

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE DEI SERVIZI:
PROGETTO N. 4 “ULTRASONOLOGIA IN MEDICINA
UMANA E VETERINARIA”**

Ciclo *XXIV*

Settore Concorsuale di afferenza: **06/D4**
Settore Scientifico disciplinare: **MED/12**

TITOLO TESI

**VALUTAZIONE PRECOCE DELLA RISPOSTA A SORAFENIB
NEL CARCINOMA EPATOCELLULARE MEDIANTE
QUANTIFICAZIONE DELL'ECOGRAFIA CON CONTRASTO
CON SOFTWARE SONOTUMOR**

Presentata dalla Dott.ssa: **Silvia Gualandi**

Coordinatore Dottorato
Chiar.mo Prof. Luigi Bolondi

Relatore
Chiar.mo Prof. Luigi Bolondi

Esame finale anno 2012

Indice

1. INTRODUZIONE	3
1.1 PREMESSA	3
1.2 ECOGRAFIA CON MEZZO DI CONTRASTO	5
1.3 MEZZO DI CONTRASTO ECOGRAFICO: SONOVUE®	6
1.4 SORAFENIB NEL TRATTAMENTO DEL CARCINOMA EPATOCELLULARE	8
2. STUDIO PILOTA	9
2.1 SCOPO DELLO STUDIO	9
2.2 PAZIENTI E METODI.....	9
<i> Criteri di inclusione</i>	9
<i> Criteri di esclusione</i>	10
<i> Valutazioni effettuate con le tecniche di imaging durante lo studio</i>	11
<i> Identificazione e documentazione baseline delle lesioni tumorali:lesioni misurabili/non-misurabili e target con CE-CT/MRI</i>	12
<i> Lesioni target e valutabili mediante ecografia con contrasto SonoVue®</i>	12
<i> Dose e modalità di somministrazione del mezzo di contrasto ecografico</i>	13
<i> Trattamento antitumorale</i>	13
<i> Valutazione della risposta tumorale basata su CE-CT o CE-MRI in base ai criteri RECIST</i>	13
<i> Risposta tumorale basata su CE-CT o CE-MRI in base ai criteri RECIST modificati</i>	15
<i> Risposta tumorale basata sull'ecografia con mezzo di contrasto SonoVue®</i>	16
2.3 RISULTATI.....	17
2.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	33
BIBLIOGRAFIA	36

1. Introduzione

1.1 Premessa

Tradizionalmente la valutazione della risposta alla terapia antitumorale era basata sui cambiamenti dimensionali del tumore durante il trattamento, come rilevato con le tecniche convenzionali di imaging usando i criteri World Health Organization (WHO) e, più recentemente, Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST)¹. Questi criteri furono sviluppati originalmente per valutare la risposta a composti citotossici, cioè in grado di causare la morte delle cellule tumorali e conseguentemente la riduzione del tumore, perfino in assenza di necrosi. Le nuove terapie antitumorali con target molecolare possono inizialmente indurre necrosi, emorragia e/o edema senza determinare riduzione dimensionale del tumore o al contrario provocandone perfino un iniziale aumento come evidenziato dalle tecniche di imaging convenzionale. Inoltre spesso la risposta, in termini di variazione dimensionale del tumore, è evidente, con le tecniche di imaging convenzionale, solo nelle fasi avanzate della terapia. La maggior parte delle terapie con target molecolare che hanno mostrato un beneficio in termini di sopravvivenza determinano una risposta obiettiva basata sui criteri RECIST solo in meno del 10% dei soggetti, come erlotinib nel tumore polmonare non-a piccole cellule (Non Small Cell Lung Cancer-NSCLC, 9%²), temsirolimus nel tumore renale (Renal Cell Carcinoma- RCC, 8%³), bevacizumab nel tumore coloretale metastatico (Colorectal Cancer-CRC, 10%⁴), e, più recentemente, sorafenib nel carcinoma epatocellulare (Hepatocellular Carcinoma-HCC, 2.7%⁵).

Quindi, la riduzione dimensionale del tumore non può rappresentare il miglior indicatore del beneficio terapeutico del paziente che assume questa terapia con target molecolare e la validità dei criteri RECIST nel valutare la risposta a queste terapie è stata recentemente riesaminata⁶ e sono stati proposti criteri aggiuntivi.

Nel 2004 “the gastrointestinal soft tissue sarcomas (GIST) consensus conference”, realizzata sotto il patrocinio della European Society for Medical Oncology (ESMO), propose di modificare tali criteri nella valutazione dei pazienti con tumori GIST trattati con imatinib (inibitore tirosin-chinasi

multitarget con proprietà antiangiogenetiche), includendo tra essi la riduzione della densità tumorale alla tomografia computerizzata-TC (Computed Tomography-CT-attenuation coefficient Hounsfield Units) e la riduzione della captazione di FDG (fluoro-desoxy-glucose) alla FDG-positron emission tomography (PET) (maximum standardized uptake value, SUV max)⁷. La French Federation of Cancer Centers⁸ indicò come ulteriore criterio la diminuzione della vascolarizzazione intratumorale valutata mediante l'ecografia con mezzo di contrasto (contrast enhanced ultrasound-CE-US). Nel 2000 "the European Association for the Study of the Liver (EASL)" propose di migliorare i criteri di valutazione di risposta dell'epatocarcinoma alla terapia prendendo in considerazione la necrosi tumorale indotta dal trattamento. In particolare la quantificazione della riduzione dell'area tumorale attiva (definita in base all'assunzione di contrasto nella fase arteriosa) impiegando le tecniche di imaging (contrast-enhanced-CE dynamic CT o Magnetic Resonance Imaging-MRI) veniva considerata come il metodo ottimale per stimare la risposta dell'epatocarcinoma al trattamento⁹. Più recentemente, un comitato esperto radunato dalla "American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)" ha adattato il concetto di tumore attivo introdotto da EASL e ha proposto criteri RECIST modificati per la valutazione della risposta/progressione tumorale in trials clinici di soggetti con HCC, considerando cambiamenti nella somma dei diametri di tumore attivo (contrast enhancement in fase arteriosa) in lesioni target come stimato dalle tecniche di imaging (dynamic contrast-enhanced-CE-computed tomography o magnetic resonance)¹⁰. Dynamic CE-CT, MRI e PET permettono un imaging morfologico e funzionale della neoplasia e sono state impiegate in diversi trials clinici per valutare la risposta tumorale a terapie con target molecolare e proprietà antiangiogenetiche. L'impiego di queste tecniche di imaging nella pratica quotidiana è, tuttavia, limitato da diversi fattori che comprendono: la disponibilità (PET/MRI), i costi (PET/MRI), i rischi correlati alla ripetuta esposizione a radiazioni ionizzanti (CT-scan) e alla somministrazione di mezzi di contrasto potenzialmente nefrotossici (CE-CT-scan/MRI). Il numero di pazienti affetti da neoplasia che possono beneficiare di terapie con target molecolare è in crescita, parallelamente all'aumento della disponibilità di queste terapie per diversi tipi di tumori che comprendono, tra gli altri, sorafenib per il carcinoma renale ed epatico (RCC¹¹ e HCC⁵), bevacizumab per il carcinoma

colo-rettale, polmonare non-a piccole cellule e della mammella (CRC¹², NSCLC¹³ e breast cancer-BC¹⁴), erlotinib per il carcinoma polmonare non-a piccole cellule (NSCLC¹⁵), temsirolimus per il carcinoma renale (RCC¹⁶), sunitinib per i tumori stromali gastrointestinali e il carcinoma renale (GIST e RCC¹⁷) e imatinib per GIST¹⁸. Ciascuna di queste terapie è relativamente costosa e ha mostrato un beneficio clinico solamente in una parte dei soggetti trattati. Pertanto vi è la necessità di tecniche di imaging accurate e non-invasive adatte a valutare con attendibilità la risposta a queste terapie, permettendo, precocemente, una decisione sulla prosecuzione della terapia per la durata stabilita, la sospensione o la modificazione del trattamento nel caso di resistenza primaria o progressione della malattia dopo una risposta iniziale.

1.2 Ecografia con mezzo di contrasto

La CE-US è una tecnica di imaging funzionale che permette una valutazione della perfusione tumorale attraverso l'iniezione di un mezzo di contrasto ecografico (ultrasound contrast agent-UCA). I mezzi di contrasto ecografici per uso endovenoso sono costituiti da microbolle contenenti gas e vengono somministrati per via endovenosa in piccoli volumi. Le microbolle rimangono a livello intravascolare per diversi minuti e non diffondono nell'interstizio¹⁹. L'ecografia con mezzo di contrasto sfrutta gli effetti acustici non lineari delle microbolle per fornire immagini ad alta risoluzione della vascolarizzazione tissutale. Inoltre, la CE-US è l'unica tecnica di imaging che permette la visualizzazione dei patterns vascolari in real-time²⁰. In Europa la CE-US è una tecnica affermata e non-invasiva per la valutazione della funzione ventricolare sinistra, la visualizzazione della macrocircolazione (circolazione intracranica, carotidi, aorta, vasi periferici) e della microcircolazione (per la caratterizzazione delle lesioni focali epatiche e mammarie). Quando impiegata nell'imaging epatico, la CE-US ha una sensibilità e una specificità per la dimostrazione della vascolarizzazione intralesionale superiori a quelle dell'ecografia basale (unenhanced-US) e almeno simili a quelle della CE-CT e MRI, rappresentando un'alternativa a CECT/MRI per l'identificazione delle lesioni di HCC in soggetti affetti da malattie epatiche croniche^{21, 22,23,24, 25, 26,27, 28, 29, 30}. Dati recenti indicano che la CE-US può essere un valido strumento per valutare la risposta tumorale alle terapie con target molecolare e con proprietà antiangiogenetiche in diversi tipi di tumore inclusi i sarcomi dei tessuti molli, GIST, melanoma,

tumore renale ed epatico^{31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39}. Nei tumori GIST, questa tecnica di imaging ha mostrato di predire la risposta tumorale all'imatinib già ad 1 settimana dall'inizio della terapia, prima di ogni cambiamento dimensionale e di permettere precocemente l'individuazione della resistenza secondaria, da 6 a 9 mesi prima di scoprire un incremento dimensionale del tumore con i metodi convenzionali^{32,34}. Nei soggetti con carcinoma renale avanzato in terapia con sorafenib, la riduzione della perfusione tumorale in corso di trattamento (riduzione della captazione del contrasto $\geq 20\%$), valutata con la CE-US, si è dimostrata correlata con la sopravvivenza libera da progressione (progression free survival-PFS) e la sopravvivenza globale (overall survival-OS)^{37, 39}. In questi studi i cambiamenti nella perfusione tumorale sono stati qualitativamente valutati basandosi sulla variazione percentuale dell'assunzione di contrasto nella lesione tumorale target rispetto al pretrattamento. La valutazione qualitativa dei cambiamenti della perfusione con la CE-US può rappresentare un prezioso strumento per determinare precocemente la risposta alla terapia nei casi di una marcata riduzione o aumento della vascolarizzazione tumorale durante il trattamento. Invece quando i cambiamenti nella vascolarizzazione sono meno pronunciati, la valutazione qualitativa presenta ovvie limitazioni in termini di obiettività e di riproducibilità. Recentemente sono stati sviluppati dei softwares per la quantificazione della perfusione tumorale che permettono di ottenere un imaging accurato definendo la curva di perfusione con il calcolo di diversi parametri che la caratterizzano. Con l'impiego di questi softwares per la quantificazione ci si aspetta di ottenere un'analisi obiettiva dei cambiamenti della perfusione tumorale ed assicurare un'adeguata riproducibilità dei risultati.

1.3 Mezzo di contrasto ecografico: SonoVue®

SonoVue® è un mezzo di contrasto ecografico prodotto originalmente da Bracco, commercializzato in Europa dal 2001. E' caratterizzato da una struttura a microbolle consistenti in un gas a bassa solubilità (esafluoruro di zolfo) stabilizzato da una membrana di fosfolipidi. Rimane nello spazio intravascolare ed aumenta notevolmente i segnali ecografici. Perciò, SonoVue® è utile nell'intensificare l'ecogenicità del sangue per la valutazione del flusso ematico nei vasi.

SonoVue® è approvato per le seguenti indicazioni:

1. ecocardiografia: in soggetti con sospetta o nota malattia cardiovascolare, per ottenere l'opacificazione delle camere cardiache ed intensificare la delineazione del margine endocardico del ventricolo sinistro (2.0 mL in somministrazione endovenosa, in bolo);
2. studio della macrocircolazione: aumenta l'accuratezza nel riconoscimento o nell'esclusione di anomalie delle arterie cerebrali, delle carotidi e delle arterie periferiche (2.4 mL in somministrazione endovenosa, in bolo);
3. studio della microcircolazione: migliora la definizione della vascolarizzazione delle lesioni epatiche e mammarie rispetto all'eco-Doppler, portando ad una più specifica caratterizzazione della lesione focale (2.4 mL per somministrazione endovenosa, in bolo).

In riferimento al 30 settembre 2007⁴⁰, sono stati condotti 65 studi clinici, portati a termine, sponsorizzati dalla Bracco, per un totale di 4730 soggetti arruolati (4568 soggetti in SonoVue®, 162 soggetti in placebo/composto di confronto).

I dati derivanti da questi studi clinici e dalla sorveglianza post-marketing (post-marketing surveillance-PMS) indicano che SonoVue® è un mezzo di contrasto ecografico molto sicuro e ben tollerato. Nei trials clinici l'incidenza di eventi avversi è stata bassa (tutti: 11.9%, 6.1% farmaco-relati; gravi: 0.3%, 0.2% farmaco-relati), gli eventi più frequenti farmaco-relati sono stati cefalea (1.2%) e nausea (0.7%) a rapida risoluzione. Basandosi sui dati post-marketing, la frequenza di eventi avversi gravi dopo la somministrazione di SonoVue® è 0.014% (1.4:10,000). La maggioranza degli eventi gravi registrati sono su base allergica o cardiaca: la loro frequenza stimata è dell'ordine di 0.8-1: 10,000 and 0.4:10,000, rispettivamente. Il rischio di eventi gravi dopo la somministrazione di SonoVue® è più basso di quello riportato per i mezzi di contrasto iodati (agenti contenenti iodio: 0.16% o 1.6:1,000; agenti senza iodio: 0.03% o 3:10,000)⁴¹ e simile a quello riportato per i mezzi di contrasto della risonanza magnetica (0.01 % o 1:10,000)^{42,43}.

Il tasso di mortalità registrato dopo la somministrazione di SonoVue® è dell'ordine di 7: 1 milione di soggetti esposti. Queste cifre sostengono favorevolmente il confronto con il rischio di eventi fatali riportati per i mezzi di contrasto di CT, MRI e di altre procedure imaging-relate⁴¹.

1.4 Sorafenib nel trattamento del carcinoma epatocellulare

Sorafenib (Nexavar®, Bayer Pharmaceuticals) è un farmaco assunto per via orale, inibitore tirosin-chinasi multi target, che inibisce la proliferazione delle cellule tumorali e l'angiogenesi tumorale. I risultati iniziali di uno studio di fase 2 non-controllato su 137 soggetti affetti da HCC avanzato hanno dimostrato che sorafenib in monoterapia potrebbe avere un effetto terapeutico vantaggioso come risulta da una sopravvivenza globale (overall survival-OS) media e tempo alla progressione (time to progression-TTP) di 9.2 and 5.5 mesi, rispettivamente⁴⁴. Alla fine del 2007, tale farmaco è stato approvato in Europa e negli Stati Uniti come monoterapia per il trattamento dell'HCC avanzato, rappresentando il primo trattamento sistemico approvato per questa indicazione. L'approvazione ha trovato il suo fondamento sui dati positivi di un trial di confronto con placebo, di fase 3, denominato SHARP (Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol) che ha dimostrato che Nexavar prolungava la sopravvivenza globale del 44% (hazard ratio [HR]=0.69; p=0.0006) verso il placebo⁵. La sopravvivenza globale media risultava di 10.7 mesi nei soggetti trattati con Nexavar verso 7.9 mesi in quelli che assumevano placebo. Nel braccio Sorafenib è stato inoltre visto un miglioramento statisticamente significativo in termini di tempo alla progressione (media 5.5 vs. 2.8 mesi; HR: 0.58 (95% CI: 0.45, 0.74), p=0.000007)⁵. Gli eventi avversi più comunemente osservati nei soggetti in terapia con Nexavar sono stati la diarrea e la sindrome cutanea mano-piede (hand-foot skin reaction)⁵.

2. Studio pilota

2.1 Scopo dello studio

Questo studio è stato principalmente designato per valutare se è possibile identificare precocemente i soggetti con carcinoma epatico avanzato oppure non suscettibile di terapie chirurgiche o locoregionali che sono refrattari alla terapia con sorafenib. In particolare, per valutare se cambiamenti nella vascolarizzazione di una lesione epatica target, stimati quantitativamente con la CE-US mediante un software di quantificazione dedicato, possono predire precocemente la resistenza primaria alla terapia con sorafenib, valutata con la CE-MDCT o MRI usando i criteri RECIST standard¹. Con l'obiettivo di selezionare il/i parametro/i quantitativo/i più rappresentativo/i, il valore soglia adeguato e il miglior timing per la valutazione con la CE-US che permettano la predizione della resistenza primaria al farmaco nella popolazione target.

Il comitato etico ha approvato il disegno dello studio.

2.2 Pazienti e metodi

Criteri di inclusione

I soggetti dovevano possedere tutti i seguenti criteri di inclusione per essere eleggibili per l'arruolamento nello studio:

- soggetti adulti (età \geq 18 anni) maschi o femmine;
- consenso informato scritto e disponibilità ad eseguire quanto richiesto dal protocollo;
- diagnosi di HCC avanzato oppure non suscettibile di terapie chirurgiche o locoregionali confermata istologicamente o basata sui criteri AASDL^{45, 46} (studio iniziato nel 2009) come riportato di seguito:
 - nodulo \leq 1 cm: necessaria l'istologia;
 - nodulo tra 1-2 cm: necessarie due tecniche di imaging (CE-CT e CE-MRI o CEUS) che mostrano entrambe il tipico pattern vascolare per HCC (captazione del contrasto nella fase arteriosa e washout nelle fasi venosa portale o tardiva);

- nodulo >2 cm: necessaria una sola tecnica di imaging (CE-CT o CE-MRI o CEUS) che mostra il tipico pattern vascolare per HCC (captazione del contrasto nella fase arteriosa e washout nelle fasi venosa portale o tardiva);
- candidati ad iniziare trattamento con Sorafenib come monoterapia;
- nessuna precedente terapia sistemica antitumorale;
- almeno una lesione epatica non-trattata, misurabile secondo i criteri RECIST¹ e valutabile con la CEUS, così definita:
 1. diametro maggiore di 2 cm;
 2. percentuale di necrosi < 50% del volume totale della lesione tumorale;
 3. finestra acustica che permetta almeno 3 minuti di acquisizione continua delle immagini;
- ECOG performance status 0 o 1;
- almeno 4 settimane da una precedente chirurgia con risoluzione di tutti gli effetti acuti tossici di qualsiasi precedente trattamento chirurgico fino a Grade ≤ 1 (NCI CTC, Version 3.0);
- funzione epatica in classe A di Child-Pugh;
- soggetti che per localizzazione geografica possono accedere al centro ecografico;
- disponibilità e capacità di effettuare le visite programmate, le procedure dello studio e il piano di trattamento.

Criteri di esclusione

Sono stati esclusi da questo studio i soggetti che non soddisfavano i criteri di inclusione o che presentavano una qualsiasi delle seguenti condizioni:

- soggetti affetti da una qualsiasi patologia cardiaca clinicamente instabile prima della somministrazione di SonoVue® come:
 1. infarto miocardico in evoluzione;
 2. anamnesi di infarto miocardico acuto o procedura coronarica percutanea (percutaneous coronary interventions-PCI) entro i 3 mesi precedenti;
 3. peggioramento dell'angina a riposo entro i 7 giorni precedenti;
 4. peggioramento significativo dei sintomi cardiaci entro i 7 giorni precedenti;
 5. recenti interventi a livello coronarico o altri fattori indicativi di instabilità clinica;

6. insufficienza miocardica in classe NYHA III/IV (New York Heart Association);
 7. aritmie cardiache gravi (tachicardia ventricolare sostenuta o non-sostenuta sintomatica, flutter-fibrillazione; complessi prematuri ventricolari che si verificano vicino all'onda T precedente, complessi extrasistolici multifocali);
- soggetti affetti da insufficienza respiratoria (ipossiemia/ipercapnia) o con anamnesi nota di ipertensione polmonare;
 - allergia nota a uno o più dei componenti del mezzo di contrasto ecografico SonoVue®;
 - allergia nota ai mezzi di contrasto iodati o al mezzo di contrasto della risonanza magnetica;
 - qualsiasi altra controindicazione ad una delle tecniche di imaging (ecografia, CT o MRI);
 - qualsiasi controindicazione al trattamento con sorafenib;
 - assunzione di un composto in studio entro 30 giorni prima dell'ammissione in questo studio;
 - donne in gravidanza o allattamento (esecuzione di un test di gravidanza (β HCG sierica) entro 24 ore prima).

Valutazioni effettuate con le tecniche di imaging durante lo studio

La valutazione del tumore è stata eseguita con CE-MDCT o MRI entro 28 giorni prima dell'inizio del trattamento e poi durante la terapia ogni 8 settimane fino alla settimana 32 o fino a progressione documentata di malattia, interruzione del trattamento, o morte. In ogni soggetto è stata impiegata sempre la medesima metodica di imaging. L'imaging funzionale della lesione epatica target ottenuto mediante ecografia con contrasto SonoVue® è stato eseguito entro 1 settimana prima dell'inizio del trattamento e durante la terapia alla settimana 2, 4, 8 e 16, poi anche 24 e 32, impiegando riferimenti spaziali precisi per assicurare che la lesione esaminata fosse sempre la stessa.

Identificazione e documentazione baseline delle lesioni tumorali: lesioni misurabili/non-misurabili e target con CE-CT/MRI

Le lesioni tumorali identificate con CE-CT o MRI sono state distinte tra misurabili e non misurabili per i criteri RECIST¹:

1. lesione misurabile: lesione accuratamente misurabile in almeno una dimensione, con diametro maggiore (LD) almeno due volte lo spessore della slice impiegata (ad esempio baseline $LD \geq 20$ mm usando uno spessore della slice di 10 mm, o ≥ 10 mm se lo spessore della slice è 5 mm).
2. lesioni non-misurabili: tutte quelle che non rispettano i criteri suddetti: lesioni ossee, malattia con localizzazione leptomeningea, ascite, versamento pleurico/pericardico, linfangite, lesioni localizzate in un'area precedentemente irradiata....

Tutte le lesioni misurabili, fino a un massimo di 5 lesioni per organo e 10 in totale, sono state identificate come lesioni target, registrate e misurate. Sono state poi scelte come lesioni target quelle con il maggior valore di LD, facilmente riproducibili per le misure successive in CE-CT o MRI e comprendenti la/le lesione/i identificata/e come target per la valutazione con CE-US. Tutte le altre lesioni sono state identificate e registrate come lesioni non-target. La misura di queste lesioni non è stata eseguita, seguendole e indicando se “presenti” o “assenti”. La presenza di qualsiasi nuova lesione è stata registrata.

Lesioni target e valutabili mediante ecografia con contrasto SonoVue®

Per definire una lesione tumorale valutabile con la CE-US sono stati rispettati i seguenti requisiti:

- diametro maggiore di 2 cm;
- percentuale di necrosi < 50% del volume totale della lesione neoplastica;
- finestra acustica adatta per consentire un'acquisizione delle immagini per almeno 3 minuti in maniera continuativa.

La lesione target per lo studio con la CE-US è stata scelta tra le lesioni valutabili come quella più vascolarizzata, rappresentativa del pattern vascolare tipico dell'epatocarcinoma, con il diametro maggiore e adatta per effettuare misure ripetute accurate. Il contrast enhancement basale nella lesione target, valutato secondo i parametri quantitativi funzionali, è stato impiegato come

riferimento per valutare la risposta tumorale mediante la CEUS durante il trattamento. La lesione target è stata localizzata nel fegato con riferimenti precisi per assicurare che la lesione esaminata fosse sempre la stessa. Tutte le altre lesioni valutabili sono state identificate e registrate come lesioni non-target, senza necessità di follow-up con la CE-US.

Dose e modalità di somministrazione del mezzo di contrasto ecografico

La sospensione lattescente di microbolle di esafluoruro di zolfo (SF₆) viene ottenuta aggiungendo 5.0 mL di soluzione fisiologica alla polvere liofilizzata rispettando la tecnica standard di asepsi e agitando poi in maniera vigorosa per 20 secondi.

Una volta ricostituito, il mezzo di contrasto SonoVue® può essere lasciato a temperatura ambiente. Sebbene la sospensione sia utilizzabile per sei ore, per una durata superiore ai 15 minuti, si verifica che alcune delle bolle di maggiori dimensioni risalgono in superficie. Perciò, prima della somministrazione, occorre scuotere la fiala ricostituita di SonoVue® dall'alto al basso per rimettere in sospensione le microbolle. Tale mezzo di contrasto viene somministrato per via endovenosa, in bolo, attraverso un accesso venoso periferico nella quantità di 2.4 mL.

In questo studio è stata prevista, ad ogni visita, la somministrazione al massimo di due boli di SonoVue®, di 2.4 mL ciascuno (4.8 mL), a distanza di almeno 30 minuti. La seconda iniezione è stata prevista in caso di insuccesso tecnico del primo bolo.

Trattamento antitumorale

I soggetti dello studio ricevevano sorafenib in monoterapia. Il trattamento veniva iniziato al dosaggio raccomandato di 400 mg (2 x 200 mg) due volte al giorno, per via orale, lontano dai pasti (almeno 1 ora prima o 2 ore dopo il pasto). Il suddetto dosaggio veniva modificato se clinicamente indicato (effetti collaterali importanti). Ogni soggetto rimaneva in trattamento fino al verificarsi di progressione di malattia, rifiuto da parte del soggetto stesso a continuare la terapia o in caso di comparsa di effetti tossici inaccettabili.

Valutazione della risposta tumorale basata su CE-CT o CE-MRI in base ai criteri RECIST

Risposta nelle lesioni target:

- *Risposta completa (Complete Response-CR)*: la scomparsa di tutte le lesioni target in assenza di nuove lesioni.
- *Risposta parziale (Partial Response-PR)*: riduzione di almeno il 30% del valore derivante dalla somma dei diametri maggiori delle lesioni target, rispetto al valore della somma di partenza.
- *Malattia stabile (Stable Disease-SD)*: le lesioni target non hanno nè sufficiente riduzione per classificare la risposta come parziale, nè sufficiente aumento per definire la malattia in progressione, prendendo come riferimento il valore minore della somma dei diametri maggiori dall'inizio del trattamento.
- *Malattia in progressione (Progressive Disease-PD)*: un aumento almeno del 20% del valore della somma dei diametri maggiori delle lesioni target, rispetto al valore minore della somma dei diametri maggiori registrato dall'inizio del trattamento o la comparsa di una o più nuove lesioni.

Risposta nelle lesioni non-target:

- *Risposta completa*: la scomparsa di tutte le lesioni non-target.
- *Risposta incompleta (IR)/Malattia stabile (SD)*: la persistenza di una o più lesioni non-target.
- *Malattia in progressione (PD)*: la comparsa di una o più nuove lesioni e/o la inequivocabile progressione delle lesioni non-target esistenti.

E' così possibile definire la migliore risposta complessiva secondo i criteri RECIST (vedi tabella 1).

Criteria for Assignment of Best Overall Response

Target Lesions	Non-Target Lesions	New Lesions	Overall Response
CR	CR	No	CR
CR	IR/SD	No	PR
PR	Non-PD	No	PR
SD	Non-PD	No	SD
PD	Any	Yes or No	PD
Any	PD	Yes or No	PD
Any	Any	Yes	PD

Tabella 1: Abbreviazioni: CR= Complete Response; PR= Partial Response; IR= Incomplete Response; PD= Progressive Disease.

Le risposte tumorali sono raggruppate come indicato di seguito: non-responders/PD; responders/CR+PR+SD.

Risposta tumorale basata su CE-CT o CE-MRI in base ai criteri RECIST modificati

La risposta nelle lesioni target e non-target è stata anche valutata secondo i criteri RECIST modificati proposti dall' AASLD. Tali criteri considerano cambiamenti nella somma dei diametri del tumore vitale (valutato come contrast enhancement nella fase arteriosa) nelle lesioni target come definito dalle tecniche di imaging CE-CT o MRI¹⁰.

Risposta nelle lesioni target:

- *Risposta completa:* la scomparsa di qualsiasi enhancement arterioso intratumorale in tutte le lesioni target;
- *Risposta parziale:* una riduzione di almeno il 30% del valore della somma dei diametri di tumore vitale nelle lesioni target (contrast enhancement nella fase arteriosa), prendendo come riferimento la somma iniziale dei diametri delle lesioni target;
- *Malattia in progressione:* un aumento di almeno il 20% del valore della somma dei diametri di tumore vitale (enhancing) nelle lesioni target, prendendo come riferimento il valore inferiore della somma dei diametri di tumore vitale (enhancing) nelle lesioni target registrato dall'inizio del trattamento;
- *Malattia stabile:* qualsiasi caso non qualificabile o come risposta parziale o come malattia in progressione.

Secondo questi criteri, la malattia si definisce in progressione anche se compaiono una o più nuove lesioni, come per i criteri RECIST. Un nuovo nodulo epatico è classificato come epatocarcinoma, e quindi indicato come evidenza di progressione, quando il suo diametro maggiore è di almeno 10 mm e il nodulo mostra il pattern vascolare tipico dell'epatocarcinoma nell'imaging dinamico (ipervascolarizzazione nella fase arteriosa con washout nelle fasi portale venosa o tardiva venosa). Lesioni maggiori di 10 mm che non mostrano un pattern vascolare tipico possono venire diagnosticate come epatocarcinomi se vi è evidenza nell'imaging successivo di un intervallo di crescita di almeno 1 cm. Per un determinato riscontro radiologico, si può parlare, retrospettivamente, di progressione già dal momento in cui è stato rilevato per la prima volta, anche se i criteri rigorosi vengono soddisfatti solo in successivi test radiologici. Infine,

per le lesioni atipiche, non enhancing, sono stati applicati i criteri RECIST convenzionali.

Risposta tumorale basata sull'ecografia con mezzo di contrasto SonoVue®

I cambiamenti della vascolarizzazione della lesione epatica target, durante il trattamento, sono stati valutati mediante quantificazione dell'ecografia con contrasto con software dedicato sviluppato da Bracco Research (SONOTUMOR), che tuttavia non è ancora validato per questo scopo.

Una volta somministrato il mezzo di contrasto ecografico per via endovenosa in bolo, il compartimento vascolare può essere visualizzato dopo pochi secondi usando la modalità imaging specifica per il contrasto. L'intensità media all'interno di una regione di interesse (region of interest-ROI) può essere visualizzata come una funzione del tempo, sotto forma di una curva tempo-intensità (time-intensity curve-TIC), che descrive il wash-in e il wash-out del mezzo di contrasto nella ROI. E' poi possibile estrarre dalla TIC parametri emodinamici.

La tabella 2 riporta i parametri della TIC.

PARAMETRI	
PE	Peak Enhancement, valore massimo dell'intensità, in unità arbitrarie
WiAUC	Area Under the Curve (Wash-in), area sotto la curva TIC (Wash-in)
RT	Rise Time
TTP	Time To Peak, tempo dall'intensità zero all'intensità massima, in secondi
WiR	Wash-in Rate
WiPI	Wash-in Perfusion Index (WiAUC / RT)

Tabella 2. Parametri quantitativi ottenuti dall'analisi DELLA CE-US con SONOTUMOR.

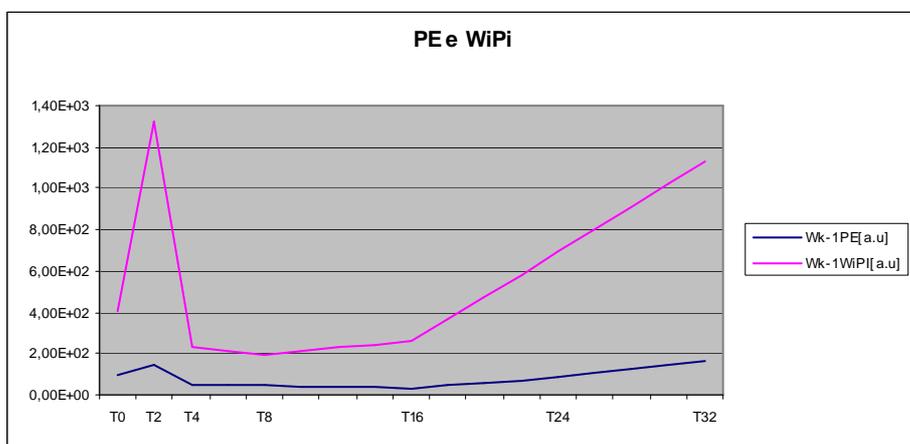
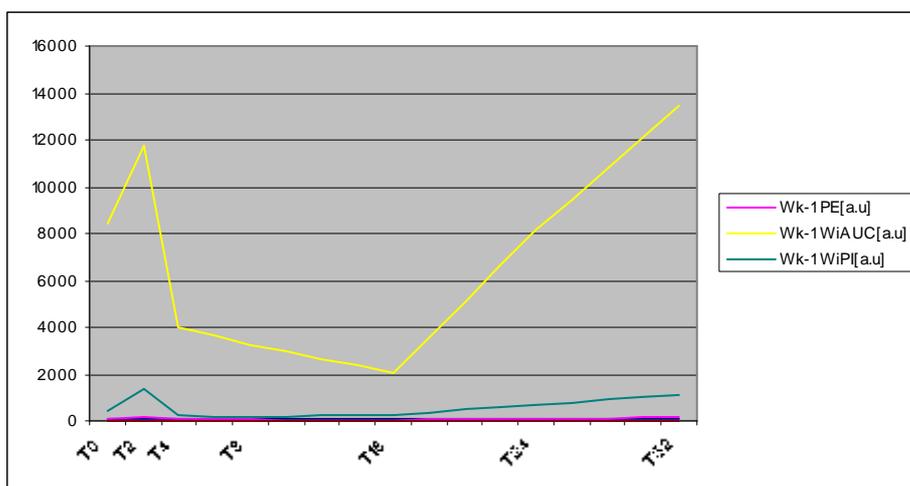
Alcuni parametri sono correlati con il volume ematico (PE, AUC) e alcuni sono correlati con il flusso ematico (TTP).

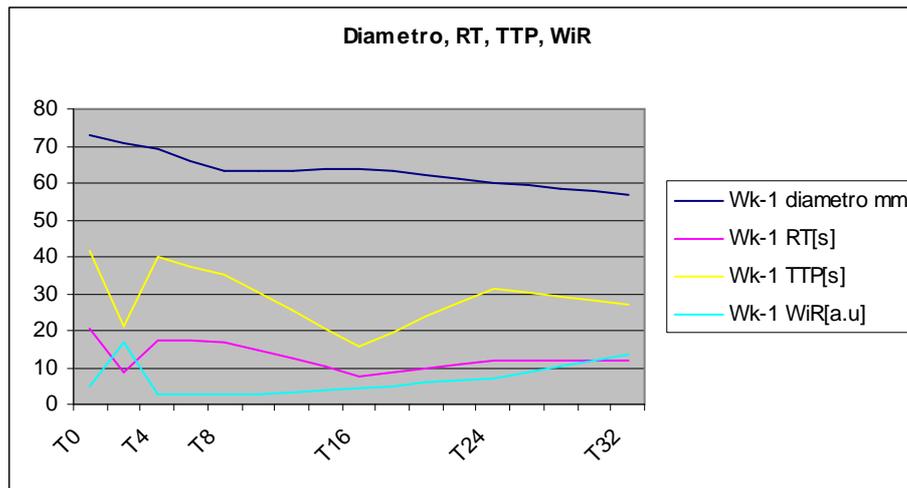
La risposta tumorale, basata su ciascun parametro quantitativo, è stata valutata comparando i valori ottenuti durante il trattamento, ad ogni visita, verso il pretrattamento.

2.3 Risultati

- SOGGETTO N.1

Il primo soggetto arruolato nello studio aveva 72 anni ed era affetto da epatocarcinoma insorto su cirrosi secondaria ad infezione da virus dell'epatite C (HCV) con sospetta metastasi polmonare. In anamnesi presentava inoltre arteriopatia obliterante degli arti inferiori e neoplasia della vescica trattata. Ha iniziato sorafenib al dosaggio di 800 mg/die, senza modificazioni nel corso dello studio.





Il diametro della lesione epatica target, misurato mediante ecografia di base, ha presentato una progressiva riduzione nel corso del trattamento.

La risposta complessiva, valutata mediante i criteri RECIST e RECIST modificati, alle settimane 8,16,24,32 è risultata sempre indicativa di malattia stabile.

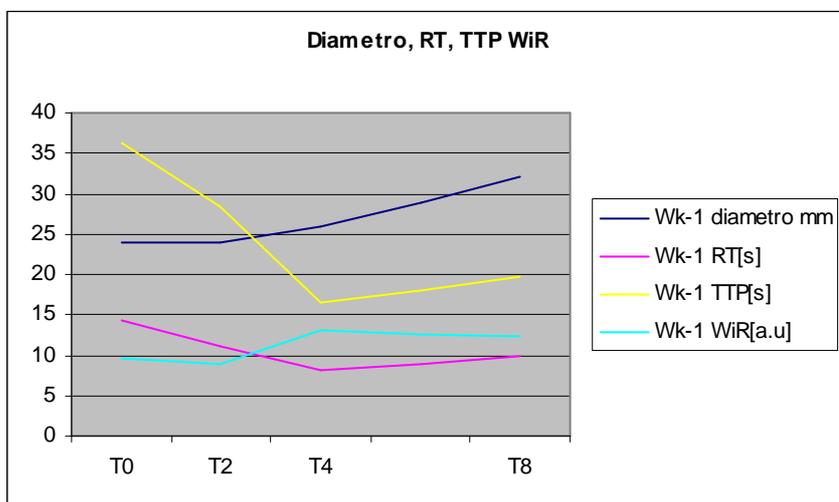
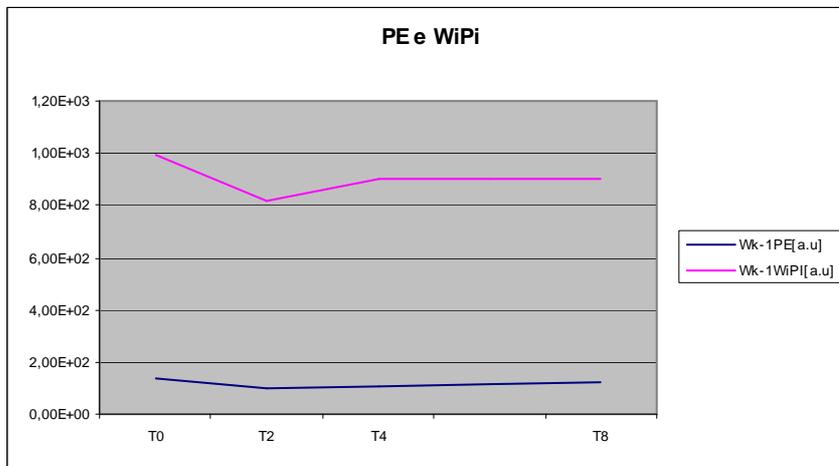
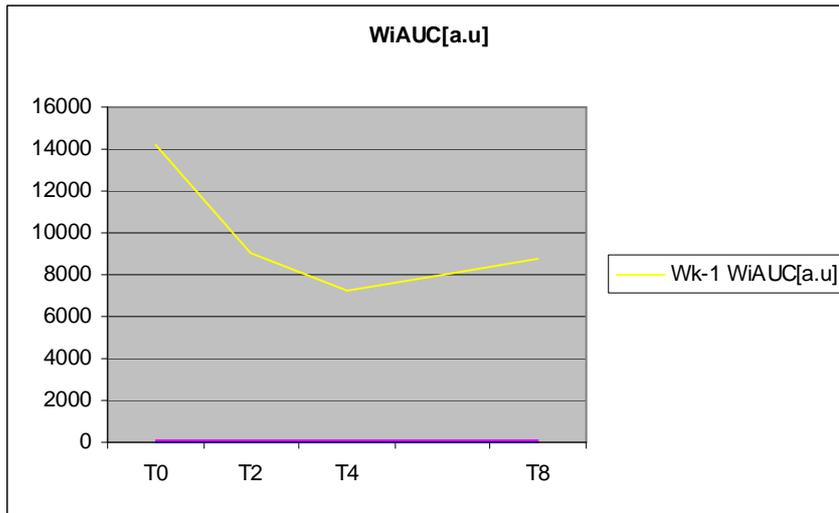
Tuttavia il paziente ha presentato un significativo calo ponderale da T16 (settimana 16) a T32 (settimana 32) (che potrebbe trovare giustificazione in una cachessia neoplastica, ma anche in problematiche di alimentazione per la presenza di megaesofago scompensato da acalasia) per cui è stato rivalutato e sottoposto a trattamenti terapeutici alternativi.

I parametri quantitativi, derivanti dall'analisi dell'ecografia con contrasto mediante software SONOTUMOR, hanno mostrato i seguenti andamenti:

- WiAUC e PE hanno presentato un incremento da T0 (pre-trattamento) a T2 (settimana 2), una marcata riduzione da T2 a T4 (settimana 4), un' ulteriore riduzione da T4 a T16 (settimana 16), un progressivo aumento da T16 a T32 (settimana 32);
- WiPI e WiR hanno presentato un incremento da T0 a T2, una marcata riduzione da T2 a T4, un' ulteriore riduzione da T4 a T8 e un progressivo aumento da T8 a T32;
- RT e TTP hanno presentato una riduzione da T0 a T2, un incremento da T2 a T4, una riduzione progressiva da da T4 a T16, un incremento da T16 a T24 e una riduzione da T24 a T32.

- SOGGETTO N.2

Il secondo soggetto arruolato nello studio aveva 61 anni ed era affetto da epatocolangiocarcinoma (diagnosi istologica) insorto su cirrosi ad eziologia etilica con metastasi polmonari. In anamnesi presentava inoltre ipertensione arteriosa. Ha iniziato sorafenib al dosaggio di 800 mg/die, senza modificazioni nel corso dello studio.



Il diametro della lesione epatica target, misurato mediante ecografia di base, ha presentato un progressivo incremento da T2 a T8, più marcato da T4 a T8 .

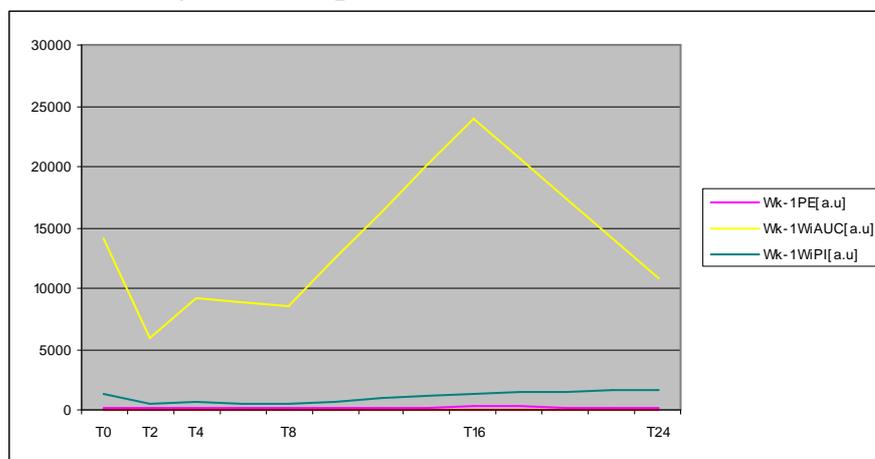
La risposta complessiva, valutata mediante i criteri RECIST e RECIST modificati, alla settimana 8 è risultata indicativa di progressione di malattia. Il paziente presentava ancora ottime condizioni di cenestesi.

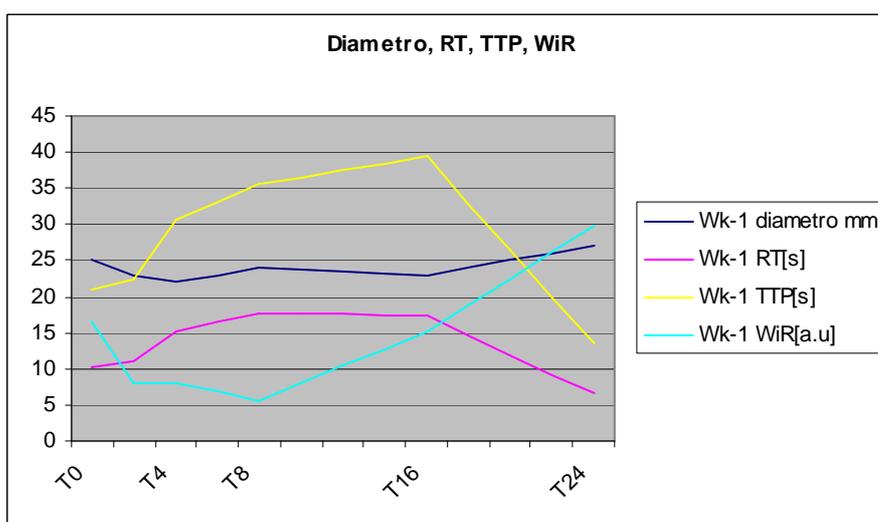
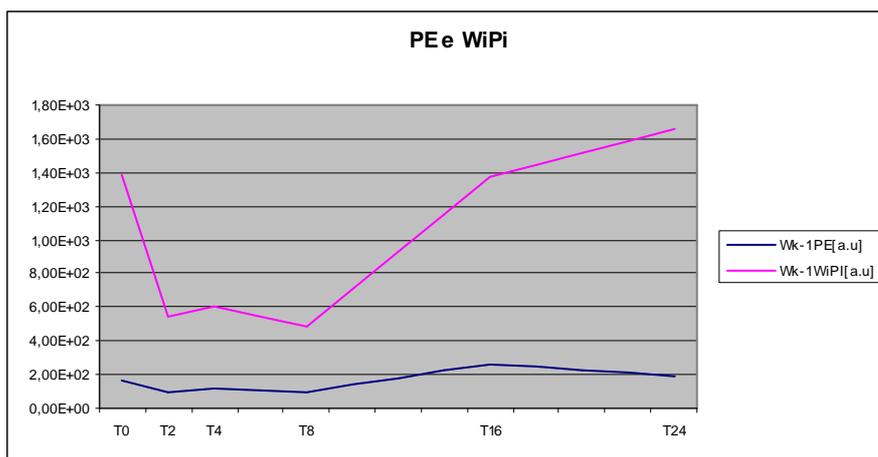
I parametri quantitativi, derivanti dall'analisi dell'ecografia con contrasto mediante software SONOTUMOR, hanno mostrato i seguenti andamenti:

- WiAUC ha presentato una marcata riduzione da T0 a T2, una riduzione da T2 a T4 e un incremento da T4 a T8, rimanendo tuttavia a valori inferiori rispetto al T0;
- WiPI ha presentato una riduzione da T0 a T2, un lieve incremento da T2 a T4 per poi rimanere sostanzialmente stabile fino a T8, un simile andamento è stato presentato anche da WiR;
- PE ha presentato un andamento sostanzialmente stabile con una lieve riduzione da T0 a T2;
- RT e TTP hanno presentato una riduzione da T0 a T4 e un incremento da T4 a T8.

- **SOGGETTO N.3**

Il terzo soggetto arruolato nello studio aveva 69 anni ed era affetto da epatocarcinoma insorto su cirrosi ad eziologia criptogenetica con metastasi surrenale sinistra. In anamnesi presentava inoltre litiasi renale con rene destro escluso. Ha iniziato sorafenib al dosaggio di 800 mg/die, con modificazioni nel corso dello studio per la comparsa di effetti collaterali: dolore epigastrico con aumento degli enzimi pancreatici; anoressia ed astenia.





Il diametro della lesione epatica target, misurato mediante ecografia di base, ha presentato un andamento sostanzialmente stabile fino a T16, con incremento da T16 a T24.

La risposta complessiva, valutata mediante i criteri RECIST e RECIST modificati, alla settimana 8,16,24,32 è risultata indicativa di malattia stabile. Stazionarie sono risultate essere anche le condizioni generali del paziente.

I parametri quantitativi, derivanti dall'analisi dell'ecografia con contrasto mediante software SONOTUMOR, hanno mostrato i seguenti andamenti:

- WiAUC ha presentato una marcata riduzione da T0 a T2 (sorafenib 800 mg/die e poi per pochi giorni 600 mg/die), un incremento da T2 a T4 (sorafenib 600 mg/die), una diminuzione da T4 a T8 (sorafenib 800 mg/die), un incremento da T8 a T16 (sorafenib 600 mg/die) ed una riduzione da T16 a T24 (sorafenib 600 mg/die);
- WiPI e WiR hanno presentato una marcata riduzione da T0 a T2 (sorafenib 800 mg/die e poi per pochi giorni 600 mg/die), un incremento da T2 a T4

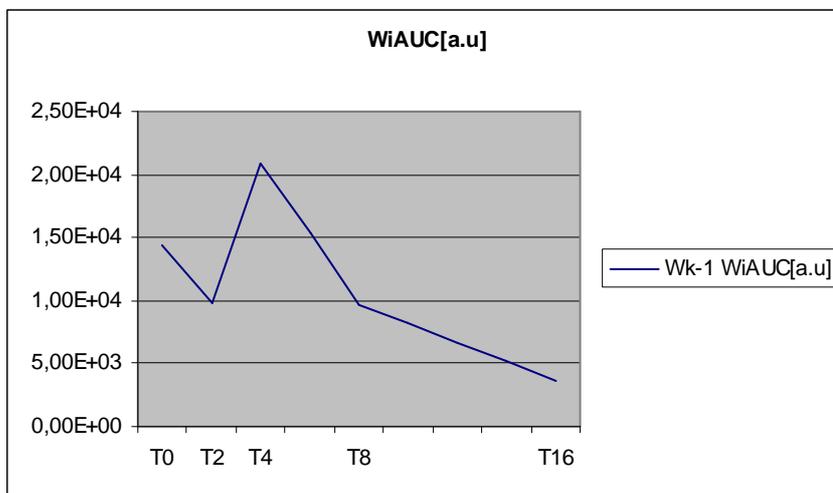
(sorafenib 600 mg/die), una diminuzione da T4 a T8 (sorafenib 800 mg/die), un incremento da T8 a T24 (sorafenib 600 mg/die);

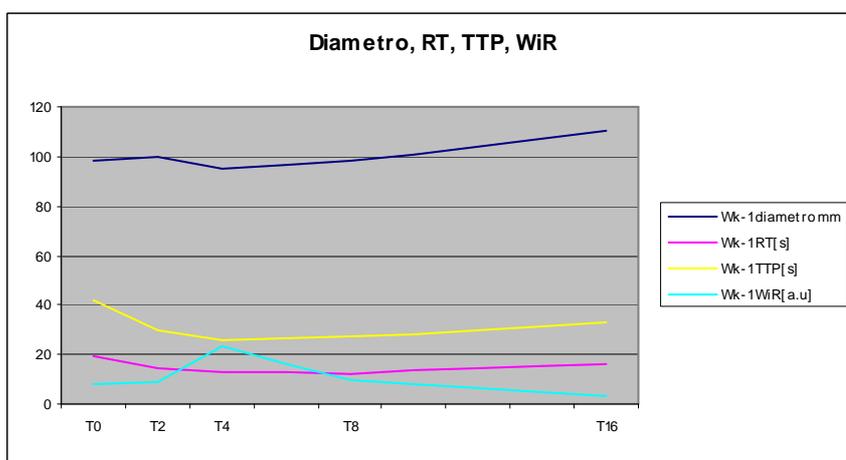
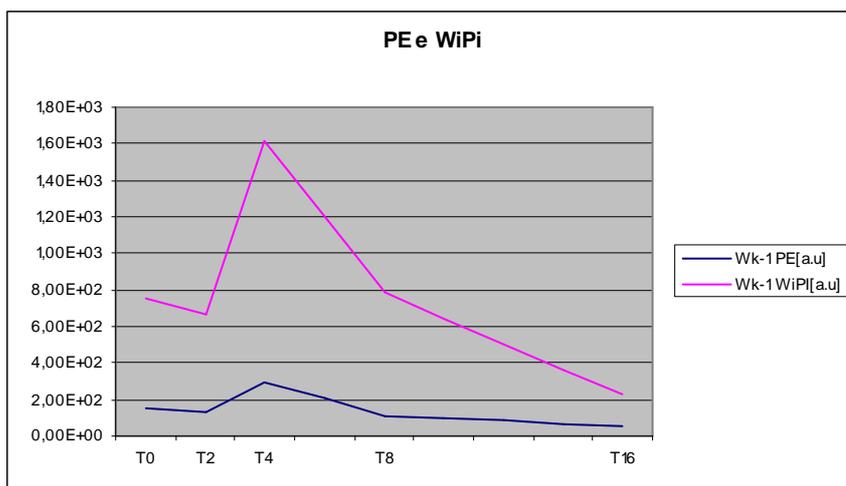
- PE ha presentato un andamento sostanzialmente stabile se si eccettua una riduzione da T0 a T2 e un incremento da T8 a T16 con successivo calo portandosi a valori simili al T0;

- RT e TTP hanno presentato un progressivo aumento da T0 a T16 con riduzione da T16 a T24.

- **SOGGETTO N.4**

Il quarto soggetto arruolato nello studio aveva 58 anni ed era affetto da epatocarcinoma insorto su cirrosi ad eziologia dismetabolica ed etilica. In anamnesi presentava inoltre diabete mellito di tipo 2, ipertensione arteriosa, cardiopatia ischemica cronica, trattata con angioplastica coronarica percutanea ed impianto di stent sul ramo interventricolare anteriore (procedura complicata da ictus cerebri). Ha iniziato sorafenib al dosaggio di 400 mg/die alla luce delle comorbidità, con modificazioni nel corso dello studio per la comparsa di effetti collaterali, in particolare la sindrome mano-piede.





Il diametro della lesione epatica target, misurato mediante ecografia di base, ha presentato un andamento sostanzialmente stabile fino a T8, con incremento da T8 a T16.

La risposta complessiva, valutata mediante i criteri RECIST e RECIST modificati, alla settimana 8 è risultata indicativa di malattia stabile, mentre alla settimana 16 è risultata indicativa di progressione di malattia (alla CE-CT invariate per numero e dimensioni le numerose lesioni nodulari di HCC, comparsa di trombosi portale del ramo anteriore destro, di sospetta natura neoplastica). Le condizioni cliniche generali del paziente erano tuttavia stazionarie.

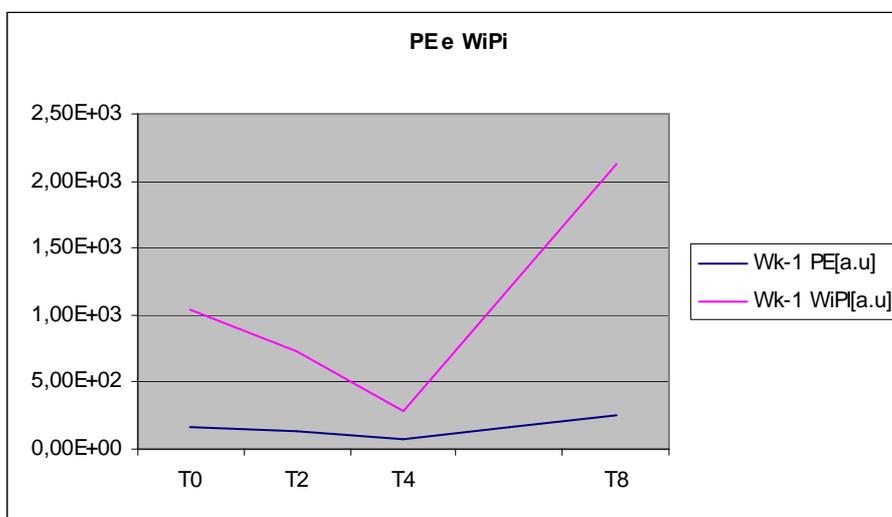
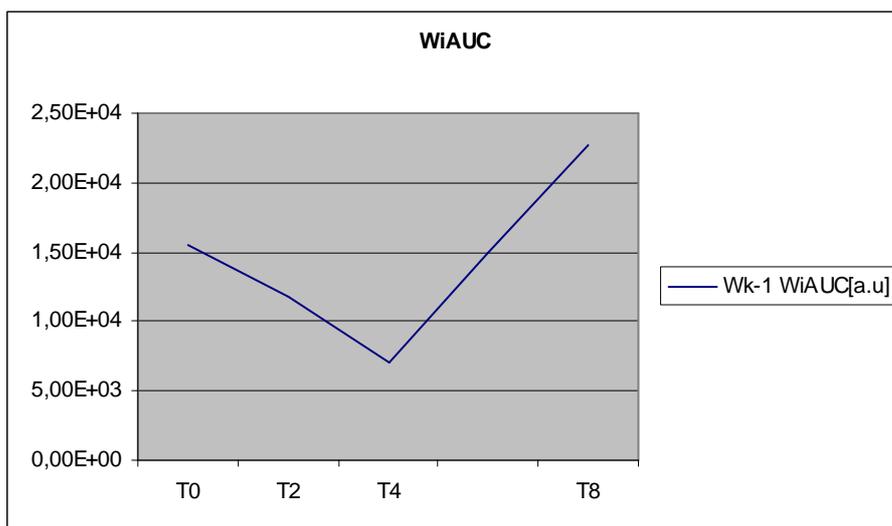
I parametri quantitativi, derivanti dall'analisi dell'ecografia con contrasto mediante software SONOTUMOR, hanno mostrato i seguenti andamenti:

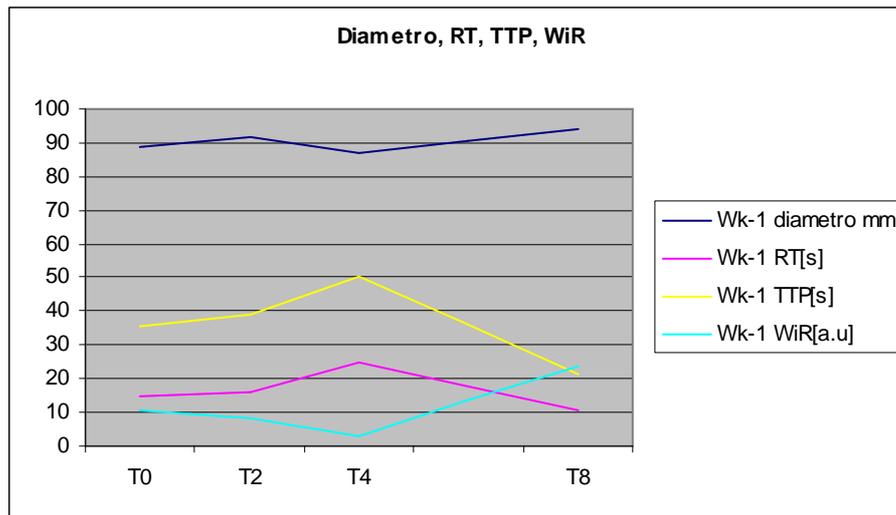
- WiAUC, WiPI e PE hanno presentato una riduzione da T0 a T2 (sorafenib 400 mg/die), un incremento da T2 a T4 (sorafenib 800 mg/die), una riduzione da T4 a T16 (sorafenib 800 e poi 400 mg/die);

- WiR ha presentato valori stabili da T0 a T2 (sorafenib 400 mg/die), un incremento da T2 a T4 (sorafenib 800 mg/die), una riduzione da T4 a T16 (sorafenib 800 e poi 400 mg/die);
- RT e TTP hanno presentato una diminuzione da T0 a T2, valori stabili da T2 a T8 e un incremento da T8 a T16.

- SOGGETTO N.5

Il quinto soggetto arruolato nello studio aveva 73 anni ed era affetto da epatocarcinoma insorto su cirrosi criptogenetica. In anamnesi presentava inoltre diabete mellito di tipo 2 in sola terapia dietetica. Ha iniziato sorafenib al dosaggio di 800 mg/die e lo ha assunto a tale dosaggio fino alla sospensione completa avvenuta al T6 (settimana 6) per l'insorgenza di grave insufficienza epatica con severa encefalopatia porto-sistemica.





Il diametro della lesione epatica target, misurato mediante ecografia di base, ha presentato un andamento sostanzialmente stabile fino a T4, con incremento da T4 a T8.

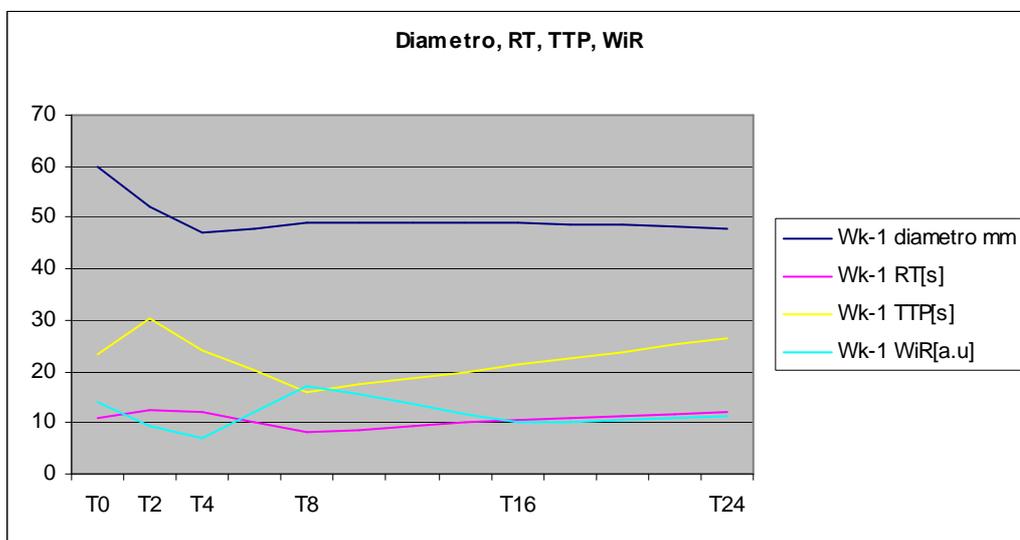
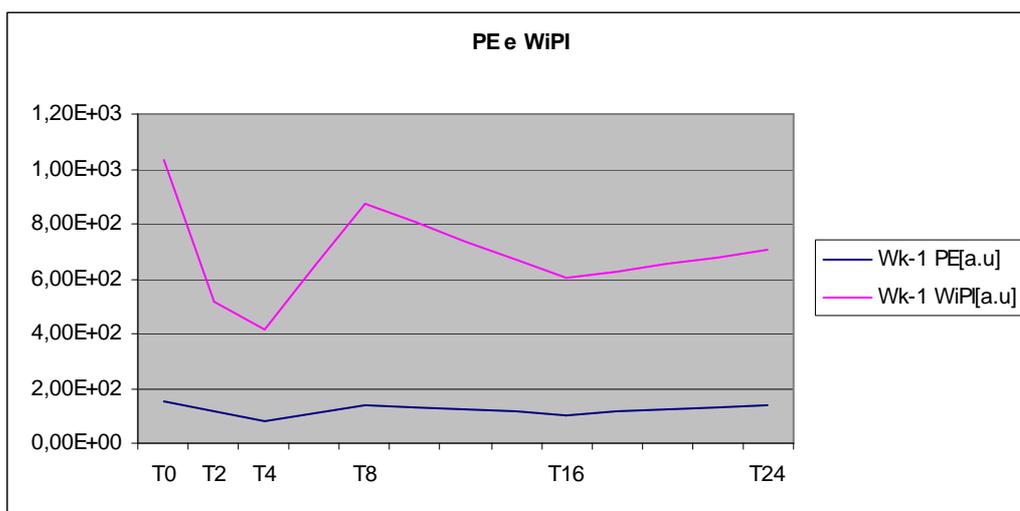
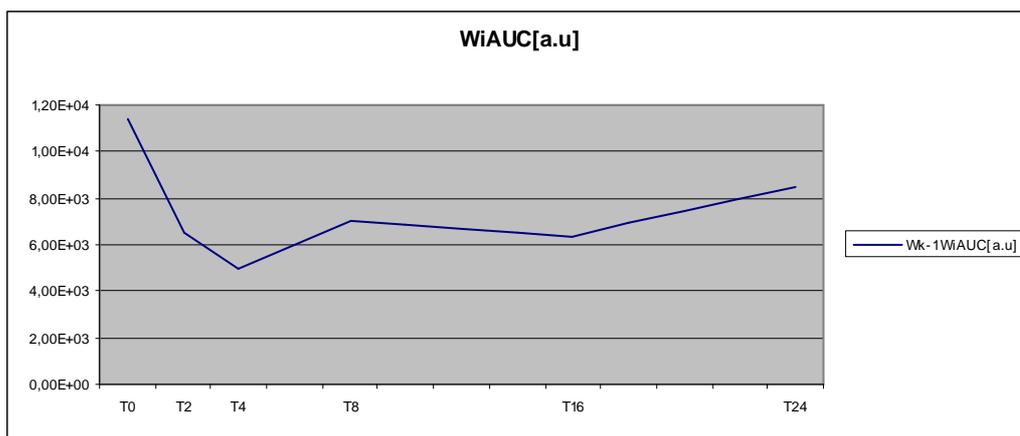
La risposta complessiva, valutata mediante i criteri RECIST e RECIST modificati, alla settimana 8 è risultata indicativa di malattia stabile. Il soggetto è uscito dallo studio per la sospensione di sorafenib.

I parametri quantitativi, derivanti dall'analisi dell'ecografia con contrasto mediante software SONOTUMOR, hanno mostrato i seguenti andamenti:

- WiAUC, WiPI, WiR e PE hanno presentato una marcata e progressiva riduzione da T0 a T4 con successivo incremento da T4 a T8;
- RT e TTP hanno presentato un incremento da da T0 a T4 ed una riduzione da T4 a T8.

- **SOGGETTO N.6**

Il sesto soggetto arruolato nello studio aveva 70 anni ed era affetto da epatocarcinoma insorto su cirrosi HCV-relata. In anamnesi presentava inoltre ipertensione arteriosa e psoriasi. Ha iniziato sorafenib al dosaggio di 800 mg/die con successive multiple modificazioni per l'insorgenza di effetti collaterali, in particolare diarrea e marcata astenia.



Il diametro della lesione epatica target, misurato mediante ecografia di base, ha presentato una riduzione significativa da T0 a T4, da T4 a T24 i valori si sono mantenuti sostanzialmente stabili.

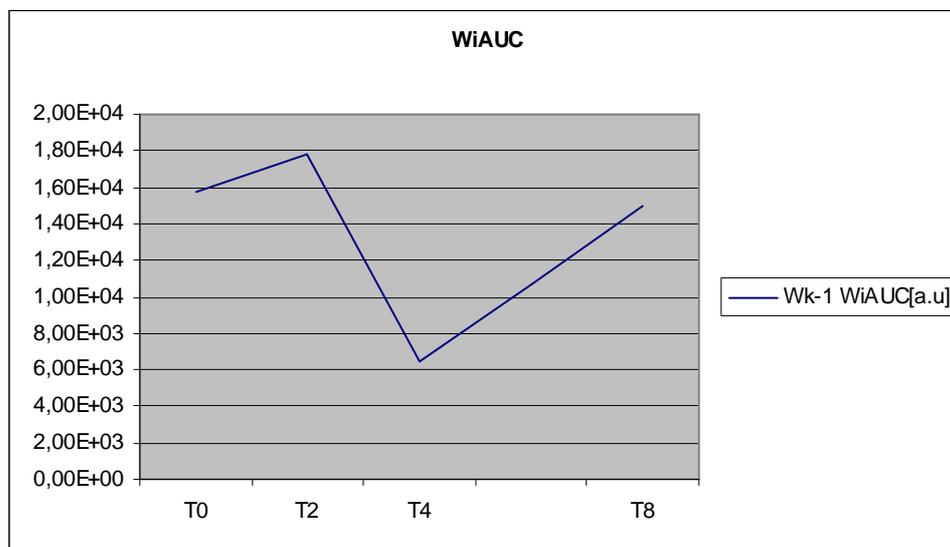
La risposta complessiva, valutata mediante i criteri RECIST e RECIST modificati, alla settimana 8,16,24 è risultata indicativa di malattia stabile. Discrete e stabili le condizioni di cenestesi del paziente.

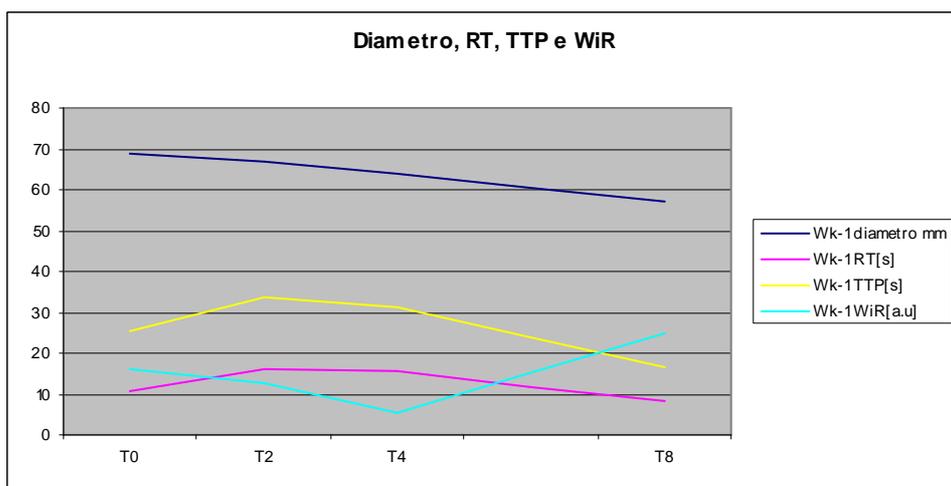
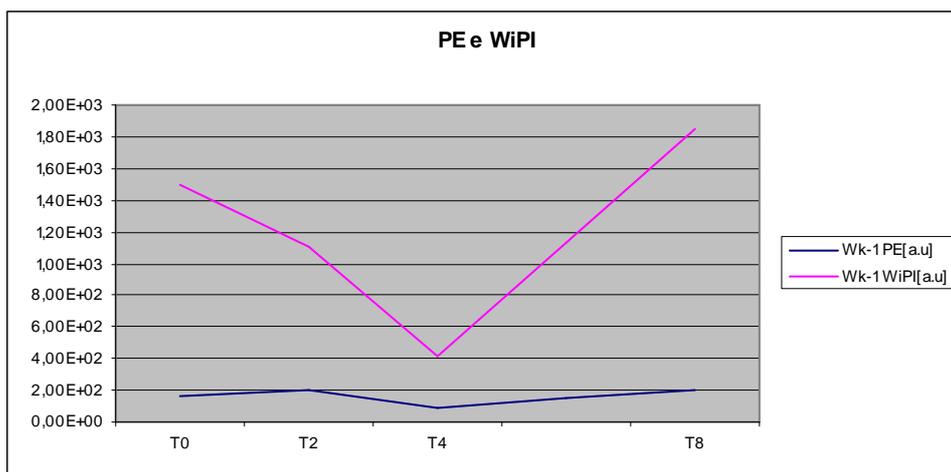
I parametri quantitativi, derivanti dall'analisi dell'ecografia con contrasto mediante software SONOTUMOR, hanno mostrato i seguenti andamenti:

- WiAUC, WiPI, WiR e PE hanno presentato una riduzione da T0 a T4 (più marcata da T0 a T2 e con modificazioni nel dosaggio di sorafenib da 800 a 400 a 600 mg/die), un incremento da T4 a T8 (sorafenib 400 mg/die), una riduzione da T8 a T16 (sorafenib 400 mg/die) ed un incremento da T16 a T24 (sorafenib 400 e poi 200 mg/die) mantenendosi a valori inferiori al T0;
- RT e TTP hanno presentato un incremento da da T0 a T2, una riduzione da T2 a T8 ed un incremento da T8 a T24.

- **SOGGETTO N.7**

Il settimo soggetto arruolato nello studio aveva 66 anni ed era affetto da epatocarcinoma insorto su cirrosi multifattoriale (dismetabolica ed etilica). In anamnesi presentava inoltre ipertensione arteriosa e diabete mellito di tipo 2. Ha iniziato sorafenib al dosaggio di 800 mg/die senza modificazioni nel corso dello studio.





Il diametro della lesione epatica target, misurato mediante ecografia di base, ha presentato una progressiva riduzione da T0 a T8 più significativa da T4 a T8.

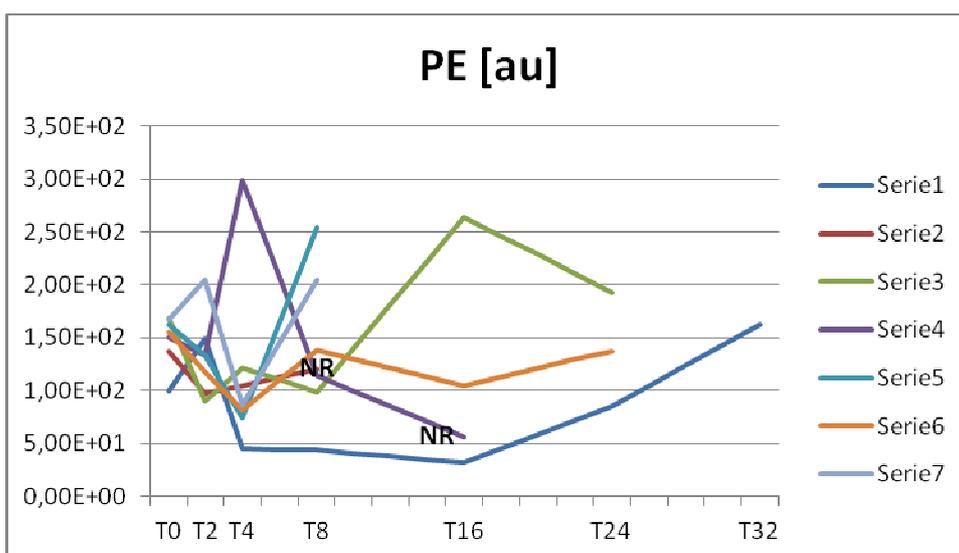
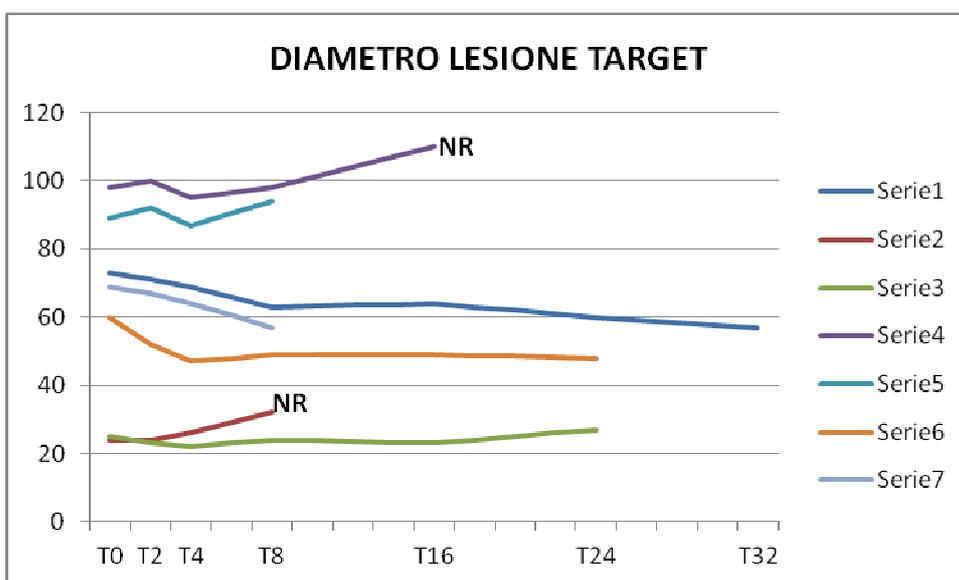
La risposta complessiva, valutata mediante i criteri RECIST e RECIST modificati, alla settimana 8 è risultata indicativa di malattia stabile (alla CE-CT veniva segnalata una riduzione della vascolarizzazione delle multiple lesioni nodulari).

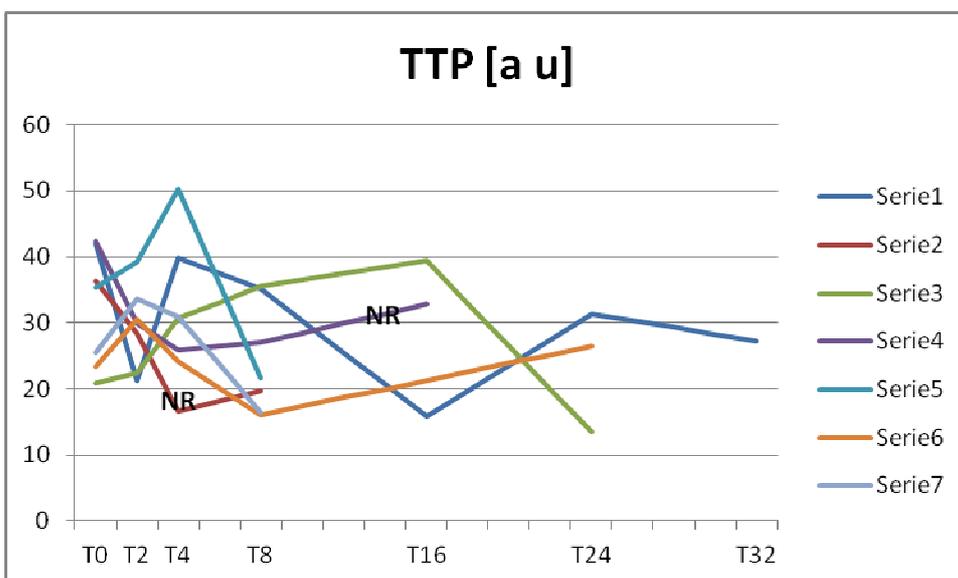
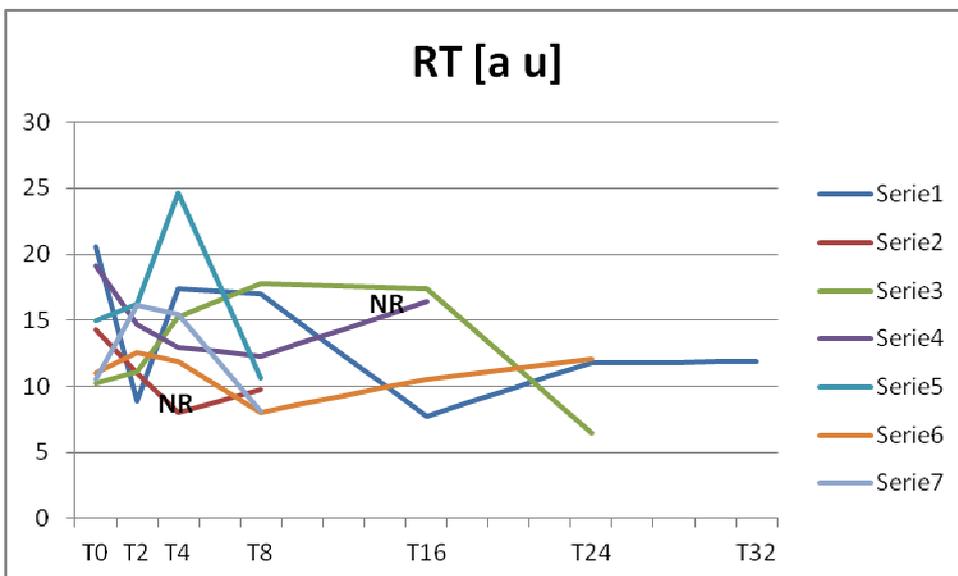
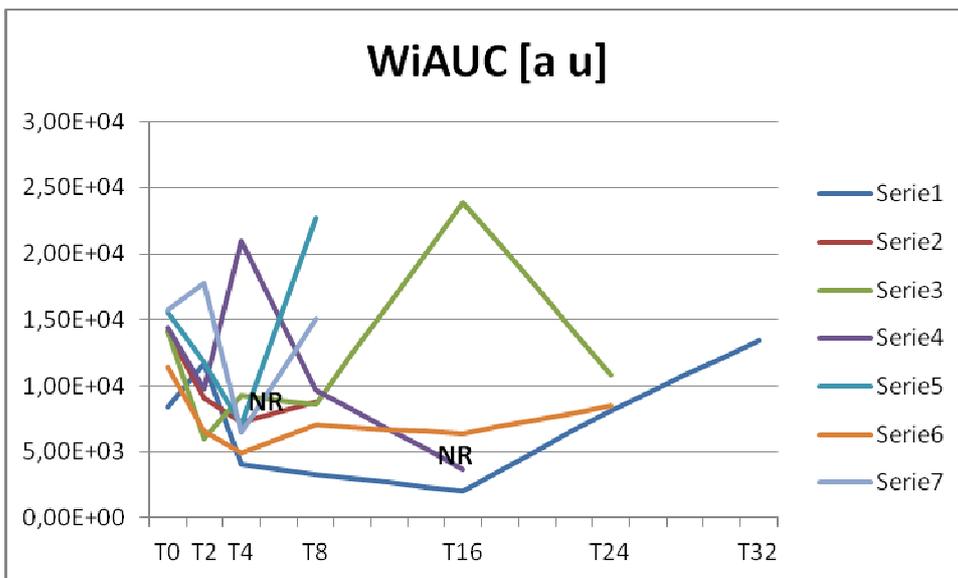
I parametri quantitativi, derivanti dall'analisi dell'ecografia con contrasto mediante software SONOTUMOR, hanno mostrato i seguenti andamenti:

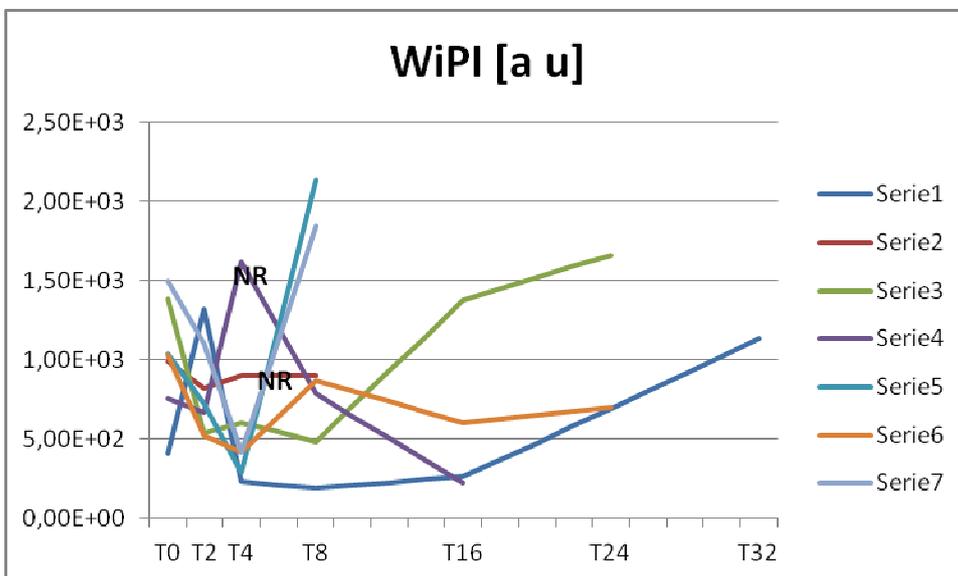
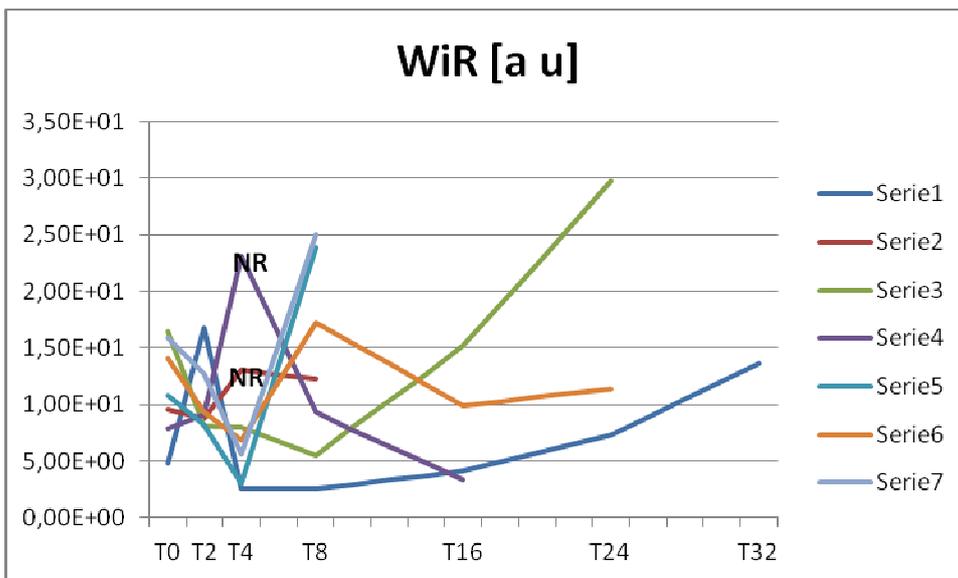
- WiAUC e PE hanno presentato un incremento da T0 a T2, una marcata riduzione da T2 a T4 e un incremento da T4 a T8, rimanendo tuttavia attorno a valori inferiori rispetto ai basali;
- WiPI e WiR hanno presentato una riduzione da T0 a T4 ed un incremento da T4 a T8;
- RT e TTP hanno presentato un incremento da T0 a T2 e una riduzione da T2 a T8.

Dall'analisi per gruppo risulta che i non-responders sono stati pochi: in particolare a 2 mesi solo un soggetto era chiaramente non-responder (si trattava però di un paziente affetto da epatocolangiocarcinoma), successivamente un altro soggetto è diventato non-responder a 4 mesi (comparsa di verosimile trombosi portale neoplastica).

Di seguito vengono riportati i grafici che mostrano gli andamenti del diametro della lesione epatica target e di ciascun parametro quantitativo, singolarmente, nei soggetti studiati.







In tutti i soggetti esaminati, dopo l'inizio dell'assunzione di sorafenib, si è verificata un'iniziale e marcata riduzione dei valori dei parametri della TIC WiAUC, PE, WiPI e WiR, sia al dosaggio raccomandato di 800 mg/die, che a un dosaggio inferiore (ad esempio dimezzato, come è avvenuto in un paziente affetto da cardiopatia ischemica cronica). In generale tale riduzione si è verificata dal tempo T0 (pretrattamento) al tempo T2 (settimana 2, in trattamento) e fino a T4 (settimana 4, in trattamento), con tuttavia una diminuzione più lenta da T2 a T4. In 2 soggetti da T2 a T4 si è assistito ad un transitorio aumento dei valori dei suddetti parametri, ma avvenuto in concomitanza con la riduzione del dosaggio di sorafenib per la comparsa di effetti indesiderati invalidanti o per mancata compliance alla terapia. In 2 pazienti, da T0 a T2 si è assistito ad un iniziale e transitorio incremento dei

valori di tali parametri, con successiva marcata riduzione dei medesimi da T2 a T4. Da segnalare che di questi 2 pazienti 1 era in sovrappeso corporeo e l'altro chiaramente obeso, con probabili conseguenti ripercussioni di tipo farmacocinetico; inoltre bisogna tenere in considerazione che dal T0, quando viene eseguita la prima CE-US, all'inizio dell'assunzione di sorafenib trascorrono alcuni giorni necessari per avere il farmaco dopo la prescrizione, ciò chiaramente riduce il periodo di terapia effettuato da T0 a T2.

La riduzione dei valori dei parametri di perfusione tumorale, in particolare di WiAUC e PE (parametri correlati con il volume ematico), al T2/T4 (settimana 2, 4), è risultata essere correlata con la risposta tumorale a 2 mesi, valutata con i criteri RECIST e RECIST modificati, risultata indicativa di malattia stabile (responders), tranne in un paziente, ma la cui diagnosi istologica era di epatocolangiocarcinoma.

Un altro dato di rilevante importanza è che nel corso del trattamento, in ben 4 dei 7 soggetti studiati, si è resa necessaria una riduzione del dosaggio iniziale di sorafenib (800 mg/die) per la comparsa di effetti collaterali invalidanti per il paziente (principalmente anoressia, astenia, diarrea, sindrome mano-piede). Sembra tuttavia risultare dall'andamento dei parametri di perfusione tumorale che i soggetti che accusavano maggiori effetti collaterali avevano anche un discreto controllo della malattia tumorale con dosaggi del farmaco inferiori a quelli raccomandati. Infatti con l'assunzione di sorafenib a dosaggi ridotti rispetto a quello raccomandato si è visto che si può verificare dapprima un aumento dei valori dei suddetti parametri ma successivamente si può avere una riduzione o almeno una stabilizzazione dei medesimi. Nei soggetti che hanno assunto continuativamente il dosaggio raccomandato di sorafenib (800 mg/die) i valori dei parametri studiati hanno presentato un'iniziale riduzione durata fino ad una determinata visita, variabile da soggetto a soggetto. Successivamente si è assistito ad un aumento dei medesimi senza tuttavia poter definire un criterio prognostico preciso. Ciò anche alla luce della valutazione della risposta secondo i criteri RECIST e RECIST modificati da cui risultava comunque un quadro di malattia stabile.

Infine è da sottolineare come la completa ed improvvisa sospensione di sorafenib sembri portare ad un rapido e marcato aumento dei parametri di perfusione tumorale, ma tale osservazione scaturisce da un unico caso di un

paziente dove si è resa necessaria la sospensione completa del farmaco per insufficienza epatica con severa encefalopatia porto-sistemica.

2.4 Discussione e conclusioni

La visualizzazione della neovascolarizzazione tumorale è un obiettivo importante nel campo di ricerca dell'imaging perché consente di valutare più accuratamente l'efficacia della terapia antiangiogenica. L'ecografia dinamica con contrasto (dynamic contrast enhanced ultrasound- DCE-US) è una metodica quantitativa con il vantaggio di essere non-invasiva, ampiamente disponibile, portatile, conveniente, altamente sensibile e riproducibile e che fa uso di mezzo di contrasto intravascolare. DCE-US è stata impiegata con successo per quantificare l'angiogenesi nei pazienti oncologici ^{33, 34, 37, 39, 45}.

I risultati di questo studio dimostrano il ruolo che può avere la quantificazione dell'ecografia dinamica con contrasto nella valutazione della vascolarizzazione tumorale nei pazienti con HCC avanzato o non suscettibile di terapie chirurgiche o locoregionali trattati con sorafenib.

Come già precedentemente illustrato nei risultati, in tutti i soggetti esaminati, dopo l'inizio dell'assunzione di sorafenib, si è verificata un'iniziale e marcata riduzione dei valori dei parametri della TIC WiAUC, PE, WiPI e WiR, sia al dosaggio raccomandato di 800 mg/die, che a un dosaggio inferiore. In generale tale riduzione si è verificata dal tempo T0 (pretrattamento) al tempo T2 (settimana 2, in trattamento) e fino a T4 (settimana 4, in trattamento), con tuttavia una diminuzione più lenta da T2 a T4. Ad eccezione di 2 soggetti in cui da T2 a T4 vi è stato un transitorio aumento dei valori dei suddetti parametri, ma avvenuto in concomitanza con la riduzione del dosaggio di sorafenib per la comparsa di effetti indesiderati invalidanti o per mancata compliance alla terapia. Così in 2 soggetti, da T0 a T2 si è assistito ad un iniziale e transitorio incremento dei valori di tali parametri, con successiva marcata riduzione dei medesimi da T2 a T4. Tuttavia, di questi due soggetti, 1 era in sovrappeso corporeo e l'altro chiaramente obeso, con probabili conseguenti ripercussioni sulla farmacocinetica; inoltre bisogna tenere in considerazione che dal T0, quando viene eseguita la prima CEUS, all'inizio dell'assunzione di sorafenib trascorrono alcuni giorni necessari per avere il farmaco dopo la prescrizione, ciò chiaramente riduce il periodo di terapia effettuato da T0 a T2.

La riduzione dei valori dei parametri relativi alla perfusione tumorale, in particolare di WiAUC e PE (parametri correlati con il volume ematico), al T2/T4 (settimana 2, 4), predice la risposta tumorale a 2 mesi, valutata secondo i criteri RECIST e RECIST modificati, risultata indicativa di malattia stabile (responders), tranne in un paziente, ma la cui diagnosi istologica era di epatocolangiocarcinoma.

Pertanto l'ecografia dinamica con contrasto può essere impiegata per quantificare i cambiamenti della vascolarizzazione tumorale già alla settimana 2, 4 dopo la somministrazione di sorafenib nei pazienti con HCC. Questi precoci cambiamenti della perfusione tumorale possono essere predittivi della risposta tumorale a 2 mesi e possono avere un potenziale nella valutazione precoce dell'efficacia della terapia antiangiogenica nell'epatocarcinoma.

Quindi questi dati suggeriscono che i parametri di perfusione tumorale, misurati quantitativamente mediante l'ecografia dinamica con contrasto, possono avere un potenziale nella valutazione precoce di efficacia degli agenti antiangiogenici. In particolare AUC e PE, che peraltro corrispondono al volume di sangue e pertanto sono probabilmente i migliori descrittori della necrosi tissutale.

Questo studio ha dei limiti:

1. l'esiguità del campione esaminato, essendo costituito solamente da 7 soggetti, ma va considerata anche la difficoltà a reperire soggetti con i criteri di inclusione richiesti, cioè affetti da carcinoma epatocellulare avanzato oppure non suscettibile di terapie chirurgiche o locoregionali e con funzione epatica in classe A di Child-Pugh;
2. il mancato completamento, per alcuni soggetti, di tutte le visite previste dallo studio;

per cui questi risultati dovrebbero essere considerati solo come preliminari.

L'ecografia con contrasto assieme ai software di quantificazione permette di quantificare ed estrarre specifici parametri di flusso del sangue, come la velocità di flusso, il volume vascolare relativo e la portata ematica relativa⁴⁶.

La quantificazione della vascolarizzazione tumorale con DCE-US può essere effettuata impiegando due diversi metodi di somministrazione del mezzo di contrasto, cioè:

1. un bolo endovenoso utilizzando l'analisi wash-in/wash-out;
2. un'infusione endovenosa costante di contrasto impiegando un'analisi interruzione-rifornimento.

Per cui sono in corso ulteriori ricerche per identificare misure assolute di flusso e di volume ematico ed è necessario un ulteriore sviluppo della strumentazione, soprattutto nel settore dell'acquisizione e dell'analisi in 3D/4D.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumours. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J National Cancer Inst* 2000; 92 (3): 205-16.
- 2 Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, et al . National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer . *N Engl J Med* 2005; 353: 123-32
- 3 Hudes G, Carducci M , Tomczak P, et al. Global ARCC Trial. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 2271-81 .
- 4 Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-42 .
- 5 Llovet J, Ricci S, Mazzaferro V, et al. SHARP Investigators. Sorafenib improves survival in advanced Hepatocellular Carcinoma (HCC): results of a phase III randomized placebocontrolled trial. *J Clin Oncol* 2008
- 6 Fox E, Curt GA, Balis FM. Clinical Trial Design for Target-Based Therapy. *The Oncologist* 2002;7:401-409
- 7 Blay, JY, Bonvalot S, Casali , Choi H, Debiec-Richter M, Dei Tos A P et al. Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors: Report of the GIST Consensus Conference of 20-21 March 2004, under the auspices of ESMO. *Ann Oncol* 2005; 16:566-78
- 8 Blay JY, Landi B, Bonvalot S, Monges G, Ray-Coquard I, Duffaud Fet al.. Recommendations for the management of GIST patients *Bull Cancer*. 2005; 92:907-18
- 9 Bruix J , Sherman M , Llovet JM , et al . Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. *J Hepatol* 2001; 35: 421-30 .
- 10 Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, et al for the Panel of Experts in HCC-Design Clinical Trials. Design and Endpoints of Clinical Trials in Hepatocellular Carcinoma. 2008; *J Natl Cancer Inst*. May 13
- 11 Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al TARGET Study Group. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356:125-34. Erratum in: *N Engl J Med*. 2007;357:203.
- 12 Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;350:2335-42
- 13 Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R, Johnson DH. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006;355:2542-50
- 14 Traina TA, Rugo HS, Dickler M. Bevacizumab for advanced breast cancer *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007;21:303-19.

- 15 Herbst RS, Prager D, Hermann R, Fehrenbacher L, Johnson BE, Sandler A, et al. TRIBUTE Investigator Group. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-smallcell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Sep 1;23(25):5892-9.
- 16 Hudes G, Carducci M, Tomczak P, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007; 356:2271-81.
- 17 Rock EP, Vicki Goodman V, Jiang J X., et al. Food and Drug Administration Drug Approval Summary: Sunitinib Malate for the Treatment of Gastrointestinal Stromal Tumor and Advanced Renal Cell Oncologist 2007;12;107-113
- 18 Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002; 347:472-80
- 19 Greis C. Technology overview: SonoVue (Bracco, Milan). *Eur Radiol.* 2004;14 Suppl 8:P11-P15.
- 20 Celli N, Gaiani S, Piscaglia F, Zironi G, Camaggi V, Leoni S, Righini R, Bolondi L. Characterization of liver lesions by real-time contrast-enhanced ultrasonography. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Jan;19(1):3-14.
- 21 Leen E, Horgan P. Ultrasound contrast agents for hepatic imaging with nonlinear modes. *Curr Probl Diagn Radiol.* 2003;32(2):66-87.
- 22 Quaiia E, Bertolotto M, Calderan L, Mosconi E, Pozzi R, Mucelli RP. US characterisation of focal hepatic lesions with intermittent high-acoustic-power mode and contrast material. *Acad Radiol.* 2003;10:739-50.
- 23 Leen E, Becker D, Bolondi L, Ricci P, Stacul F, Steinbach R. European Multi-centre study evaluating contrastenhanced US in the characterization of focal liver lesions (FLL). *RSNA.* 2003: 496.
- 24 Albrecht T, Oldenburg A, Hohmann J, Skrok J, Hoffmann C, Schettler S, Wolf K-J. Imaging of liver-metastases with contrast-specific low-MI real-time ultrasound and SonoVue. *Eur Radiol.* 2003;13(suppl. 3):N79-86
- 25 Catala V, Nicolau C, Vilana R, Pages M, Bianchi L, Sanchez M, Bru C. Characterization of focal liver lesions: comparative study of contrast-enhanced ultrasound versus spiral computed tomography. *Eur Radiol.* 2007 Apr;17(4):1066-73.
- 26 Passamonti M, Vercelli A, Azzaretti A, Rodolico G, Calliada F. Characterization of focal liver lesions with a new ultrasound contrast agent using continuous low acoustic power imaging: comparison with contrast enhanced spiral CT. *Radiologia Medica.* 2005;109:358-69.
- 27 Gaiani S, Celli N, Piscaglia F, Cecilioni L, Losinno F, Giangregorio F, et al. Usefulness of contrast-enhanced perfusional sonography in the assessment of hepatocellular carcinoma hypervascular at spiral computed tomography. *J of Hepatol.* 2004;41:421-6.
- 28 Giorgio A, Ferraioli G, Tarantino L, de Stefano G, Scala V, Scarano F, et al. Contrastenhanced sonographic appearance of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: comparison with contrast-enhanced helical CT appearance. *Amer J Roentgenol.* 2004;183:1319-26.

- 29 Lemke A-J, Chopra SS, Hengst SA, Brinkmann MJ, Steinmuller T, Felix R. Charakterisierung von Lebertumoren durch kontrastverstärkte Sonographie und digitale Graustufenbestimmung. [Characterization of hepatic tumors with contrast-enhanced ultrasound and digital grey-scale analysis.] *Rofo*. 2004;176/11:1607-16.
- 30 Li R, Guo Y, Hua X, He Y, Ding J, Guo A, Luo M. Characterization of focal liver lesions: comparison of pulse-inversion harmonic contrast-enhanced sonography with contrast-enhanced CT. *J Clinical Ultrasound*. 2007;35:109-17.
- 31 Lassau N, Lamuraglia M, Leclere J, Rouffiac V. Functional and early evaluation of treatments in oncology: interest of ultrasonographic contrast agents, *J Radiol* 2004; 85: 704-12
- 32 De Giorgi U, Aliberti C, Benea G, et al. M. Effect of angiosonography to monitor response during imatinib treatment in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 1; 11 (17): 6171-6.
- 33 Lassau N, Lamuraglia M, Vanel D et al. Doppler US with perfusion software and contrast medium injection in the early evaluation of isolated limb perfusion of limb sarcomas: prospective study of 49 cases. *Ann Oncol* 2005; 16 (7): 1054-60.
- 34 Lassau N, Lamuraglia M, Chami L, et al. Gastro-intestinal stromal tumours treated with Imatinib: Monitoring response with contrast enhanced ultrasound. *Am J Roentgenol*. 2006;187:1267-73.
- 35 Lassau N, Leclere J, Peronneau P. Enhancing the role of ultrasound with contrast agents follow-up of oncology patients undergoing chemotherapy. Publisher Lencioni, Editor: Springer March 2006, p. 77-88.
- 36 Lassau N, Chami L, Péronneau P. Actualités sur l'échographie en 2006 : place de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore pour l'évaluation précoce des thérapeutiques ciblées *Bull Cancer* 2006 ; 93 (12) : 1207-11
- 37 Lamuraglia M, Escudier. B, Chami. L, et al. To predict progression-free survival and overall survival in metastatic renal cancer treated with sorafenib: interest of dynamic contrast-enhanced Doppler ultrasound. *European Journal of Cancer* 2006; 42(15): 2472-9.
- 38 Bertolotto M, Pozzato G, Croce LS, et al. Blood flow changes in hepatocellular carcinoma after the administration of thalidomide assessed by reperfusion kinetics during microbubble infusion. *Invest Radiol* 2006; 41 (1):15-21.
- 39 Escudier B, Lassau N, Angevin E., et al. Phase I Trial of Sorafenib in combination with IFN A-2a in patients with unresectable and/or metastatic renal cell carcinoma or malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(6): 1801-9.
- 40 Investigator's Brochure, SONOVUE (BR1) Contrast Medium for Ultrasound. Bracco S.p.A. December 20, 2007.
- 41 Cochran ST. Anaphylactoid reactions to radiocontrast media. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005; 5:28-31.

- 42 Shellock FG, Parker JR, Venetianer C, Pirovano G, Spinazzi A. Safety of gadobenate dimeglumine (MultiHance): Summary of findings from clinical studies and postmarketing surveillance. *Invest Radiol*. 2006 Jun; 41(6):500-9.
- 43 Runge VM, Parker JR. Worldwide clinical safety assessment of gadoteridol injection: an update. *Eur Radiol* 1997;7(Suppl 5): S243–S245.
- 44 Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:4293-300.
- 45 Lassau N, Koscielny S, Chami L, et al. Advanced hepatocellular carcinoma: early evaluation of response to bevacizumab therapy at dynamic contrast-enhanced US with quantification –preliminary results. *Radiology* 2011; 258 (1): 291-300.
- 46 Leen E, Averkiou M, Arditi M, et al. Dynamic contrast enhanced ultrasound assessment of the vascular effects of novel therapeutics in early stage trials. *ULTRASOUND*. Published online: 03 February 2012.