivo per il quale la neutropenia è stata osservata frequentemente, potrebbe essere secondario al fatto che 9 di 11 soggetti nel nostro studio hanno cominciato il protocollo

di chemioterapia senza concomitante somministrazione di prednisone. In entrambi i casi in cui i pazienti erano in terapia con cortisonici abbiamo osservato il più alto numero di neutrofili alla diagnosi e nessuna tossicità midollare dopo 7 giorni. Anche nei risultati di tossicità pubblicati spesso venivano utilizzati cortisonici in associazione alla VBL (Davies 2004, Hayes 2007). E' noto che l'impiego di cortisonici, in particolar modo a dosaggi elevati, possa provocare demarginalizzazione dei neutrofili circolanti, inibizione della diapedesi dal torrente circolatorio ai tessuti e aumentato rilascio di neutrofili maturi dal midollo osseo con conseguente aumento della conta neutrofilica assoluta (Schultze 2010). Dal secondo trattamento in poi, che coincideva con l'inizio di terapia cortisonica, nessun cane ha sviluppato nuove neutropenie. E' opinione dell'autore che il concomitante utilizzo di cortisonici a dosaggi immunosoppressivi, come richiesto dal protocollo chemioterapico per il mastocitoma, potrebbe far sottostimare all'oncologo medico la tossicità midollare soprattutto nelle prime settimane di trattamento a causa di una sovrastima dei neutrofili circolanti. Tuttavia nel nostro caso il paziente che aveva sviluppato tossicità ematologica di grado 3, riceveva una dose ridotta del 15% di VBL ai cicli successivi.

Nel cane, l'azione citotossica della VBL sulla trombopoiesi ad oggi risulta essere trascurabile. Nonostante le piastrine siano ricche di tubulina, la loro conta può aumentare, probabilmente per aumentata megacariopoiesi, con la somministrazione degli alcaloidi della vinca (Romanowsky 2011, Stokol 2010). In questo studio non sono state osservate tossicità a carico delle piastrine, analogamente a quanto riportato in letteratura.

Nel cane la tossicità acuta gastroenterica da VBL è riportata essere infrequente e di scarsa gravità (Rassnick 2008, Rassnick 2010). Nausea e vomito sembrano essere i sintomi gastroenterici più frequentemente associati a tossicità gastroenterica da

chemioterapia, seguiti da anoressia, e dismotilità intestinale. L'emesi indotta da chemioterapia viene divisa in tre tipi. L'emesi acuta, la più comune, viene indotta entro le 24 dalla somministrazione di chemio. L'emesi ritardata si può osservare fino a 5 giorni dalla somministrazione, e l'emesi da condizionamento, che solitamente si osserva in quei pazienti che hanno sviluppato nausea o vomito nei cicli precedenti, e che sviluppano emesi anticipata come risposta condizionata (Olver 2011). In medicina umana, lo studio dei meccanismi dell'emesi indotta da chemioterapia ha portato allo sviluppo di farmaci antiemetici di nuova generazione con l'obiettivo di migliorare la qualità di vita del paziente oncologico, come i farmaci antagonisti del recettore 5-idrossitriptamina 3 (5-HT3) e antagonisti del recettore neurochinina 1 (NK1). Inoltre, questa attenzione verso l'emesi, ha portato a suddividere i farmaci antitumorali in 4 categorie in base al potenziale emetico dimostrato, e la VBL insieme agli altri alcaloidi della vinca è stata classificata con minimo rischio di emesi (<10%) (Olver 2011). Anche in medicina veterinaria, con lo stesso principio, sono stati sviluppati farmaci antagonisti NK1 e ad oggi il maropitant sembra essere il farmaco di prima scelta nel controllo preventivo dell'emesi indotta da chemioterapia (Gustafson 2013). Tuttavia, uno studio prospettico randomizzato ha riportato che l'uso di maropitant sembra ininfluente nel ridurre il tasso di tossicità gastroenterica in cani trattati con vincristina (Mason 2014). Nel nostro studio la tossicità gastroenterica è stata lieve con solo due episodi, in cani diversi, e risolta in 48 ore spontaneamente. I nostri risultati supportano che l'uso profilattico di maropitant potrebbe essere richiesto solo in casi selezionati.

7.6 Tossicità cronica del protocollo chemioterapico

Alcuni chemioterapici di comune utilizzo nel cane, sono stati segnalati per la loro capacità di indurre danni organici se utilizzati per lunghi periodi o se utilizzati in soggetti con danni organici preesistenti (Gustafson 2013). L'impiego di questi farmaci

necessita attenti monitoraggi degli organi target per anticipare la sospensione del trattamento evitando l'insorgenza di danni persistenti e che in alcuni casi potrebbero inficiare la qualità di vita e il tempo di sopravvivenza del paziente. Per la VBL non sono state riconosciute particolari tossicità organiche, anche se tuttavia sono state segnalate sporadicamente neuropatie periferiche e vasosclerosi (Palau 2007, Robot 2012). Nel nostro studio è stata osservata epatotossicità con aumento della fosfatasi alcalina, alanina transaminasi e gamma-glutamilttransferasi. I cortisonici sono riconosciuti avere la capacità di dare danno epatico colestatico ed epatocellulare con induzione e quindi incremento delle transaminasi e della fosfatasi alcalina (Stockham 2008). Anche se non si può escludere una tossicità da VBL, è opinione dell'autore che questa tossicità possa esser dovuta principalmente all'impiego di cortisonici. Questo aumento enzimatico si è osservato nella prima settimana dopo l'inizio di prednisone e è andato a risolversi in circa un mese utilizzando terapia di supporto e scalando la dose di steroidi, nonostante il protocollo chemioterapico sia proseguito. Un cane ha sviluppato tossicità renale di grado 2 a 15 mesi dalla somministrazione di chemioterapia. Questo cane tuttavia, era in terapia da circa 2 mesi con masitinib mesilato, un farmaco della famiglia degli inibitori tirosinchinasici, riconosciuti poter essere nefrotossici (Smrkovski 2015). Infine, un cane sviluppava ipertrigliceridemia idiopatica persistente a 18 mesi dal trattamento. In questo caso vista la scarsa incidenza di questa patologia nel cane, e la scarsa bibliografia a riguardo potrebbe essere da non trascurare questa segnalazione come tossicità tardiva. Tuttavia c'è da dire, che questo paziente aveva fatto anche altre terapie successive all'impiego di VBL come cortisonici per lunghi periodi e masitinib che potrebbero aver avuto un ruolo nella patogenesi di questa patologia.

7.7 Risposta clinica al protocollo chemioterapico

In questo studio il tasso di risposta antitumorale è stato del 50% a 7 giorni e del 57% dopo 28 giorni. Verificando i dati disponibili in letteratura rimane difficile comparare i risultati del presente studio con quelli pubblicati precedentemente. Il primo motivo è dovuto al fatto che in molti studi la VBL veniva associata al concomitante utilizzo di cortisonici. L'uso neoadiuvante di prednisone nel mastocitoma canino è stato riportato avere un tasso di risposta dal 20 al 70%, influenzando notevolmente l'interpretazione dei risultati ottenuti con l'uso combinato VBL-prednisone (Stanclift 2008, MacCaw 1994). Questa elevata variabilità nella risposta agli steroidi sembra essere dovuta all'elevata variabilità di espressione cellulare di recettori per i glucocorticoidi nel mastocitoma del cane (Matsuda 2011). In un lavoro del 2008, l'uso di VBL a 2 mg/m² aveva dato risultato insoddisfacenti con solo il 12% di tasso di risposta. Nel nostro caso due di cinque cani nei quali era stata ottenuta una risposta oggettiva erano stati trattati con protocollo combinato, e questo potrebbe aver sovrastimato la risposta ottenuta. Un altro motivo per il quale è complicato paragonare i nostri risultati con quelli in letteratura è dovuto ad altri fattori di confondimento, come differenti dosaggi di VBL (Vickery 2008), uso di protocolli polichemioterapici con lomustina o ciclofosfamide (Cooper 2009, Camps-Palau 2007) e l'uso di sistemi di controllo della risposta differenti da quelli utilizzati in questo studio (Thamm 1999). E' comunque interessante osservare che in 5 casi su 8 la risposta a 28 giorni era differente rispetto alla risposta a 7 giorni. Nello specifico, due cani sviluppavano malattia progressiva dopo una risposta parziale a 7 giorni, uno sviluppava malattia progressiva dopo malattia stabile, e due cani sviluppavano remissione parziale dopo malattia stabile. Questo risultato conferma la necessità di valutare la risposta clinica alla chemioterapia a distanza di 6-8 settimane dall'inizio del trattamento prima di interpretare i risultati ed eventualmente modificare il protocollo terapeutico, a meno che, non si abbia una malattia

progressiva prima di tale scadenza (Nguyen 2013).

Capitolo 8 Conclusioni

Il presente studio ha dimostrato la possibilità di rilevare, tramite la metodica di spettrometria di massa/HPLC, la concentrazione di vinblastina fino a 6 ore post somministrazione, nel plasma di cani in trattamento chemioterapico. La misurazione della AUC nei cani inclusi in questo studio ha mostrato un'elevata variabilità interindividuale, giustificando l'elevata incertezza nel predire lo sviluppo di effetti collaterali secondari al trattamento riportata in studi precedenti. Nel presente studio la AUC di VBL non era associata allo sviluppo di effetti collaterali acuti e tardivi, né al tasso di risposta tumorale a 7 e 28 giorni dal trattamento. Inoltre, il presente studio ha riportato un modello di campionamento limitato con soli tre campionamenti ematici eseguiti entro un'ora dalla somministrazione, in grado di predire in modo accurato la AUC, considerata reale, misurata con 9 prelievi ematici in 6 ore. Questo nuovo metodo di campionamento potrebbe essere utile per ridurre il disagio al paziente e i costi totali della procedura analitica. Ulteriori studi si rendono necessari, al fine di validare il metodo di campionamento limitato e al fine di valutare l'associazione tra AUC e sviluppo di effetti collaterale e risposta clinica su un numero di soggetti più ampio.

Bibliografia

- Achanta S, Ngo M, Veitenheimer A, et al. Simultaneous quantification of vinblastine and desacetylvinblastine concentrations in canine plasma and urine samples using LC-APCI-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2013;913-914:147–154.
- Ackland SP, Choi RE, Ratain MJ, et al. Human plasma pharmacokinetics of thiotepa following high dose administration of thiotepa and cyclophosphamide. *J Clin Oncol* 1988;6:1192-1196
- Ackland SP, Ratain MJ, Vogelzang NJ, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of long-term continuous-infusion doxorubicin. *Clin Pharmacol Ther* 1989;45:340-347.
- Adair CG, Bridges JM, Desai ZR. Renal function in the elimination of oral melphalan in patients with multiple myeloma. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986;17:185-188.
- Adolph EE. Quantitative relations in the physiological constitutions of mammals. *Science* 1949;109:579-585.
- Alberts DS, Chen HS, Salmon SE, et al. Chemotherapy of ovarian cancer directed by the human tumor stem cell assay. *Cancer Chemother Pharmacol* 1981;6:279-285.
- Alberts DS, Salmon SE, Chen HS, et al. In vitro clonogenic assay for predicting response of ovarian cancer to chemotherapy. *Lancet* 1980;2:340-342.

- Altman PL, Dittmer DS. *Biology Data Book*. Washington, DC: Federation of American Societies for Experimental Biology; 1964;12:1-122.
- Amos LA, Baker TS. The three dimension structure of tubulin protofilaments. *Nature* 1979;279:607–612.
- Arnold EJ, Childress MO, Fourez LM, et al. Clinical trial of vinblastine in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 2011;25:1385–90.
- Arrington KA, Legendre AM, Tabeling GS, et al. Comparison of body surface area-based and weight-based dosage protocols for doxorubicin administration in dogs. *Am J Vet Res* 1994;55:1587-1592.
- Bailey DB, Rassnick KM, Kristal O, et al. Phase I Dose Escalation of Single-Agent Vinblastine in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008;22:1397–1402.
- Bannwarth B, Pehourcq F, SchaefferbekeT, et al. Clinical pharmacokinetics of low-dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacokinet* 1996;30:194–210.
- Batra VK, Morrison JA, Woodward DL, et al. Pharmacokinetics of mitoxantrone in man and laboratory animals. *Drug Metab Dispos* 1986;17:311-327.
- Beck WT, Mueller TJ, Tanzer LR. Altered cell surface membrane glycoproteins in Vinca alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res* 1979;39:2070–2076.

- Beck WT. Alkaloids. In: Fox BW, Fox M, eds. Antitumor Drug Resistance. Berlin: Springer-Verlag, 1984;589–656.
- BeckWT, Cirtain MC, Lefko JL. Energy-dependent reduced drug binding as a mechanism of Vinca alkaloid resistance in human leukemia lymphoblasts. Mol Pharmacol 1983;24:485–492.
- Bellmunt J, Delgado FM, George C. Clinical activity of vinflunine in transitional cell carcinoma of the urothelium and other solid tumors. Semin Oncol 2008;35(3 Suppl 3):S34–S43.
- Bellone JD. Treatment of vincristine extravasation. JAMA 1981;245:343.
- Bender RA, Castle MC, Margileth DA, et al. The pharmacokinetics of [3H]-vincristine in man. Clin Pharmacol Ther 1977;22:430–435.
- Bender RA, Kornreich WD, Wodinsky I. Correlates of vincristine resistance in four murine tumor cell lines. Cancer Lett 1982;15:335–341.
- Bennet CL, Sinkule JA, Schilsky RL, et al. Phase I clinical and pharmacological study of 72-hour continuous in- fusion of etoposide in patients with advanced cancer. Cancer Res 1987;47:1952-1956
- Bennouna J, Delord JP, Campone M, et al. Vinflunine: a new microtubule inhibitor agent. Clin Cancer Res 2008;14:1625–1632.
- Bertrand Y, Capdeville R, Balduck N, et al. Cyclosporin A used to reverse drug resistance increases vincristine neurotoxicity. Am J Hematol 1992;40:158–159.

- Bhalla KN. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene* 2003;22:9075–9086.
- Bieling P, Winkler K, Bielak S, et al. Continuous infusion versus short term infusion of doxorubicin in osteosarcoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1991;10:308 (abs 1079)
- Blackwood L, Murphy S, Buracco P, et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2012;10:e1–e29.
- Blagosklonny MV, Robey R, Bates S, et al. Pretreatment with DNA-damaging agents permits selective killing of checkpoint-deficient cells by microtubule-active drugs. *J Clin Invest* 2000;105:533–539.
- Bleyer WA, Frisby SA, Oliverio VT. Uptake and binding of vincristine by murine leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 1975;24:633–639.
- Bolinger AM, Zangwill AB, Slattery JT, et al. Target dose adjustment of busulphan using pharmacokinetic parameters in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation for malignancy or genetic disease. *Blood* 1999;94:145a
- Bowman LC, Houghton JA, Houghton PJ. Formation and stability of vincristine-tubulin complex in kidney cytosols. Role of GTP and GTP hydrolysis. *Biochem Pharmacol* 1988;37:1251–1257.
- Bowman LC, Houghton JA, Houghton PJ. GTP influences the binding of vincristine in human tumor cytosols. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;135:695–700.

- Boxenbaum H, Ronfeld R. Interspecies pharmacokinetic scaling and Dedrick plots. *Am J Physiol* 1980a;245:R768-R774.
- Boxenbaum H. Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance: Extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin. *J Pharmacokinet Biopharm* 1980b;8: 165-176.
- Braguer D, Barret JM, McDaid H, et al. Antitumor activity of vinflunine: effector pathways and potential for synergies. *Semin Oncol* 2008;35:S13–S21.
- Brenner DE. Approaches to the problem of individual doxorubicin dosing schedules. *Pathol Biol* 1986;35:31-39.
- Budman DR. Vinorelbine (Navelbine): a third-generation vinca alkaloid. *Cancer Invest* 1997;15:475–490.
- Bunn PA, Ford SS, Shackney SE. The effects of colcemide on hematopoiesis in the mouse. *J Clin Invest* 1975;58:1280–1285.
- Cabral FR, Barlow SB. Mechanisms by which mammalian cells acquire resistance to drugs that affect microtubule assembly. *FASEB J* 1989;3:1593–1599.
- Cabral FR, Barlow SB. Resistance to the antimetabolic agents as genetic probes of microtubule structure and function. *Pharmacol Ther* 1991;52:159–171.
- Cabral FR, Brady RC, Schiber MJ. A mechanism of cellular resistance to drugs that interfere with microtubule assembly. *Ann N Y Acad Sci* 1986;466:748.
- Calder WA III, Braun EJ; Scaling of osmotic regulation in mammals and birds. *Am J Physiol* 1983;244:R601-R606.

- Calvert AH, Newell DR, Gumbrell LA, et al. Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function. *J Clin Oncol* 1989;7:1748-1756
- Calvert AH. Dose optimization of carboplatin in adults. *Anticancer Res* 1994;14:2273-2278.
- Camerini A, Puccetti C, Donati S, et al. Metronomic oral vinorelbine as first-line treatment in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer: results of a phase II trial (MOVE trial). *BMC Cancer*. 2015;15:359.
- Camps-Palau MA, Leibman NF, Elmslie R, et al. Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997-2004). *Vet Comp Oncol*. 2007;5(3):156-167.
- Carmichael SM, Eagleton L, Ayers CR, et al. Orthostatic hypotension during vincristine therapy. *Arch Intern Med* 1970;126:290–293.
- Castle MC, Margileth DA, Oliverio VT. Distribution and excretion of [3H]vincristine in the rat and the dog. *Cancer Res* 1976;36: 3684-3689.
- Chiccarelli FS, Morrison JA, Gautam SR. Biliary pharmacokinetics of mitoxantrone in the rat following different intravenous doses and characteristics of drug related material in the bile. *Abstr Fed Proc* 1984;43:345.
- Choi K, Chen C, Kriegler M, et al. An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene. *Cell* 1988;53:519–529.

- Climente-Martí M, Merino-Sanjuán M, Almenar-Cubells D, et al. A Bayesian method for predicting 5-fluorouracil pharmacokinetic parameters following short-term infusion in patients with colorectal cancer. *J Pharm Sci.* 2003;92(6):1155-1165. doi:10.1002/jps.10374.
- Collins JM and Supko JG. Chapter 4: Principles of pharmacokinetics. In: *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice.* editors, BruceA. Chabner, DanL. Longo, 5th ed. Philadelphia, PA, 2011. p. 50-61
- Conklin PM. Body surface area in the infant rat. *J Appl Physiol* 1975;39:335-336.
- Conley BA, Forrest A, Egorin MJ, et al. Phase I trial employing adaptive control dosing of hexa- methylene bisacetammide (HMBA, NCS 95580). *Cancer Res* 1989;49:3436-3440
- Cooper M, Tsai XR, Bennett P. Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases. *Vet Comp Oncol.* 2009;7(3):196-206.
- Cornwell MM, TsuruoT, Gottesman MM, et al. ATP-binding properties of P-glycoprotein from multidrug-resistant KBcells. *FASEBJ* 1987;1:51–54.
- Correia JJ, Lobert S. Physiochemical aspects of tubulin-interacting antimitotic drugs. *Curr Pharm Des* 2001;7:1213–1228.
- Cowgill GR, Drabkin DL. Determination of a formula for the surface area of the dog together with a consideration of formulae available for other species. *Am J Physiol* 1927;81:36-61.

- Crawford JD, Terry ME, Rourke GM. Simplification of drug dosage calculation by application of the surface area principle. *Pediatrics* 1950;5:783-789.
- Creasey WA, Scott AI, Wei CC, et al. Pharmacological studies with vinblastine in the dog. *Cancer Res* 1975;35:1116–1120.
- Crews KR, Liu T, Rodriguez-Galindo C, et al. High-dose methotrexate pharmacokinetics and outcome of children and young adults with osteosarcoma. *Cancer* 2004;100:1724–1733.
- Crossin KL, Carney DH. Microtubule stabilization by Taxol inhibits initiation of DNA synthesis by thrombin and epidermal growth factor. *Cell* 1981;27:341–350.
- Culp HW, Daniels WD, McMahon RE. Disposition and tissue levels of [3H]-vindesine in rats. *Cancer Res* 1977;37:3053–3056.
- Dancey J, Steward WP. The role of vindesine in oncology: recommendations after 10 years' experience. *Anticancer Drugs* 1995;6:625–636.
- Davidson IWF, Parker JC, Beliles RP. Biological basis for extrapolation across mammalian species. *Regul Toxicol Pharmacol* 1986;6:211-237.
- Davies DR, Wyatt KM, Jardine JE, et al. Vinblastine and prednisolone as adjunctive therapy for canine cutaneous mast cell tumors. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2004;40:124-130.
- Dawson NJ. The surface area-body-weight relationship in mice. *Aust J Biol Sci* 1967;20:687-690.

- Dawson WT. Relations between age and weight and dosage of drugs. *Ann Intern Med* 1940, 13, 1594-1613
- de Jonge M, Huitema A, Schellens J, et al. Individualised cancer chemotherapy: strategies and performance of prospective studies on therapeutic drug monitoring with dose adaptation. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(2):147-173.
- Desai ZR, Van den Berg HW, Bridges JM, et al. Can severe vincristine neurotoxicity be prevented? *Cancer Chemother Pharmacol* 1982;8:211-214
- Desoize B, Marechal F, Cattan A. Clinical pharmacokinetics of etoposide during 120 h continuous infusions in solid tumors. *Br J Cancer* 1990, 62, 840-841
- Desoize B, Marechal F, Millart H, Cattan A. Correlation of clinical pharmacokinetic parameters of cisplatin with efficacy and toxicity. *Biomed Pharmacother* 1991, 45, 203-207.
- Desoize B, Robert J. individual dose adaptation of anticancer agents.PDF. *Eur J Cancer*. 1994;30A:844-851.
- Dodge WF, Jelliffe RW, Richardson J, et al. Population pharmacokinetic models. Measures of central tendency. *Drug Invest*. 1993;5:206–211
- Domenech GH, Vogel CL. Are view of vinorelbine in the treatment of breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2001;2:113–128.
- Donelli MG, D’Incalci M, Garattini S. Pharmacokinetic studies of anticancer drugs in tumor-bearing animals. *Cancer Treat Rep* 1984;68:381–400.

- Donigian DW, Owellen RJ. Interaction of vinblastine, vincristine and colchicine with serum proteins. *Biochem Pharmacol* 1973;22: 21 13-21 19.
- Dorr RT, Alberts DS. Vinca alkaloid skin toxicity: antidote and drug disposition studies in the mouse. *J Natl Cancer Inst* 1985;74:113–120.
- Dorr T. Antidotes to vesicant chemotherapy extravasation. *Blood Rev* 1990;4:41–60.
- Drusano GL, Forrest A, Snyder MJ, et al. An evaluation of optimal sampling strategy and adaptive study design. *Clin Pharmacol Ther.* 1988;44:232–238
- Drusano GL, Forrest A, Yuen G, et al. Optimal sampling theory: effect of error in a nominal parameter value on bias and precision of parameter estimation. *Clin Pharmacol Ther.* 1994;34:967–974
- Drusano GL. Role of pharmacokinetics in the outcome of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:289-297.
- DuBois D, DuBois EE A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Arch Intern Med* 1916;171:863-871.
- ECVIM. Preventing occupational and environmental exposure to cytotoxic drugs in veterinary medicine. 2007; http://www.ecvim-ca.org/images/downloads/guidelines/Guidelines_ECVIM_Hazards_Cytotoxic_drugs_2nd_version_July_2007.pdf
- Edwards NA. Scaling of renal function in mammals. *Comp Biochem Physiol A* 1975;52:63-66.

- Egorin MJ, Forrest A, Belani CP, et al. A limited sampling strategy for cyclophosphamide pharmacokinetics. *Cancer Res* 1989;49:3129-3133
- Egorin MJ, Sigman LM, Van Echo DA, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of hexamethylene bisacetamide (NSC95580) administered as a five-day continuous infusion. *Cancer Res* 1987;47:617–623.
- Egorin MJ, Van Echo DA, Olman EA, et al. Prospective validation of a pharmacologically based dosing scheme for the cis-diammine-dichloro-platinum (II) analogue diammine-cyclobutane-dicarboxylato-platinum. *Cancer Res* 1985; 45:6502–6506.
- Ehninger G, Proksch B, Heinzl G, et al. The pharmacokinetics and metabolism of mitoxantrone in man. *Invest New Drugs* 1985;3: 109-1 16.
- Eksorg S (1990) Anthracycline pharmacokinetics. Limited sampling model for plasma level monitoring with special reference to epirubicin (Farmorubicin). *Acta Oncol* 29:339-342
- EMA (European Medicines Agency). Guideline on bioanalytical method validation. 2011; EMEA/CHMP/EWP/192217/2009
- Etiévant C, Barret J-M, Kruczynski A, et al. Vinflunine (20',20'-difluoro-3',4'-dihydrovinorelbine), a novel Vinca alkaloid, which participates in P-glycoprotein (Pgp)-mediated multidrug resistance in vivo and in vitro. *Invest New Drugs* 1998;16:3–17.

- Ette EI, Kelman AW, Howie CA, Whiting B. Interpretation of simulation studies for efficient estimation of population pharmacokinetic parameters. *Ann Pharmacother.* 1993;27:1034–1039
- Evans WE, Christensen ML. Drug interactions with methotrexate. *J Rheumatol* 1985;12(Suppl 12):15–20.
- Evans WE, Crom WR, Abromovitch et al. Clinical pharmacodynamics of high dose methotrexate in acute lymphocytic leukemia. Identification of a relation between concentration and effect. *N Eng J Med* 1986;314:471-477.
- Evans WE, Horner M, Chu YQ, et al. Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia. *J Pediat* 1991;119:985-989.
- Evans WE, Relling MV, Rodman JH, et al. Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998;338:499–505.
- Evans WE, Relling MV. Clinical pharmacokinetics-pharmacodynamics of anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet.* 1989;16:327-36.
- Evans WE, Yee GC, Crom WR. Clinical Pharmacology of bleomycin and cisplatin. *Head Neck Surg* 1981;4:98-110.
- Fan S, Cherney B, Reinhold W, et al. Disruption of p53 function in immortalized human cells does not affect survival or apoptosis after taxol or vincristine treatment. *Clin Cancer Res* 1998;4:1047–1054.

- Faulds D, Balfour-JA, Chrisp P, Langtry HD. Mitoxantrone. A review of its pharmacodynamic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs* 1991;41:400-449.
- Favre R, Monjanel S, Alfonsi M, et al. High-dose methotrexate: a clinical and pharmacokinetic evaluation. *Cancer Chemother Pharmacol* 1982, 9, 156-160
- Ferguson PJ, Cass CE. Differential cellular retention of vincristine and vinblastine by cultured human promyelocytic leukemia HL-60/ C-1 cells: the basis of differential toxicity. *Cancer Res* 1985;45:5480–5488.
- Ferguson PJ, Phillips JR, Steiner M, et al. Differential activity of vincristine and vinblastine against cultured cells. *Cancer Res* 1984;44:3307–3312.
- Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, et al. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:265–269.
- Fojo T, Menefee M. Mechanisms of multidrug resistance: the potential role of microtubule-stabilizing agents. *Ann Oncol* 2007;18 Suppl 5:3–8.
- Frazier DL, Price GS. Use of body surface area to calculate chemotherapeutic drug dose in dogs: II. Limitations imposed by pharmacokinetic factors. *J Vet Intern Med.* 1998;12(4):272-278.
- Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rats, hamster, dog, monkey and man. *Cancer Chemother Rep* 1966, 50, 219-244.

- Galpin AJ, Evans WE. Therapeutic drug monitoring in cancer management. Clin Chem 1993;39:2419-301993
- Gamelin E, Delva R, Jacob J, et al. Individual fluorouracil dose adjustment based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional dosage: Results of a multicenter randomized trial of patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2008;26(13):2099-2105.
- Gamelin F, Gamelin L, Larra F, et al. Acute cardiac toxicity of 5-fluorouracil: pharmacokinetic correlation. Bull Cancer 1991;78:1147-1153.
- Gan PP, Kavallaris M. Tubulin-targeted drug action: functional significance of class II and class IVb beta-tubulin in vinca alkaloid sensitivity. Cancer Res 2008;68:9817–9824.
- Garrett GR, Hurst GH, Green JR. Kinetics and mechanisms of drug action on microorganisms XXIII: Microbial kinetic assay for fluorouracil in biologic fluids and its application to human pharmacokinetics. J Pharm Sci 1977;66: 1422-1429.
- Gascoigne KA, Taylor SS. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells. J Cell Sci 2009;122:2579–2585.
- Gaver RC, George AM, Deeb G. In vitro stability, plasma protein binding and blood cell partitioning of ¹⁴C-carboplatin. Cancer Chemother Pharmacol 1987;20:271-276.
- Gehan EA, George SL. Estimation of human body surface area from height and weight. Cancer Chemother Rep 1970;54:225-235.

- Gera S, Munsch E, Osterheld HKO, Loos U. Hydrolysis and protein binding of melphalan-Their relevance regarding the treatment of multiple myeloma. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;23:76-80.
- Gianni L, Kearns CM, Giani A, et al. Nonlinear pharmacokinetics and metabolism of paclitaxel and its pharmacokinetic/ pharmacodynamic relationships in humans. *J Clin Oncol* 1995;13:180–190.
- Gilles F. Is dose adjustment for body surface area valid? *Proc Am Assoc Cancer Res* 1992;33:529.
- Goldenberg G, Lam H, Begleiter A. Active carrier-mediated transport of melphalan by two amino acid transport systems in LPC-I plasmacytoma cells in vitro. *J Biol Chem* 1979;254:1057-1064.
- Goolsby TV, Lombardo FA. Extravasation of chemotherapeutic agents: prevention and treatment. *Semin Oncol* 2006;33:139–143.
- Gottlieb RJ, Cuttner J. Vincristine-induced bladder atony. *Cancer* 1971;28:674–675.
- Gout PW, Noble RL, Bruchovsky N, et al. Vinblastine and vincristine growth-inhibitory effects correlate with their retention by cultured Nb2 node lymphoma cells. *Int J Cancer* 1984;34:245–248.
- Grant CE, Validmarsson G, Hipfner R, et al. Overexpression of multidrug resistance associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res* 1994;54:357–361.

- Greenberger LM, Williams SS, Horwitz SB. Biosynthesis of heterogeneous forms of multidrug resistance associated glycoproteins. *J Biol Chem* 1987;262:13685–13689.
- Greenwood D. In vitro veritas? Antimicrobial susceptibility tests and their clinical relevance. *J Infect Dis* 1981;144:380-385.
- Gregus Z, Klaassen CD. Biliary excretion. *J Clin Pharmacol* 1987;27:537-541.
- Gridelli C, De Vivo R. Vinorelbine in the treatment of non-small cell lung cancer. *Curr Med Chem* 2002;9:879–891.
- Grochow LB, Baraldi C, Noe D. Is dose normalisation to weight or body surface area useful in adults? *J Natl Cancer Inst* 1990, 82, 323-325.
- Gunven P, Theve NO, Peterson C. Serum and tissue concentrations of ADM after iv administration of ADM or ADM-DNA complex to patients with gastrointestinal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986, 17, 153-156.
- Gustafson DL and Page RL. Cancer Chemotherapy. In: Withrow SJ, MacEwen EG, eds. *Small Animal Clinical Oncology*, 5th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2013:157-179.
- Hamscher G, Mohring S a I, Knobloch A, et al. Determination of drug residues in urine of dogs receiving anti-cancer chemotherapy by liquid chromatography-electrospray ionization- tandem mass spectrometry: is there an environmental or occupational risk? *J Anal Toxicol*. 2010;34:142-148.

- Hansen SW, Helweg-Larsen S, Trajoborg W. Long-term neurotoxicity in patients treated with cisplatin, vinblastine, and bleomycin for metastatic germ cell cancer. *J Clin Oncol* 1989;7:1457–1461.
- Hantel A, Rowinsky EK, Donehower RC. Nifedipine and oncologic Raynaud's phenomenon. *Ann Intern Med* 1988;108:767.
- Hari M, Wang Y, Veeraraghavan S, et al. Mutations in α - and β -tubulin that stabilize microtubules and confer resistance to colcemid and vinblastine. *Mol Cancer Ther* 2003;2:597–605.
- Hayes A, Adams V, Smith K, Maglennon G, Murphy S. Vinblastine and prednisolone chemotherapy for surgically excised grade III canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*. 2007;5(3):168-176.
- Hebden HF, Hadfield JR, Beer CT. The binding of vinblastine by platelets in the rat. *Cancer Res* 1970;30:1417–1424.
- Hecquet B, Vennin P, Fournier C. Platinum concentration in human tumours of head and neck, uterine cervix, and breast following treatment with cisplatin. *Cancer chemother Pharmacol* 1985;15:310-312.
- Heusner AA. Energy metabolism and body size. I. Is the 0.75 mass exponent of Kleiber's equation a statistical artifact? *Respir Physiol* 1982;48:1-12.
- Hifpner DR, Deeley RG, Cole SP. Structural, mechanistic, and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* 1999;1461:359–366.

- Himes RH, Kersey RN, Heller-Bettinger I, et al. Action of the vinca alkaloids, vincristine and vinblastine, and desacetyl vinblastine amide on micro- tubules in vitro. *Cancer Res* 1976;36:3798–3802.
- Himes RH. Interactions of the catharanthus (vinca) alkaloids with tubulin and microtubules. *Pharmacol Ther* 1991;51:256–267.
- Hirvonen HE, Salmi TT, Heinonen E, et al. Vincristine treatment of acute lymphoblastic leukemia induces transient autonomic cardioneuropathy. *Cancer* 1988;64:801–805.
- Hohneker JA. A summary of vinorelbine (Navelbine) safety data from North American clinical trials. *Semin Oncol* 1994;21:42–46.
- Houribane DO, Weir DG. Malignant celiac syndrome. Report of two cases with malabsorption and microscopic foci of intestinal lymphoma. *Gastroenterology* 1970;59: 130-139.
- Hryniuk WM. More is better. *J Clin Oncol* 1988;6:1365-1367
- Hu OYP, Chang SP, Jame JM, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies with 4'-epi-doxorubicin in nasopharyngeal carcinoma patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;24:332-337.
- Iliadis A, Bachir-Raho M, Bruno R, Favre R. Bayesian estimation and prediction of clearance in high dose methotrexate infusions. *J Pharmacokin Biopharm* 1985;13:101-115.

- Inaba M, Fujikura R, Sakurai Y. Active efflux common to vincristine and daunorubicin in vincristine-resistant P388 leukemia. *Biochem Pharmacol* 1981;30:1863–1865.
- Jackson DV, Bender RA. Cytotoxic thresholds of vincristine in a murine and human leukemia cell line in vitro. *Cancer Res* 1979;39:4346–4349.
- Jackson DV, Castle MC, Bender RA. Biliary excretion of vincristine. *Clin Pharmacol Ther* 1978;24:101–107.
- Jakobsen P, Bastolt L, Dalmark M, et al. A randomized study epirubicin at four different dose levels in advanced breast cancer. Feasibility of myelotoxicity prediction through single blood sample measurement. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991, 28, 465-469.
- Joel S. The comparative clinical pharmacology of vincristine and vindesine: does vindesine offer any advantage in clinical use? *Cancer Treat Rev* 1996;21:513–525.
- Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, et al. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res* 1963;23:1390–1427.
- Johnson IS. Historical background of vinca alkaloid research and areas of future interest. *Cancer Chemother Rep* 1968;52:455–461.
- Johnson PJ, Dobbs N, Kalayci C, et al. Clinical efficacy and toxicity of standard dose adriamycin in hyperbilirubinemia patients with hepatocellular carcinoma. Relationship to liver tests and pharmacokinetic parameters. *Br J Cancer* 1992, 65, 751-755.

- Jordan MA, Horwitz SB, Lobert S, et al. Exploring the mechanisms of action of the novel microtubule inhibitor vinflunine. *Semin Oncol* 2008;35(3 Suppl 3):S6–S12.
- Jordan MA, Kamath K. How do microtubule-targeted drugs work? An overview. *Curr Cancer Drug Targets* 2007;7:730–742.
- Jordan MA, Margolis RL, Himes RH, et al. Identification of a distinct class of vinblastine binding sites on microtubules. *J Mol Biol* 1986;187:61–73.
- Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci* 1992;102:401–416.
- Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by the vinca alkaloids. *Cancer Res* 1991;51:2212–2222.
- Jordan MA, Wilson L. Kinetic analysis of tubulin exchange at microtubule ends at low vinblastine concentrations. *Biochemistry* 1990;29:2730–2739.
- Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004;4:253–265.
- Juma FD. Effect of liver function on the pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Eur J Clin Pharmacol* 1984, 26, 591-593.
- Kashuba ADM, Ballow CH, Forrest A. Development and evaluation of a Bayesian pharmacokinetic estimator and optimal, sparse sampling strategies for ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40: 1860–1865

- Kavallaris M, Annereau JP, Barret JM. Potential mechanisms of resistance to microtubule inhibitors. *Semin Oncol* 2008;35(3 Suppl 3):S22–S27.
- Khan A, Luduena F. Different effects of vinblastine on the polymerization of isotypically purified tubulins from bovine brain. *Invest New Drugs* 2003;21:3–13.
- Kline CLB, Schiccitano A, Zhu J, et al. Personalized dosing via pharmacokinetic monitoring of 5-fluorouracil might reduce toxicity in early- or late-stage colorectal cancer patients treated with infusional 5-fluorouracil-based chemotherapy regimens. *Clin Colorectal Cancer*. 2014;13(2):119-126.
- Koeller JM, Trump DL, Tutsch KD, et al. Phase I clinical trial and pharmacokinetics of carboplatin (NSC 241 240) by single monthly 30-minute infusion. *Cancer* 1986;57:222-225.
- Kruczynski A, Barret JM, Etiévant C, et al. Antimitotic and tubulin- interacting properties of vinflunine, a novel fluorinated Vinca alkaloid. *Biochem Pharmacol* 1998;55:635–648.
- Kruh GD, Gaughan KT, Godwin A, et al. Expression pattern of MRP in human tissues and adult solid tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1256–1258.
- Lai-Sim Au J, Rustum YM, Ledesma EJ, et al. Clinical pharmacological studies of concurrent infusion of 5-fluorouracil and thymidine in treatment of colorectal carcinomas. *Cancer Res* 1982;42: 2930-2937.
- Lejeune a, Skorupski K, Frazier S, et al. Aggressive local therapy combined with systemic chemotherapy provides long-term control in grade II stage 2 canine mast cell tumour: 21 cases (1999-2012). *Vet Comp Oncol*. May 2013:1-14.

- Lengfeld AM, Dietrich J, Schultze-Maurer B. Accumulation and release of vinblastine and vincristine in HeLa cells: light microscopic, cinematographic, and biochemical study. *Cancer Res* 1982;42:3798–3805.
- Lennard L, Van Loon JM, Lilleyman JS et al. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 1987;41:18-25.
- Levêque D, Jehl F. Molecular pharmacokinetics of catharanthus (vinca) alkaloids. *J Clin Pharmacol* 2007;47:579–588.
- List AF, Kopecky KJ, Willman CL, et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 2004;98:3212–3220.
- Litterst CL, Torres IJ, Guarino AM. Plasma levels and organ distribution of platinum in the rat, dog, and dogfish shark following single intravenous administration of cis-dichlorodiammineplatinum (11). *J Clin Hematol Oncol* 1976;7:169-179.
- Liu CT, Higbee GA. Determination of body surface area in the rhesus monkey. *J Appl Physiol* 1976;40:101-104.
- Lobert S, Puozzo C. Pharmacokinetics, metabolites, and preclinical safety of vinflunine. *Semin Oncol* 2008;35(3 Suppl 3):S28–S33.
- Lobert S, Vulevic B, Correria JJ. Interaction of vinca alkaloids with tubulin: a comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine. *Biochemistry* 1996;35:6806–6814.

- Lockhart AC, Tirona RG, Kim RB. Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in cancer and chemotherapy. *Mol Ther* 2003;2:685–698.
- Long D, Koren G, James A. Ethics of drug studies in infants: how many samples are required for accurate estimation of pharmacokinetic parameters in neonates. *J Pediatr*. 1987;111:918–921
- Loveless H, Arena E, Felsted RL, et al. Comparative mammalian metabolism of adriamycin and daunorubicin. *Cancer Res* 1978;38:593-598.
- Lu K, Savaraj N, Loo LT. Pharmacologic disposition of 1,4-dihydroxy-5,8-bis {[2[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]amino}-9,10-anthracenedione dihydrochloride in the dog. *Cancer Chemother Pharmacol* 1984; 13:63-66.
- Lu K, Yap HY, Loo TL. Clinical pharmacokinetics of vinblastine by continuous intravenous infusion. *Cancer Res*. 1983;43:1405-1408.
- Ludwig R, Alberts D, et al. Evaluation of anticancer drug schedule dependency using an in vitro human tumor clonogenic assay. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1984;12:135-141.
- MacPherson JS, Smyth JF, Clements JA, et al. Pharmacokinetics and metabolism of mitoxantrone. *Br J Cancer* 1984;50:252-253.
- Markowitz JS, Donovan JL, DeVane CL, et al. Effect of St John's wort on drug metabolism by induction of cytochrome P450 3A4 enzyme. *JAMA* 2003;290:1500–1504.

- Marsoni S, Ungerleider RS, Hurson SB, et al. Tolerance to antineoplastics agents in children and adults. *Cancer Treat Rep* 1985;69:1263-1269.
- Mason SL, Grant IA, Elliott J, et al. Gastrointestinal toxicity after vincristine or cyclophosphamide administered with or without maropitant in dogs: A prospective randomised controlled study. *J Small Anim Pract.* 2014;55(8):391-398.
- Masson E, Zamboni WC. Pharmacokinetic optimization of cancer chemotherapy: effect on outcomes. *Clin Pharmacokinet* 1997;32:324-43
- Matsuda A, Tanaka A, Amagai Y, et al. Glucocorticoid sensitivity depends on expression levels of glucocorticoid receptors in canine neoplastic mast cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;144:321-328.
- McCaw DL, Miller MA, Ogilvie GK, et al. Response of canine mast cell tumors to treatment with oral prednisone. *J Vet Intern Med.* 1994;8:406-408.
- McCune JS, Hawke RL, LeCluyse EL, et al. In vivo and in vitro induction of human cytochrome P4503A4 by dexamethasone. *Clin Pharmacol Ther* 2000;68:356–366.
- Meissner M, Pinter A, Michailidou D, et al. Microtubule-targeted drugs inhibit VEGF receptor-2 expression by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Invest Dermatol* 2008;128:2084–2091.
- Minotti AM, Barlow SB, Cabral F. Resistance to antimitotic drugs in Chinese hamster ovary cells correlates with changes in the level of polymerized tubulin. *J Biol Chem* 1991;266:3987–3994.

- Monjanel S, Imbert AM, Favre R, et al. High-dose methotrexate: preliminary evaluation of a pharmacokinetic approach. *Cancer Chemother Pharmacol* 1979, 3, 189-196
- Moore MJ, Bunting P, Yuan S, et al. Development and validation of a limited sampling strategy for 5-fluorouracil given by bolus intravenous administration. *Ther Drug Monit* 1993;15:394-399
- Moore MJ, Erlichman C. Therapeutic drug monitoring in oncology: problems and potential in antineoplastic therapy. *Clin Pharmacokinet* 1987;13:205-27
- Muller C, Chatelut E, Gualano V, et al. Cellular pharmacokinetics of doxorubicin in patients with chronic lymphocytic leukemia: comparison of bolus administration and continuous infusion. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993;32:379-384.
- Nelson RL, Dyke RW, Root MA. Comparative pharmacokinetics of vindesine, vincristine, and vinblastine in patients with cancer. *Cancer Treat Rev* 1980;7(Suppl):17-24.
- NganVK, Bellman K, Hill B, et al. Novel actions of the antitumor drugs vinflunine and vinorelbine on microtubules. *Mol Pharmacol* 2001a;60:225-232.
- NganVK, Bellman K, Hill BT, et al. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by the semisynthetic vinca alkaloids vinorelbine and its newer derivative vinflunine. *Mol Pharmacol* 2001b;60:225-232.

- Nguyen SM, Thamm DH, Vail DM, et al. Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Vet Comp Oncol* 2013;1-8.
- Noble RC, Beer CT, Cutts JH. Role of chance observations in chemotherapy: Vinca rosea, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1958;76:882-894.
- Nooter K, Westerman AM, Flens MJ, et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tissues and adult solid cancers. *Clin Cancer Res* 1995;1:1301–1310.
- Ogilvie GK, Moore AS, Curtis CR. Evaluation of cisplatin-induced emesis in dogs with malignant neoplasia: 115 cases (1984-1987). *J Am Vet Med Assoc* 1989a;195:1399-1403.
- Ogilvie GK, Richardson RC, Curtis CR, et al. Acute and short-term toxicoses associated with the administration of doxorubicin to dogs with malignant tumors. *J Am Vet Med Assoc* 1989b;195:1584- 1587.
- Ogilvie GK. Chemotherapy. In: Withrow SJ, MacEwen EG, eds. *Small Animal Clinical Oncology*, 2nd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1996:70-86.
- Olver I. Chapter 39: Antinausea medications. In: *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice*. editors, BruceA. Chabner, DanL. Longo, 5th ed. Philadelphia, PA, 2011. p. 722-731
- Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, et al. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 2003;22:7280–7295.

- Owellen RJ, Hartke CA, Hains FO. Pharmacokinetics and metabolism of vinblastine in humans. *Cancer Res* 1977b;37:2597–2602.
- Owellen RJ, Hartke CA. The Pharmacokinetics of 4-Acetyl Tritium Vinblastine in Two Patients'. *Cancer Res.* 1975;(April):975-980.
- Owellen RJ, Root MA, Hains FO. Pharmacokinetic of vindesine and vincristine in humans. *Cancer Res* 1977a;37:2603–2607.
- Owen LN. (1980) TNM Classification of Tumours in Domestic Animals. World Health Organisation, Geneva.
- Page RL, Macy DW, Thrall DE, et al. Unexpected toxicity associated with use of body surface area for dosing melphalan in the dog. *Cancer Res* 1988;48:288-290.
- Pasquier E, André N, Braguer D. Targeting microtubules to inhibit angiogenesis and disrupt tumour vasculature: implications for cancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007;7:566–581.
- Pasquier E, André N, Street J, et al. Effective Management of Advanced Angiosarcoma by the Synergistic Combination of Propranolol and Vinblastine-based Metronomic Chemotherapy: A Bench to Bedside Study. *EBioMedicine.* 2016;6:87-95.
- Patel JN, Papachristos A. Personalizing chemotherapy dosing using pharmacological methods. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;76:879-896.
- Pattison J. Managing cytotoxic extravasation. *Nurs Times* 2002;98:32–34.
- Pellegrini F, Budman DR. Review: tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development. *Cancer Invest* 2005;23:264–273.

- Peterson RHF, Meyers MB, Spengler BA. Alterations of plasma membrane glycopeptides and gangliosides of Chinese hamster cells accompanying development of resistance to daunorubicin and vincristine. *Cancer Res* 1983;43:222–228.
- Pieters R, Hongo T, Loonen AH, et al. Different types of non-P-glycoprotein mediated multiple drug resistance in children with relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 1992;65:691–697.
- Pinkel D. The use of body surface area as a criterion of drug dosage in cancer chemotherapy. *Cancer Res* 1958; 18:853-856.
- Pinkerton CR. Multidrug resistance reversal in childhood malignancies: potential for a real step forward? *Eur J Cancer* 1996;32A:641–645.
- Powis G, Reece P, Ahamann DL. Effect of body weight on the pharmacokinetics of cyclophosphamide in breast cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987;20:219-222.
- Powis G. Effect of human renal and hepatic disease on the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Cancer Treat Rev* 1982;9:85-124.
- Preisler HD, Gessner T, Azarnia N, et al. Relationship between plasma adriamycin levels and the outcome of remission induction therapy for acute non lymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 1984;12:125-130.
- Price GS, Frazier DL. Use of body surface area (BSA)-based dosages to calculate chemotherapeutic drug dose in dogs: I. Potential problems with current BSA formulae. *J Vet Intern Med.* 1998;12(4):267-271.

- Pujol JL, Cupissol D, Gestin-Boyer C, et al. Tumor tissue and plasma concentrations of platinum during chemotherapy of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 1990;27:72-75.
- Raff EC. The role of multiple tubulin isoforms in cellular microtubule function. In: Hyams JF, Lloyd CD, eds. *Microtubules*. New York: Wiley-Liss, 1993:89–104.
- Rahmani R, Bruno R, Iliadis A, et al. Clinical pharmacokinetics of the antitumor drug Navelbine (5'-noranhydrovinblastine). *Cancer Res* 1987;47:5796–5799.
- Rahmani R, Zhou XJ. Pharmacokinetics and metabolism of vinca alkaloids. In: Workman P, Graham M, eds. *Pharmacokinetics and Cancer Chemotherapy: Cancer Surveys*. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993:269–285.
- Rahmani R, Zhou XJ. Pharmacokinetics and metabolism of vinca alkaloids. *Cancer Surv* 1993;17:269–281.
- Rai SS, Wolff J. Localization of critical histidyl residues required for vinblastine-induced tubulin polymerization and for microtubule assembly. *J Biol Chem* 1998;273:31131–31137.
- Ramirez J, Ogan K, Ratain MJ. Determination of vinca alkaloids in human plasma by liquid chromatography/ atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997;39:286–290.
- Rassnick KM, Bailey DB, Flory AB, et al. Efficacy of vinblastine for treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med*. 2008;22(6):1390-1396.

- Rassnick KM, Bailey DB, Russell DS, et al. A phase II study to evaluate the toxicity and efficacy of alternating CCNU and high-dose vinblastine and prednisone (CVP) for treatment of dogs with high-grade, metastatic or nonresectable mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*. 2010;8(2):138-152.
- Ratain MJ, Robert J, Vijgh WJF van der. Limited sampling models for doxorubicin pharmacokinetics. *J Clin Oncol* 1991;9:871-6.
- Ratain MJ, Schilsky RL, Choi KE, et al. Adaptive control of etoposide dosing: impact of inpatient pharmacodynamic variability. *Clin Pharmacol Ther* 1989;45:226-233.
- Ratain MJ, Schilsky RL, Conley BA, et al. Pharmacodynamics in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 1990;8:1739-53.
- Ratain MJ, Vogelzang NJ. Limited sampling model for vinblastine pharmacokinetics. *Cancer Treat Rep* 1987;71:935-939.
- Ratain MJ, Vogelzang NJ. Phase I and pharmacological study of vinblastine by prolonged continuous infusion. *Cancer Res* 1986;46:4827-4830.
- Ratain MJ. Pharmacogenetics of amonafide: An active drug in breast cancer. *Cancer Invest* 1993;12(Suppl 1):38 (abstract).
- Reece PA, Stafford I, Russell J, et al. Creatinine clearance as a predictor of ultrafilterable platinum disposition in cancer patients treated with cisplatin: Relationship between peak ultrafilterable platinum plasma levels and nephrotoxicity. *J Clin Oncol* 1987;5:304-309.

- Reich SD. Clinical correlation of adriamycin pharmacology. *Pharmacol Ther* 1978;2:239-249.
- Reilly JJ, Workman P. Normalisation of anticancer drug dosage using body weight and surface area: is it worthwhile? A review of theoretical and practical considerations. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993;32:411-418.
- Remy J, Daburon E, Villiers PA, et al. Changes in intestinal absorption induced by acute irradiation in pigs. *Strahlentherapie* 1974;148:95-106.
- Richard B, Fabre G, Fabre I, et al. Excretion and metabolism of mitoxantrone in rabbits. *Cancer Res* 1989;49:833-837.
- Robat C, London C, Bunting L, et al. Safety evaluation of combination vinblastine and toceranib phosphate (Palladia®) in dogs: A phase I dose-finding study. *Vet Comp Oncol*. 2012;10(3):174-183.
- Robert J, Iliadis A, Hoerni, B, et al. Pharmacokinetics of adriamycin in breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1982;18:739-745.
- Robert J, Monnier A, Poutignat N, et al. A pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the new anthracycline pirarubicine in breast cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991;29:75-79.
- Robert J. Use of pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship in the development of new anthracyclines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993;32:99-102.
- Rodman JH, Abromovitch M, Sinkule JA, et al. Clinical pharmacodynamics of continuous infusion of teniposide. *J Clin Oncol* 1987;5:1007-1014.

- Rodriguez CO, Kraegel SA, Peaston AE, et al. A phase I trial of carboplatin in canine neoplasms. *Proc Vet Cancer Soc* 1992;59 (abstract).
- Rodvold KA, Rushing DA, Tewksbury DA. Doxorubicin clearance in the obese. *J Clin Oncol* 1988;6:1321-1327.
- Rowinsky EK, Donehower RC. The clinical pharmacology and use of antimicrotubule agents in cancer chemotherapeutics. *Pharmacol Ther* 1992;52:35–84.
- Rowinsky EK. Chapter 13: Antimitotic drugs. In: *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice*. editors, Bruce A. Chabner, Dan L. Longo, 5th ed. Philadelphia, PA, 2011. p. 216-266
- Saam J, Critchfield GC, Hamilton SA, Roa BB, Wenstrup RJ, Kaldate RR. Body surface area-based dosing of 5-fluorouracil results in extensive interindividual variability in 5-fluorouracil exposure in colorectal cancer patients on FOLFOX regimens. *Clin Colorectal Cancer*. 2011;10(3):203-206.
- Safa AR, Glover CJ, Meyers MB, et al. Vinblastine photoaffinity labeling of a high molecular weight surface membrane glycoprotein specific for multidrug-resistant cells. *J Biol Chem* 1986;261:6137–6140.
- Samara E, Granneman R. Role of population pharmacokinetics in drug development. A pharmaceutical industry perspective. *Clin Pharmacokinet*. 1997;32:294–312
- Santini J, Milano G, Thyss A, et al. 5-FU therapeutic monitoring with dose adjustment leads to an improved therapeutic index in head and neck cancer. *Br J Cancer* 1989;59:287-290.

- Savaraj N, Lu K, Manuel V, et al. Clinical kinetics of 1,4-dihydroxy-5,8-bis-
{[2[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]amino}-9,10-anthracenedione dihydrochloride. *Clin
Pharmacol Ther* 1982;31:312-316.
- Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL. Overexpression of a Mr 110000
vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance *Cancer Res*
1993;53:1475–1479.
- Schmidt-Nielsen K. Energy metabolism, body size, and prob-
lems of scaling. *Fed Proc* 1970;29:1524-1532.
- Schultze E. Capitolo 48: Interpretation of Canine Leukocyte Responses. In
Schalm's veterinary hematology, 6th ed., editors, Douglas J. Weiss, K. Jane Wardrop.
Blackwell, Ames, Iowa, 2010. pp. 321-334
- Seifert P, Baker LH, Reed ML. Comparison of continuously infused 5FU with
bolus injection in treatment of patients with colorectal adenocarcinoma. *Cancer*
1975;36:123-128.
- Selting KA, Ogilvie GK, Gustafson DL, et al. Evaluation of the effects of
dietary n-3 fatty acid supplementation on the pharmacokinetics of doxorubicin in dogs
with lymphoma. *Am J Vet Res.* 2006;67(1):145-151.
- Sethi VS, Thimmaiah KN. Structural studies of the degradation products of
vincristine dihydrogen sulfate. *Cancer Res* 1985;45:4386–4389.
- Shah id MJ, Alami SY, Nassar VH, et al. Primary intestinal lymphoma with
paraproteinemia. *Cancer* 1975;35:848-858.

- Sharma RK. Vincristine and gastrointestinal transit. *Gastroenterology* 1988;95:1435–1436.
- Singer WD, Jordan MA, Wilson L, et al. Binding of vinblastine to stabilized microtubules. *Mol Pharmacol* 1989;36:366–370.
- Sledge DG, Webster J, Kiupel M. Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *Vet J.* 2016:1-12.
- Smrkovski O a, Essick L, Rohrbach BW, et al. Masitinib mesylate for metastatic and non-resectable canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 2015;13(3):314-21
- Sorensen BT, Stromgren A, Jakobsen P, et al. A limited sampling method for estimation of the carboplatin area under the curve. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993;31:324-327
- Speth PAJ, Linssen PCM, Boezeman JBM, et al. Cellular and plasma adriamycin concentrations in long term infusion therapy of leukemia patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987;20:305-310.
- Spiers DE, Candas V. Relationship of skin surface area to body mass in the immature rat: A reexamination. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1984;56:240-243.
- Sreekumar KP, Nirmalan G. Estimation of the total surface area in Indian elephants (*Elephas maximus indicus*). *Vet Res Commun* 1990;14:5-17.

- Stanclift RM, Gilson SD. Administration and Surgical Excision in Treatment. *J Am Vet Med Assoc.* 2008;232(1):53-62.
- Steele WH, King DJ, Barber HE, et al. Protein binding of prednisone and vinblastine in the serum of normal subjects and subjects with Hodgkin's disease. *Eur J Clin Pharmacol* 1983;24:683–687.
- Stewart CF, Arbuck SG, Fleming RA, et al. Relation of systemic exposure to unbound etoposide and hematologic toxicity. *Clin Pharmacol Ther* 1991;50:385-393
- Stewart LF, Arbuck SG, Fleming RA, et al. Changes in the clearance of total and unbound etoposide in patients with liver dysfunction. *J Clin Oncol* 1990;8:1874-1879.
- Stockham SL, Scott MA. Capitolo 12: Enzymes. In *Fundamentals of veterinary clinical pathology*, Stockham SL & Scott MA eds. Ames, Iowa, Blackwell Publishing, 2008. pp. 639-674.
- Stokol T. Capitolo 80: Essential Thrombocythemia and Reactive Thrombocytosis. In *Schalm's veterinary hematology*, 6th ed., editors, Douglas J. Weiss, K. Jane Wardrop. Blackwell, Ames, Iowa, 2010. pp. 605-611
- Stoller RG, Hande KR, Jacobs SA, et al. Use of plasma pharmacokinetics to predict and prevent methotrexate toxicity. *N Eng J Med* 1977, 297, 630-634.
- Swan RW. Stagnant loop syndrome resulting from small-bowel irradiation injury and intestinal by-pass. *Gynecol Oncol* 1974;2:441- 445.

- Tester W, Forbes W, Leighton J. Vinorelbine-induced pancreatitis: a case report. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1631.
- Thamm DH, Mauldin E a, Vail DM. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor--41 cases (1992-1997). *J Vet Intern Med.* 1999;13:491-497.
- Thamm DH, Turek MM, Vail DM. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. *J Vet Med Sci.* 2006;68:581-587.
- Theilen GH. Veterinary medical oncology. In: Ettinger SJ, ed. *Textbook of Veterinary Internal Medicine, 1 st ed.* Philadelphia, PA: WB Saunders; 1975:127-149.
- Thompson AH, Whiting B. Bayesian parameter estimation and population pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 1992;22:447-467
- Toso RJ, Jordan MA, Farrell KW, et al. Kinetic stabilization of the microtubule dynamic instability in vitro by vinblastine. *Biochemistry* 1993;32:185-193.
- Tranchand B, Poin YD, Minuit MP, et al. High-dose melphalan dosage adjustment: possibility of using a test-dose. *Cancer Chem Ther* 1982;23:95-100
- Travis CC, White RK. Interspecific scaling of toxicity data. *Risk Anal* 1988;8:119-125.
- Troger V, Francois E, Frenay M, et al. Analysis of tissue platinum distribution in patients with cancer of the oesophagus. *Eur J Cancer* 1991;27:259-263
- Tucker RW, Owellen RJ, Harris SB. Correlation of cytotoxicity and mitotic spindle dissolution by vinblastine in mammalian cells. *Cancer Res* 1977;37:4346-4351.

- Twelves CJ, Dobbs NA, Michael Y, et al. Clinical pharmacokinetics of epirubidin. The importance of liver biochemistry tests. *Br J Cancer* 1992;66:765-769.
- Upreti M, Lyle CS, Skaug B, et al. Vinblastine-induced apoptosis is mediated by discrete alterations in subcellular location, oligomeric structure, and activation status of specific Bcl-2 family members. *J Biol Chem* 2006;281:15941–15950.
- Vacca A, Iurlaro M, Ribatti D, et al. Antiangiogenesis is produced by non-toxic doses of vinblastine. *Blood* 1999;94:4143–4155.
- van den Bongard HJ, Mathot RA, Beijnen JH, et al. Pharmacokinetically guided administration of chemotherapeutic agents. *Clin Pharmacokinet* 2000;39:345–367.
- Van Echo MJ, DA, Tipping S J, Olman EA, et al. Pharmacokinetics and dosage reduction of cis-diamine(1,1-cyclobutannedicarboxylato) platinum in patients with impaired renal function. *Cancer Res* 1984;44:5432-5438
- van Meer t en E, Ver weij J, Schellens JH. Antineoplastic agents. Drug interactions of clinical significance. *Drug Saf* 1995;12:168–182.
- Van Prooijen R, van der Kleijn E, Haanen C. Pharmacokinetics of cytosine arabinoside in acute myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 1977;1:744-750.
- Van Tellingen O, Beijnen JH, NooyenWJ. Analytical methods for the determination of vinca alkaloids in biological specimens: a survey of the literature. *J Pharm Biomed Anal* 1991;9:1077–1082.
- Vaughan JA, Adams T. Surface area of the cat. *J Appl Physiol* 1967;22:956-958.

- Vermorken JB, van der Vijgh WJF, Klein I, et al. Pharmacokinetics of free and total platinum species after rapid and prolonged infusions of cisplatin. *Clin Pharmacol Ther* 1986;39:136-144.
- Veterinary cooperative oncology group - common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2011;5:1–30.
- Vickery KR, Wilson H, Vail DM, Thamm DH. Dose-escalating vinblastine for the treatment of canine mast cell tumour. *Vet Comp Oncol*. 2008;6(2):111-119.
- Vistica D. Cellular pharmacokinetics of phenylalanine mustards. *Pharmacol Ther* 1983;22:379-422.
- Vriesendorp HM, Vriesendorp R, Vriesendorp FJ. Prediction of normal tissue damage induced by cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987;19:273-276.
- Weiss AJ, Metter GE, Fletcher WS, et al. Studies on adriamycin using a weekly regimen demonstrating its clinical effectiveness and lack of cardiac toxicity. *Cancer Treat Rep* 1976;60:813
- Wikipedia: <https://en.wikipedia.org/wiki/Vinblastine> - cite_note-2
- Wilson L, Jordan MA. Pharmacological probes of microtubule function. In: Hyams JF, Lloyd CD, eds. *Microtubules*. New York: Wiley-Liss, 1994:59–83.
- Wilson L, Panda D, Jordan MA. Modulation of microtubule dynamics by drugs: a paradigm for the actions of cellular regulators. *Cell Struct Funct* 1999;24:329–335.

- Wittenburg LA, Thamm DH, Gustafson DL. Development of a limited-sampling model for prediction of doxorubicin exposure in dogs. *Vet Comp Oncol.* 2014;12(2):114-119.
- Wolf CR, MacPherson JS, Smyth JE. Evidence for the metabolism of mitoxantrone by microsomal glutathione transferases and 3-methylcholanthrene-inducible glucuronosyl transferases. *Biochem Pharmacol* 1986;35:1577-1581.
- Wood M. Pharmacokinetic drug interaction in anaesthetic practice. *Clin Pharmacokinet* 1991;21:285–307.
- Yesair DW, Schwartzbach E, Shuck D, et al. Comparative pharmacokinetics of daunomycin and adriamycin in several animal species. *Cancer Res* 1972;32:1177-1183.
- Ylinen M, Suhonen P, Naaranlahti T, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of major indole alkaloids of *Catharanthus roseus*. *J Chromatogr* 1990;505:429–434.
- Yun-San Yip A, Yuen-Yuen Ong E, Chow LW. Vinflunine: clinical perspectives of an emerging anticancer agent. *Expert Opin Investig Drugs* 2008;17:583–591.
- Yvon A-M, Wadsworth P, Jordan MA. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Mol Biol Cell* 1999;10:947–959.
- Zaman GJ, Flens JM, van Leusden MR, et al. The human multidrug resistance-protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8822–8826.

- Zhai Y, Kronebusch PJ, Simon PM, et al. Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis. *J Cell Biol* 1996;135:201–214.
- Zhou XJ, Placidi M, Rahmani R. Uptake and metabolism of vinca alkaloids by freshly isolated human hepatocytes in suspension. *Anticancer Res* 1994;14:1017–1022.
- Zhou-Pan XR, Seree E, Zhou XJ, et al. Involvement of human liver cytochrome P450 3A in vinblastine metabolism: drug interactions. *Cancer Res* 1993;53:5121–5126.
- Zwelling LA, Kuhn KW. Mechanism of action of cis-dichlorodiammineplatinum (II). *Cancer Treat Rep* 1979;63:1439-1444.

Ringraziamenti

Alla fine di questo percorso, sono molte le persone da ringraziare, dagli studenti ai professori, dai tecnici di laboratorio ai proprietari, ognuno di loro ha contribuito ad arricchirmi e a rendermi una persona e un professionista migliore.

Vorrei ringraziare alcune persone in particolare: Roberta, la mia vita, senza di lei tutto ciò sarebbe stato molto più duro e forse irrealizzabile. La mia famiglia, che con il proprio sostegno silenzioso, forte e costante, mi ha insegnato a stringere i denti, e andare avanti nonostante tutto.

Il mio relatore, “capo”, collega e amica Veronica. Mi ha educato alla medicina veterinaria trasmettendomi passione e ottimismo, due valori per niente scontati e indispensabili per il nostro mestiere. Mi ha dato la possibilità di confidarmi con lei in ogni occasione, insegnandomi l’arte del “non sprecare preoccupazioni se non necessario”.

I miei “guru” della parte analitica, Mario Giorgi e Alessandro Saba e i loro collaboratori, Virginia, Ongki, Riccardo e Beatrice per avermi aiutato, sostenuto e sopportato in questi anni.

Gli studenti di medicina veterinaria che in questi anni hanno condiviso con me la loro spensieratezza e allegria rendendo ogni giorno più nuovo e più leggero.

Grazie di cuore.