

UNIVERSITA' DEGLI STUDI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Dottorato in Ipertensione e Prevenzione del Rischio Cardiovascolare



**VALUTAZIONE DELLA CARDIOTOSSICITA'
IN PAZIENTI CON NEOPLASIE METASTATICHE
IN TERAPIA CON FARMACI ANTIANGIOGENETICI**

Relatore: Prof. Guido GRASSI

Correlatore: Dr. Giuseppe TROCINO

Tesi di Dottorato:

Dr.ssa Maria Bianchi Janetti

Matricola n. 030386

Anno accademico 2012-2013

SOMMARIO

ABSTRACT	4
INTRODUZIONE	6
I. LA CARDIOTOSSICITA'	7
Selezione dei pazienti a rischio di sviluppare cardi tossicità	8
La cardi tossicità da farmaci.....	9
II. ANGIOGENESI.....	10
Farmacologia degli inibitori dell'angiogenesi.....	10
1. VEGF e VEGFR	10
2. APPLICAZIONI TERAPEUTICHE: FARMACI ANTI-VEGF	12
3. APPLICAZIONI CLINCHE DEI FARMACI ANTI-VEGF.....	14
Tossicità degli inibitori dell'angiogenesi.....	19
1. IPERTENSIONE.....	20
2. PROTEINURIA.....	24
3. TROMBOEMBOLISMO.....	25
4. SANGUINAMENTO.....	26
III. IDENTIFICAZIONE DELLA CARDIOTOSSICITA'	26
Biomarkers.....	26
Elettrocardiografia.....	28
Ecocardiografia.....	29
IV. IDENTIFICAZIONE DEL DANNO CARDIOVASCOLARE SUBCLINICO	35
Valutazione danno d'organo cardiaco	35
1. IPERTROFIA CARDIACA.....	35
2. DISFUNZIONE DIASTOLICA	37
3. FUNZIONE ATRIALE.....	41
Valutazione del danno coronarico	45
4. RISERVA DI FLUSSO CORONARICO	45
SCOPI DELLO STUDIO.....	49
I. OBIETTIVO PRIMARIO	49
II. OBIETTIVO SECONDARIO	49
MATERIALI E METODI.....	50
I. POPOLAZIONE.....	50

Reclutamento soggetti	50
Criteri di inclusione	50
Criteri di esclusione	50
II. PROTOCOLLO.....	51
III. PROCEDURE E MISURE.....	52
Consenso informato	52
Visita medica.....	52
Esami bioumorali	53
Elettrocardiogramma (ECG)	55
Ecocardiografia	55
Follow up	61
ANALISI DEI DATI.....	62
RISULTATI	64
IV. CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE.....	64
V. VALUTAZIONE TOSSICITA' FARMACOLOGICA	67
Pressione arteriosa	68
Proteinuria	69
VI. ANALISI DESCRITTIVA	69
Disfunzione del microcircolo.....	69
Effetto ischemico diretto sui cardiomiociti.....	70
Aumento delle pressioni di riempimento	71
1. STUDIO E QUANTIFICAZIONE DEL VENTRICOLO SINISTRO.....	72
2. STUDIO E QUANTIFICAZIONE DELLA DIASTOLE	72
3. STUDIO E QUANTIFICAZIONE DELL' ATRIO SINISTRO	73
VII. ANALISI DI CORRELAZIONE	74
DISCUSSIONE	76
Appropriatezza e fattibilità delle metodiche utilizzate.....	82
Limiti e prospettive future	84
APPENDICI	86
Appendice A.....	86
Appendice B	87
VIII. BIBLIOGRAFIA	88

ABSTRACT:

Background.

La cardiotoxicità è uno degli effetti collaterali delle nuove terapie molecolari anti-tumorali. I nuovi farmaci antiangiogenici, inibitori diretti o indiretti del *Vascular Endothelial Growth Factor*-VEGF (Bevacizumab, Sorafenib e Pazopanib) approvati per l'utilizzo in pazienti (Pz) con neoplasie metastatiche hanno come principale effetto collaterale lo sviluppo di ipertensione (IA) e proteinuria determinato da fenomeni di vasocostrizione, impoverimento vascolare e disfunzione endoteliale.

Obiettivi.

Obiettivo primario del nostro studio è valutare se il meccanismo di danno dei farmaci anti-VEGF a livello vascolare, che normalmente causa ipertensione, possa determinare anche effetti a livello del microcircolo coronarico. Obiettivo secondario è valutare un eventuale effetto citotossico diretto di tali farmaci a livello dei miocardiociti e studiarne le influenze sulla funzione diastolica. Inoltre lo studio si propone di valutare la fattibilità e l'appropriatezza delle metodiche utilizzate.

Materiali e Metodi.

Sono stati arruolati 20 Pz (11 donne, età media 62 ± 10) candidati a chemioterapia (CT) con farmaci anti-VEGF, sottoposti a visita cardiologia con valutazione del rischio cardiovascolare globale (GRS), misurazione della pressione arteriosa (PA) basale, dosaggio di Troponina-T e NT-ProBNP, proteinuria e microalbuminuria, ECG, Ecocardiogramma 2D (valutando i parametri di massa/geometria del ventricolo sinistro-VS), Frazione di eiezione, Funzionalità diastolica e geometria atriale sinistra-AS) e con analisi *speckle tracking* (valutando lo *Strain* globale longitudinale-GLS Ventricolare il picco di *Strain* atriale longitudinale-PALS) e Ecostress Adenosina (valutando la Riserva di Flusso Coronarica-RFC). Tutti gli accertamenti eseguiti sono stati ripetuti a distanza di due, quattro e sei mesi dall'inizio della terapia. L'analisi dei dati è stata eseguita dividendo la popolazione in 10 Pz ipertesi durante CT (Gruppo A) e 10 Pz

normotesi dopo CT (Gruppo B) omogenei per GRS ($1,2\pm 1,3$ vs $1,8\pm 0,9$ p-value: 0,29)

Risultati.

I gruppi sono risultati omogenei per caratteristiche morfostrutturali di VS/AS e funzione sisto-diastolica di VS. Non si sono rilevati segni eco e laboratoristici di effetto citotossico diretto sui cardiomiociti né riduzione significativa della RFC post-CT (p-value 0,37). L'analisi di funzione atriale ha mostrato una differenziale significativa nel PALS pre-post-CT nel Gruppo A ($34,54\pm 6,12$ vs $28,97\pm 5,95$; p-value: 0,042).

Conclusioni.

1. I farmaci chemioterapici anti-VEGF non sembrano dare effetti cardiotossici endotelio mediati a livello del microcircolo coronarico né effetti citotossici diretti sui cardiomiociti
2. Pur in presenza di ipertensione i parametri tradizionali di morfologia e funzione di VS/AS non sono risultati significativamente differenti tra i due gruppi di Pz;
3. Nella popolazione di Pz che hanno sviluppato ipertensione i soli parametri di *strain* atriale appaiono alterati, suggerendo che possano essere utilizzati come indicatore di danno precoce

INTRODUZIONE

I progressi farmacologici nel trattamento chemioterapico dei pazienti tumorali hanno consentito una significativa riduzione della mortalità con un miglioramento della prognosi del paziente oncologico.

L'introduzione nella pratica clinica di nuove molecole, dirette contro un bersaglio molecolare ben preciso all'interno delle cellule tumorali, ha sicuramente migliorato le possibilità terapeutiche per molti tumori. Idealmente, lo scopo delle nuove terapie biologiche sarebbe quello di controllare il tumore andando ad agire esclusivamente sulle cellule maligne e limitando così gli effetti collaterali, tipici invece delle chemioterapie tradizionali. Tuttavia, dopo l'entusiasmo iniziale, con conseguente aumento della sperimentazione di nuovi farmaci molecolari, sono emersi, da molteplici trials clinici, degli effetti collaterali non previsti.

In particolare la cardiotossicità rappresenta uno dei fattori che più limita l'utilizzo sia dei farmaci tradizionali, che dei nuovi agenti biologici. L'instaurarsi di complicanze cardiovascolari ha, infatti, importanti ricadute sia in termini di morbilità e che di mortalità, con un forte impatto sulla qualità di vita e sulla sopravvivenza del paziente, indipendentemente dal problema oncologico. Pertanto, le nuove Linee Guida internazionali hanno inserito il precedente trattamento chemioterapico nel novero dei fattori di rischio cardiovascolari e, da più parti, si dichiara la necessità di una stretta cooperazione tra le due discipline, oncologia e cardiologia, per lo sviluppo di una nuova cosiddetta cardio-oncologia o onco-cardiologia. Una stretta interazione tra le due specialità è, infatti, sempre più richiesta per la cura ottimale dei pazienti affetti da tumore¹. In aggiunta alla potenziale cardiotossicità di molti agenti antitumorali, a causa dell'invecchiamento progressivo della popolazione nei paesi più sviluppati e della presenza di fattori di rischio comuni, la probabilità che un paziente possa avere sia un problema cardiovascolare sia un tumore è in aumento. E' quindi sempre più importante una valutazione del rischio cardiovascolare del paziente quando questo incomincia un trattamento antitumorale e appare necessario comprendere nelle linee guida il monitoraggio degli effetti collaterali sul sistema cardiovascolare, favorendo una conoscenza più approfondita dei meccanismi

d'azione dei singoli agenti a livello cardiaco e dei possibili trattamenti protettivi per i pazienti a maggior rischio di complicanze².

I. LA CARDIOTOSSICITA'

Il *National Cancer Institute* definisce la cardiotoxicità come "tossicità che colpisce il cuore", definizione aspecifica, che evidenzia come a tutt'oggi non si siano compresi appieno i meccanismi e le correlazioni tra terapia antitumorale e sistema cardiovascolare.

La cardiotoxicità può avere sia manifestazioni cliniche (dispnea, *fatigue*, versamento pleurico/pericardico, aritmie sintomatiche, sindrome coronarica acuta, insufficienza cardiaca) sia manifestazioni subcliniche, come alterazioni elettrocardiografiche ed ecografiche³.

Inoltre può svilupparsi in modo acuto, subacuto o cronico, dove per cronico s'intende sia un primo sottotipo, cronico precoce, entro un anno dal termine della terapia; sia un secondo sottogruppo, cronico tardivo, dopo il primo anno dal termine della terapia. La cardiotoxicità può essere permanente o transitoria e può essere causata da differenti meccanismi.

Una delle più accurate definizioni cliniche della cardiotoxicità è stata formulata dal comitato di supervisione dei trials clinici del trastuzumab, che ha definito cardiotoxicità farmaco relata una o più delle seguenti condizioni:

1. Cardiomiopatia con riduzione della Frazione di Eiezione (FE) globale e coinvolgimento più severo del setto
2. Sintomi di insufficienza cardiaca
3. Segni di insufficienza cardiaca (S3 galoppo e/o tachicardia).
4. Riduzione della FE dal valore basale a meno del 5% fino al 55%, con sintomi e segni di insufficienza cardiaca; o a meno del 10% fino al 55%, senza sintomi e segni associati⁴.

Questa definizione non include però un danno vascolare subclinico, che invece può essere frequentemente causato da agenti antineoplastici.

Infatti, se farmaci chemioterapici classici come le antracicline esercitano un danno diretto sui cardiomiociti con tossicità dose-dipendente e irreversibile, altri farmaci, tipicamente quelli di nuove generazione, esercitano il loro danno in maniera indiretta, correlata allo sviluppo di danno microvascolare o ipertensione arteriosa sistemica.

Selezione dei pazienti a rischio di sviluppare cardiotoxicità

Solo un sottogruppo di tutti i pazienti trattati con chemioterapie, terapie molecolari, o sottoposti a terapie adiuvanti, svilupperà delle complicanze cardiovascolari. Quindi, un'accurata anamnesi personale e familiare potrà aiutare a identificare i pazienti a maggior rischio.

La maggior suscettibilità allo sviluppo di cardiotoxicità di qualunque tipo e grado di severità con una terapia antitumorale è una caratteristica multifattoriale, determinata da una complessa interazione tra fattori genetici e ambientali.

La componente genetica è di tipo poligenico e anche l'effetto modificatore di fattori epigenetici contribuisce a determinare la suscettibilità genetica alla cardiotoxicità.

Le influenze genetiche sono state analizzate in diversi lavori in pazienti trattati con antracicline^{5,6}.

In particolare è stato definito che:

- una familiarità per coronaropatia e infarto è associata a un rischio maggiore di cardiotoxicità nella popolazione trattata⁷;
- tra i fattori di rischio possono essere inclusi anche età, sesso e altre caratteristiche o eventi anamnestici come precedenti o concomitanti terapie;
- la cardiotoxicità da chemioterapici è un problema a tutte le età, ma il rischio aumenta con l'età;
- uomini e donne hanno un differente rischio di cardiotoxicità⁸, soprattutto in fase pre-menopausale, mentre dopo la menopausa, i livelli di ormoni femminili protettivi decadono e il tasso di aterosclerosi nelle donne aumenta esponenzialmente.

Una precoce identificazione dei pazienti a rischio di cardiotoxicità deve essere quindi un obiettivo primario degli oncologi, nell'ottica dello sviluppo di strategie terapeutiche antineoplastiche personalizzate.

Studi clinici recentemente pubblicati hanno analizzato le condizioni cardiovascolari dei pazienti sottoposti a chemioterapia, rivelando un'alta prevalenza di soggetti a rischio^{9 10}. Infatti, già nel 2008, Schmidinger et al. hanno pubblicato uno studio osservazionale di pazienti schedulati per un trattamento

con sorafenib e sunitinib che sono stati analizzati per il rischio di coronaropatia, storia cardiovascolare ed evidenza di malattia coronarica, ipertensione, disturbi del ritmo o insufficienza cardiaca. Lo studio ha rilevato una storia di cardiopatia nel 9,3% dei pazienti arruolati, infarto miocardico nel 5,8%, insufficienza cardiaca nel 7%, disturbi del ritmo nel 3,5%, ipertensione non controllata nel 3,5%. Molti pazienti arruolati erano ad elevato rischio a causa di ipertensione (48,8%), ipercolesterolemia (26,7%), diabete mellito (22%) o ipertrigliceridemia (12,8%). Queste osservazioni indicano come una preesistente problematica cardiaca sia spesso sottostimata e la necessità di un accurato monitoraggio cardiovascolare e un trattamento cardiaco appropriato al primo segno di danno cardiaco.

La cardiotoxicità da farmaci

I farmaci oncologici hanno uno spettro d'azione tra i più vari. Attualmente la ricerca farmacologica in ambito oncologico ha individuato come target terapeutico la neoangiogenesi, processo di crescita di neovasi necessari per lo sviluppo della massa tumorale e delle localizzazioni metastatiche periferiche.

In particolare, agenti biologici con azione inibitoria selettiva sul *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) e a vari livelli del suo *signaling pathway* (VSP) sono stati approvati per il trattamento di un ampio spettro di tumori.

Con l'incremento dell'utilizzo clinico, questi agenti hanno mostrato i loro effetti collaterali a livello cardiovascolare. In particolare ipertensione arteriosa (IA), anche severa con sviluppo di ipertrofia cardiaca, proteinuria, eventi tromboembolici ed emorragie.

Non hanno invece dimostrato un effetto cardiotossico diretto ma, bloccano i meccanismi riparativi della cardiopatia ischemica e lo sviluppo capillare necessario per mantenere l'efficienza del cuore ipertrofico, favorendo l'evoluzione verso la disfunzione miocardica, specie nei cuori sottoposti a precedente trattamento cardiotossico.

II. ANGIOGENESI

Con angiogenesi si intende la formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da una preesistente rete vascolare, ed è un processo cruciale nello sviluppo di un tumore. Nuovi vasi sono necessari per sostenere il tumore sia nella sua crescita locale sia nella formazione di metastasi a distanza¹¹.

Già nel 1930 Gordon Ide ebbe l'idea che i tumori promuovessero la formazione di una propria vascolarizzazione attraverso la secrezione di fattori sconosciuti¹², idea confermata nel 1945 da Glenn Algire, il quale notò che i tumori crescevano molto più velocemente dei tessuti normali anche grazie alla capacità di stimolare la formazione di nuovi vasi che portassero ossigeno e sostanze nutrienti.

Alla fine degli anni '60 un lavoro di Bruce Warren, Melvin Greenblatt e Philippe Shubik confermò quest'ipotesi^{13,14}. Nel 1971 per primo Folkman propose di inibire l'angiogenesi tumorale per prevenire sia la crescita locale della neoplasia, sia la formazione di metastasi a distanza^{15 16}.

Nel 2004 la Food and Drug Administration ha approvato il primo farmaco antineoangiogenico, Bevacizumab, per i pazienti con cancro del colon-retto metastatico. In seguito l'uso del Bevacizumab è stato approvato per diversi altri tumori (mammella, rene, polmone) e altri nuovi farmaci antiangiogenici sono stati commercializzati.

Farmacologia degli inibitori dell'angiogenesi:

1. VEGF e VEGFR

La famiglia dei *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) ,cioè i fattori di crescita secreti dai tumori, che inducono la formazione di nuovi vasi, include 4 distinte proteine, da VEGF A a VEGF D, più il *Placental Growth Factor* (PlGF)¹⁷. VEGF-A è la proteina che ha il ruolo proangiogenetico più rilevante, promuovendo l'angiogenesi nelle cellule tumorali tramite diversi *pathway*. VEGF-A agisce stimolando la proliferazione, sopravvivenza e migrazione delle cellule dell'endotelio vascolare, oltre ad inibirne l'apoptosi e regolarne la permeabilità.

Tutti i membri della famiglia VEGF stimolano risposte cellulari legandosi a recettori tirosin-chinasici sulla superficie cellulare, forzandone la dimerizzazione e l'attivazione tramite transfosforilazione. I recettori per VEGF hanno una porzione extracellulare consistente in 7 domini simili a immunoglobuline, una singola porzione attraversante la membrana e una porzione intracellulare contenente un dominio tirosin-chinasico.

Esistono tre recettori VEGF: VEGFR-1, -2 e -3, di questi il VEGFR-2 è il maggiormente espresso a livello delle membrane delle cellule endoteliali e media gli effetti angiogenetici.

VEGF-A si lega ai recettori VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (KDR/Flk-1): di questi il secondo media quasi tutte le risposte cellulari note al VEGF, il primo invece, pare modulare l'attività dell'altro; un'altra funzione del VEGFR-1 potrebbe essere di agire da inibitore competitivo nei confronti del 2, riducendone l'attività (soprattutto in età embrionale)¹⁸. Il terzo recettore, VEGFR-3, in grado di legare VEGF-C e VEGF-D, interviene nella linfangiogenesi¹⁹.

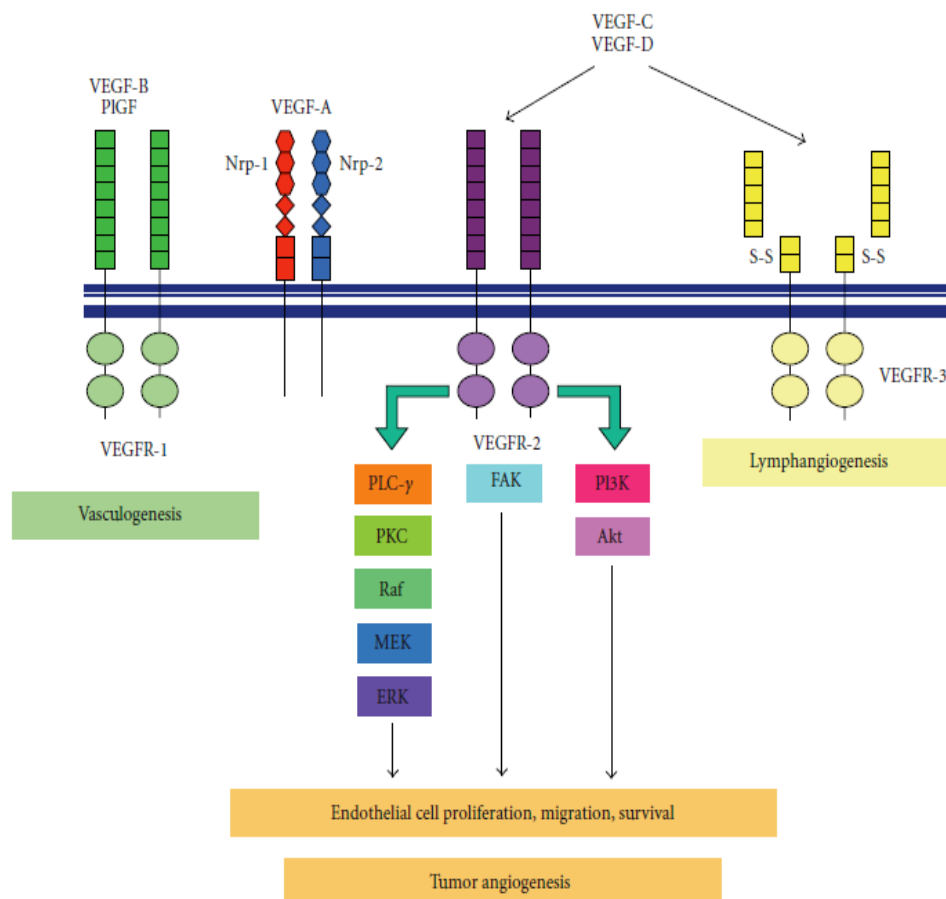


Figura 1: interazione VEGF-VEGFR e cascata di trasmissione del segnale²⁰

Le stesse cellule tumorali producono VEGF, che agisce in modo paracrina sulle cellule endoteliali vicine, e oggi si pensa che esprimano anche VEGFR²¹. Ne risulta una proliferazione e sopravvivenza delle cellule endoteliali, oltre che una migrazione e localizzazione (*homing*) delle cellule progenitrici dell'endotelio²². L'espressione di VEGF all'interno dei tumori è regolata dai livelli di ossigeno, da fattori di crescita e citochine, dall'attivazione di oncogeni o inattivazione di oncosoppressori. Potenti induttori sono le citochine pro-infiammatorie, come Interleuchina-6, e le condizioni ambientali, come un pH basso. L'ipossia, che caratterizza spesso i tumori solidi, agisce attraverso HIF-1 (*Hypoxia inducible factor*) e HIF-2²³. HIF è un substrato del prodotto del gene oncosoppressore Von Hippel Lindau (pVHL). Quando i livelli di ossigeno sono bassi, pVHL è inattivato e HIF si accumula, promuovendo l'espressione di più di 200 geni responsabili della risposta all'ipossia, uno dei quali è VEGF²⁴.

2. APPLICAZIONI TERAPEUTICHE: FARMACI ANTI-VEGF

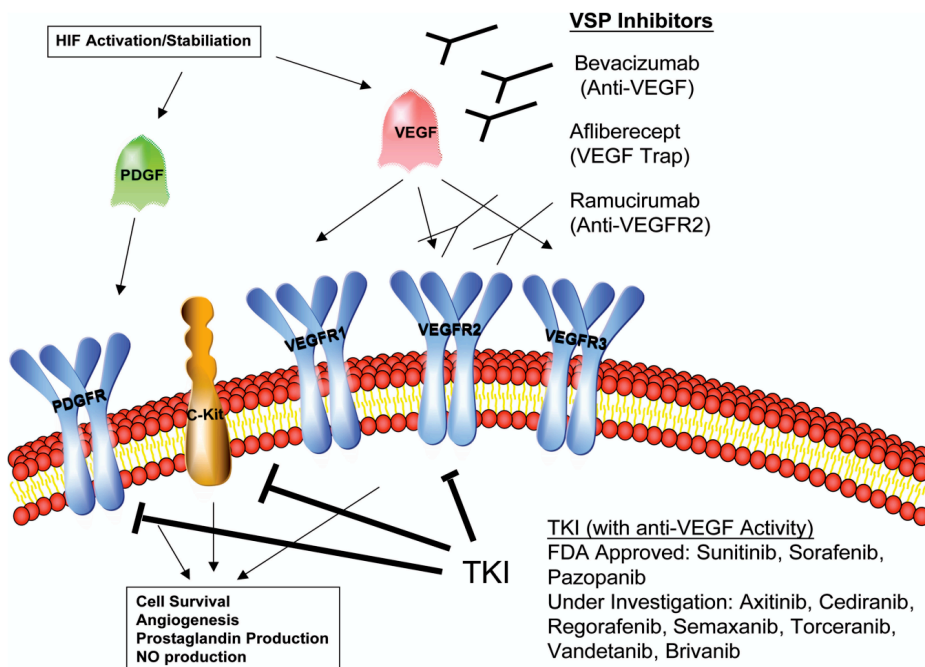


Figura 2: Applicazioni terapeutiche: farmaci anti VEGF

Il pathway di VEGF può essere interrotto a vari livelli, fornendo diverse opzioni terapeutiche. Attualmente due sono i meccanismi maggiormente studiati e utilizzati in clinica: bloccare VEGF tramite un legame con il suo recettore extra-cellulare con un antagonista di VEGF (anticorpi, VEGF-Trap) o inibire il segnale trasmesso da VEGF con un inibitore di tirosin-chinasi (TKIs)²⁵.

- Bevacizumab

Il Bevacizumab, anticorpo monoclonale umanizzato, è il capostipite della famiglia dei farmaci antineoangiogenici. E' composto da una IgG umana che costituisce lo scheletro su cui sono innestate sei regioni determinanti la complementarità, derivate dall'anticorpo monoclonale murino mAb A4.6.1²⁶. Il Bevacizumab, legandosi al fattore di crescita delle cellule endoteliali vascolari (VEGF), promotore chiave della vasculogenesi e dell'angiogenesi, impedisce a quest'ultimo di legarsi ai suoi recettori, Flt-1 (VEGFR-1) e KDR (VEGFR-2), sulla superficie delle cellule endoteliali. Il blocco dell'attività biologica del VEGF fa regredire la vascolarizzazione dei tumori, normalizza la vascolarizzazione tumorale residua, e inibisce la formazione di nuova vascolarizzazione, impedendo perciò la crescita tumorale.

La somministrazione del Bevacizumab o del suo corrispondente anticorpo murino in modelli di xenotrapianto di tumore in topi nudi ha dimostrato un'ampia attività antitumorale in tumori umani, inclusi quelli di colon, mammella, pancreas e prostata. La progressione della malattia metastatica è stata bloccata e la permeabilità microvascolare ridotta.

In Italia l'utilizzo del bevacizumab è indicato e quindi rimborsato:

- in combinazione con chemioterapia a base di Fluoropirimidine per il trattamento di pazienti con carcinoma metastatico del colon e del retto.
- in combinazione con Paclitaxel per il trattamento in prima linea di pazienti con carcinoma mammario metastatico.
- in aggiunta a chemioterapia a base di Platino, per il trattamento in prima linea di pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule, non resecabile, avanzato, metastatico o in ricaduta, con istologia a predominanza non squamocellulare.
- in combinazione con Interferone alfa-2a per il trattamento in prima linea di pazienti con carcinoma renale avanzato e/o metastatico.

- TKIs

Le piccole molecole TKIs²⁷ con attività antiangiogenica sono un'altra area importante di ricerca clinica. Si tratta di piccole molecole che interferiscono direttamente con l'attività tirosin-chinasica di VEGFR. Dato che il dominio

intracellulare, target dei TKIs, è strutturalmente simile in molteplici recettori tirosin-chinasici, un singolo TKI interferisce con l'attività di più recettori.

Sunitinib e Sorafenib sono stati i primi due TKIs sviluppati ed autorizzati dall'FDA per il trattamento rispettivamente di tumore renale e GIST per il primo e tumore renale e carcinoma epatocellulare per il secondo. Due nuovi TKIs sono recentemente stati approvati per il trattamento del carcinoma a cellule renali avanzato: Axitinib (inibitore di VEGFR-1,-2,-3, PDG, c-Kit) e Pazopanib.

Pazopanib è un inibitore tirosi-chinasico di VEGFR (-1, -2, and -3), PDGFR e c-Kit , ATP-competitivo, con formulazione orale.

Esistono più di 20 studi clinici di Fase I, II e III che hanno testato sicurezza ed efficacia di Pazopanib in più di 2000 pazienti oncologici. I dati raccolti indicano che il farmaco è ben assorbito dopo somministrazione orale, la dose giornaliera di 800 mg costituisce un regime di monoterapia efficace, fornendo effetti biologici e clinici ottimali, associati all'inibizione di VEGFR; è generalmente ben tollerato a queste dosi e ha un'efficacia incoraggiante in alcuni specifici *setting* tumorali, quali il carcinoma renale, oltre al sarcoma, carcinoma polmonare non a piccole cellule, cancro della cervice e delle ovaie. Gli effetti collaterali sono quelli tipici anche degli altri farmaci anti-VEGFR. Tuttavia gli inibitori dei recettori tirosinchinasici non sono interamente specifici sul VEGFR-2 e questa scarsa selettività influisce non solo sulla loro potenzialità terapeutica ma anche sui loro effetti tossici in particolare a livello cardiaco.

3. APPLICAZIONI CLINICHE DEI FARMACI ANTI-VEGF

- Neoplasia del colon-retto

Il carcinoma del colon-retto è il terzo tumore per incidenza e la terza causa di morte per cancro sia nell'uomo che nella donna nei Paesi Industrializzati. Circa il 20% dei pazienti con carcinoma colo rettale si presenta con malattia avanzata al momento della diagnosi e circa il 35% dei pazienti trattati con intervento curativo svilupperà una recidiva di malattia non resecabile. L'obiettivo del trattamento della malattia in stadio avanzato non resecabile chirurgicamente è solitamente di tipo palliativo, atto a migliorare la qualità di vita, a ritardare la progressione di malattia ed a prolungare la sopravvivenza. In casi selezionati è possibile impostare un trattamento potenzialmente curativo che riduca la massa tumorale in modo tale da renderla resecabile.

Diversi sono gli schemi di terapia che possono essere utilizzati nel paziente metastatico. L'associazione di 5-Fluorouracile in infusione continua con Acido Folinico ha portato ad un aumento della risposta obiettiva e della sopravvivenza. L'aggiunta di Oxaliplatino o di Irinotecan al regime sopradescritto, rispettivamente secondo schema FOLFOX o FOLFIRI, ha portato ad un ulteriore incremento della risposta obiettiva, della sopravvivenza libera da malattia e dell'*overall survival*. FOLFOX e FOLFIRI sono utilizzati in tutti i pazienti che sono in grado di aderire a una polichemioterapia ed entrambi possono essere utilizzati in prima linea senza sostanziali differenze. Le linee guida AIOM del 2010 consentono anche la sostituzione del 5-Fluorouracile a regime infusionale con la somministrazione di Capecitabina per via orale sia per regimi di monoterapia sia in associazione a Oxaliplatino o Irinotecan .

Accanto ai chemioterapici tradizionali negli ultimi anni è cresciuta la disponibilità di nuovi farmaci denominati "*target oriented*", ovvero in grado di interagire con specifici substrati cellulari particolarmente espressi nelle cellule neoplastiche, quali Bevacizumab e Cetuximab e Pamitumumab (anti EGFR), che, somministrati insieme agli schemi tradizionali di chemioterapia e successivamente come terapia di mantenimento, hanno incrementato i risultati ottenuti dalla sola chemioterapia tradizionale.

Nel 2004, un trial clinico di fase III dimostrò un beneficio di 4.6 mesi di sopravvivenza aggiungendo il Bevacizumab alla chemioterapia convenzionale (5-fluorouracile/acido folinico o 5-fluorouracile/acido folinico/irinoteca per endovena) in pazienti con cancro colon-rettale metastatico²⁸. Bevacizumab è diventato quindi il primo trattamento anti-angiogenesi approvato dalla FDA per l'uso nel cancro del colon-retto avanzato o metastatico nel Febbraio 2004, e successivamente dall'EMA a Gennaio 2005.

In aggiunta, un grande studio internazionale di Fase III (NO16966) su pazienti trattati in prima linea per il cancro del colon-retto avanzato o metastatico ha confermato che l'aggiunta di Bevacizumab a qualunque regime chemioterapico a base di oxaliplatino (FOLFOX o XELOX) ha migliorato la sopravvivenza libera da progressione (PFS) in maniera statisticamente significativa rispetto alla sola chemioterapia, indipendentemente dal regime chemioterapico associato²⁹.

Nel Gennaio 2008 la Commissione Europea ha approvato l'utilizzo di Bevacizumab nel tumore del colon-retto in combinazione con qualsiasi tipo di

chemioterapia, compresa la Capecitabina orale, non solo per il trattamento di prima linea, ma anche nelle linee di trattamento successive. La dose raccomandata è di 5mg/kg o 10mg/Kg di peso corporeo una volta ogni 2 settimane, oppure 7,5 mg/Kg o 15mg/Kg ogni 3 settimane, per via endovenosa. Non è raccomandata la riduzione della dose in caso di eventi avversi.

Dopo questo risultato incoraggiante, moltissimi altri studi hanno arruolato pazienti con altre neoplasie solide.

- Neoplasia della mammella

Il carcinoma della mammella è la neoplasia più frequente nelle donne dei Paesi industrializzati ed è la maggior causa di morbilità e mortalità oncologica.

Circa il 25-40% delle pazienti con tumore della mammella sviluppa metastasi a distanza durante il decorso della loro patologia, mentre solo il 5% presenta metastasi al momento della diagnosi. La sopravvivenza mediana delle pazienti con tumore metastatico è variabile tra i 2 e i 4 anni in funzione del primo sito di ricorrenza della malattia: l'aspettativa di vita è maggiore nelle pazienti con malattia metastatica localizzata (linfonodi, cute, lesione epatica singola) o con solo metastasi ossee, mentre le pazienti con multiple lesioni viscerali o con metastasi al Sistema Nervoso Centrale hanno un *range* di sopravvivenza mediana incluso tra i 4 e i 6 mesi ³⁰.

Tra gli obiettivi del trattamento della malattia metastatica la palliazione è sicuramente il più importante e ad oggi, la chemioterapia rappresenta un'alternativa di cura in grado di determinare regressione di malattia, ritardare la progressione ed il peggioramento dei sintomi e, in alcuni casi, di aumentare la sopravvivenza. In questi ultimi anni, in associazione ai farmaci chemioterapici classici, primi fra tutti antracicline e taxani, si è sempre più evidenziata l'utilità dei nuovi farmaci mirati, ad esempio contro la neoangiogenesi tumorale.

I risultati dello studio registrativo di Fase III (studio E2100) dimostrano che Bevacizumab in associazione con il chemioterapico paclitaxel, rispetto al solo paclitaxel in monoterapia, raddoppia le possibilità di sopravvivenza senza progressione di malattia (PFS) nel trattamento di prima linea delle pazienti con tumore al seno metastatico o con recidiva locale.

In particolare, i risultati hanno mostrato, nelle pazienti trattate con Bevacizumab e paclitaxel, una PFS di 11,3 mesi, contro un valore di 5,8 mesi nelle pazienti trattate con solo paclitaxel. Anche la percentuale di risposta obiettiva è risultata raddoppiata nelle pazienti trattate con il regime contenente Bevacizumab (49,8%) rispetto a quelle trattate con la monoterapia (22,2%).

Sulla base di questi dati, a marzo 2007 il Bevacizumab ha ottenuto dalla Commissione Europea l'indicazione come trattamento di prima linea per le donne con tumore della mammella metastatico in combinazione con paclitaxel. La dose raccomandata di Bevacizumab è di 10 mg/kg di peso corporeo una volta ogni 2 settimane, oppure 15 mg/Kg ogni 3 settimane, per via endovenosa.

- Neoplasia del polmone

Il tumore polmonare rappresenta la neoplasia più frequente negli uomini e la principale causa di morte cancro-correlata nei paesi occidentali. Il tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC) rappresenta l'80% di tutte le neoplasie polmonari, mentre il tumore polmonare a piccole cellule (SCLC) rappresenta il restante 20%. Sfortunatamente al momento della diagnosi la maggior parte dei pazienti hanno una malattia già metastatica, ed un trattamento sistemico di tipo palliativo, rappresenta la principale opzione terapeutica. Più del 50% dei NSCLC in fase avanzata sono diagnosticati in pazienti con età maggiore di 65 anni, spesso portatori di altre comorbidità. Proprio per questo motivo risulta sempre più importante avere a disposizione, oltre ai farmaci chemioterapici classici (carboplatino o cisplatino, docetaxel, gemcitabina) anche farmaci con un target molecolare più mirato.

I risultati dello studio di Fase III E4599 hanno riconosciuto come il Bevacizumab sia il primo farmaco ad estendere la sopravvivenza di oltre un anno nei pazienti con tumore polmonare avanzato non trattato in precedenza. Lo studio ha dimostrato una durata media di sopravvivenza di 12,3 mesi nel gruppo di pazienti trattati con Bevacizumab più una chemioterapia con paclitaxel e carboplatino, contro un valore di 10,3 mesi nel gruppo trattato con la sola chemioterapia. In generale i pazienti trattati con Bevacizumab hanno avuto un miglioramento della sopravvivenza di circa il 27%, in confronto ai pazienti che hanno ricevuto solo la chemioterapia

Un secondo studio di Fase III (AVAL) ha inoltre confermato che quando bevacizumab è in combinazione con una chemioterapia a base di platino (gemcitabina/cisplatino) si ottiene un miglioramento nella sopravvivenza senza progressione nei pazienti con tumore al polmone a cellule non piccole in fase avanzata prima non trattati.

Sulla base dei trial E4599 ed AVAL, Bevacizumab ha ottenuto l'approvazione delle Autorità Sanitarie dell'Unione Europea per il trattamento del tumore al polmone non a piccole cellule ad agosto 2007, in aggiunta a chemioterapia a base di platino fino a 6 cicli di trattamento, seguita da Bevacizumab in monoterapia fino alla progressione di malattia. La dose raccomandata di Bevacizumab è di 7,5 mg/Kg o 15mg/Kg di peso corporeo, da somministrarsi una volta ogni 3 settimane mediante infusione endovenosa.

- Neoplasia del rene

Il tumore del rene rappresenta il 2-3% di tutte le neoplasie maligne. In Italia colpisce ogni anno 8.500 persone e circa la metà ne muoiono. In un terzo dei casi la malattia si presenta in fase localmente avanzata: se vi è solo interessamento dei linfonodi la sopravvivenza a 5 anni è del 30%, ma si riduce al 15-20% nella malattia metastatica o avanzata, con il 50% dei pazienti che non sopravvive oltre a 6 mesi.

Per quanto concerne la terapia medica, diversi approcci sono stati utilizzati nel trattamento del carcinoma renale metastatico: ormonoterapia (ormai del tutto abbandonata), chemioterapia (a cui però il tumore renale in stadio IV è generalmente resistente) ed immunoterapia. L'immunoterapia consiste nella somministrazione sottocutanea di farmaci che stimolano il sistema immunitario contro le cellule estranee come quelle tumorali. L'utilizzo di alfa-interferone ricombinante e/o di interleuchina-2 (da soli o in associazione a farmaci citotossici come ad esempio 5-fluorouracile) sono stati in grado di determinare regressioni parziali della malattia della durata di circa 4-6 mesi, e fino a poco tempo fa rappresentavano la prima linea di trattamento standard per questo tipo di pazienti. Oggi, grazie all'introduzione di nuove terapie più specifiche e mirate, è possibile affermare che la prognosi di questa patologia ha subito sostanziali miglioramenti.

Nella maggior parte dei pazienti affetti da carcinoma renale, specialmente in quelli con un'istologia a cellule chiare (che rappresentano il 90% dei tumori renali) è stata identificata una over espressione di VEGF e VEGFRs. Questo appare implicato con un aumento dell'angiogenesi, uno stadio tumorale avanzato, un fenotipo aggressivo e una sopravvivenza limitata. In questo senso esiste un importante rationale per colpire questo tipo di tumore con agenti antiangiogenici.

L'ultimo TKI approvato per il trattamento della neoplasia renale avanzata è il Pazopanib, alla dose di 800 mg/die.

In uno studio di fase II³¹ di somministrazione di Pazopanib alla dose di 800mg/die nel carcinoma renale avanzato, arruolati 225 pazienti, la percentuale di risposta parziale ottenuta alla dodicesima settimana era del 27%. Alla dodicesima settimana, una diminuzione in VEGFR2 rispetto al basale era significativamente correlata con una risposta di malattia.

In uno studio di fase III³², controllato con placebo in doppio cieco (VEG105192; NCT00334282), 435 pazienti con carcinoma renale a cellule chiare in fase avanzata, senza precedenti trattamenti, sono stati randomizzati (2:1) a Pazopanib 800mg /die o a placebo. Pazopanib ha dimostrato un miglioramento significativo in *Progression Free Survival* rispetto al placebo, nello studio globale della popolazione (9,2 mesi versus 4,2 mesi con placebo)

Molteplici studi sono al momento in corso per valutare l'efficacia di Bevacizumab e dei TKIs in molti altri tipi di tumore tra cui prostata, ovaio, cervice e pancreas.

Tossicità degli inibitori dell'angiogenesi

Tre sono i principali effetti collaterali dei farmaci inibitori dell'angiogenesi, che potrebbero essere implicati nello sviluppo della cardiotoxicità: sviluppo di ipertensione, proteinuria, eventi tromboembolici. Anche il sanguinamento è un effetto collaterale da tenere sempre presente durante l'utilizzo di questi antineoplastici. Altri effetti sono invece più rari e meno rilevanti (perforazione, cambiamento di voce, mucositi, tossicità gastrointestinale, tossicità cutanea,

fatigue, aumento delle transaminasi, complicanze neurologiche, *Hand-Foot syndrome*, mielosoppressione).

1. IPERTENSIONE

L'ipertensione è l'effetto collaterale più importante di tutti gli inibitori dell'angiogenesi, sia degli Anticorpi Monoclonali sia degli Inibitori di Tirosin Chinasi. Questo sottolinea l'importanza del ruolo fisiologico di VEGF nel regolare il tono vasomotore e nel mantenere una Pressione Arteriosa (P.A.) costante³³.

Nei trials di fase I il BEVA è stato amministrato fino alla dose massima di 10 mg/kg in assenza di tossicità dose-relata. Lieve incremento dei valori pressori è stato rilevato solo durante terapia a dosaggio maggiore³⁴. In tre studi di fase II per lo studio di tossicità/efficacia del farmaco è stata rilevata un'incidenza di ipertensione arteriosa in un range tra 16% e 47%³⁵, con un 3-16% di pazienti che hanno sviluppato ipertensione di grado \geq III (vedi *Tabella I*) e un caso di encefalopatia ipertensiva^{36,37,38}. L'esistenza di una precedente diagnosi di IA è un fattore di rischio per lo sviluppo di forme severe farmaco relate³⁹. In cinque studi di fase III, che hanno portato all'approvazione del BEVA da parte della FDA, lo sviluppo di IA è stato più frequente nel braccio in terapia^{40, 41, 42, 43, 44}.

È stato inoltre valutato l'intervallo tra l'inizio della terapia e lo sviluppo di ipertensione. In particolare Yang et al.⁴⁵ riportano che la mediana dell'intervallo tra la prima dose di bevacizumab e lo sviluppo di ipertensione è di 131 giorni (range: 7-316 gg). Johnson et al riportano il maggior incremento nella PAS, di 7-14 mmHg, al 42° giorno di trattamento⁴⁶, con rialzi maggiori in caso di ipertensione pre-esistente. In uno studio retrospettivo pubblicato sul *Journal of Clinical Oncology* condotto su 144 pazienti trattati con BEVA è stata riportata un'incidenza di IA pari al 35% dei pazienti, con una mediana di 11 settimane dall'inizio della chemioterapia⁴⁷.

Sebbene il dosaggio ottimale per gli effetti biologici del BEVA non sia stato ancora definito, è noto che l'effetto ipertensivo è dose relata. Infatti negli studi prospettici che testavano i vari regimi, a dosi maggiori di BEVA corrispondeva una maggior incidenza di IA^{46,48,49} e, come già evidenziato, vi è una chiara associazione tra il tempo di esposizione a BEVA e lo sviluppo di ipertensione⁵⁰.

Inoltre, è da notarsi, che l'effetto ipertensivo degli inibitori del VSP, così come ha una rapida insorgenza dopo l'inizio della terapia, nondimeno ha un rapido

decremento, con il ritorno a valori pressori simili al basale dopo la sospensione della terapia^{51, 52}.

È prevedibile che la vera incidenza di IA venga sottostimata dai trials clinici, in cui i pazienti sono in parte selezionanti, e che l'utilizzo nella comune pratica clinica permetta di stabilirne la reale frequenza nella popolazione generale.

Ad ogni modo la terapia con Bevacizumab è considerata controindicata nei casi di ipertensione arteriosa in scarso controllo farmacologico (PA > 150/90 mmHg), ed è da sospendersi in caso di crisi ipertensiva, ipertensione non controllata e proteinuria > 2mg nelle 24 ore.

Tabella I: Common Terminology Criteria for Adverse Events, v. 4.03 (CTCAE): Classificazione ipertensione arteriosa.

grado	
1	Pre-ipertensione (PAS 120-139 mmHg o PAD 80-89 mmHg)
2	Ipertensione di grado 1 (PAS 140-159 mmHg o PAD 90-99 mmHg) o ricorrente o persistente (> 24 h); incremento sintomatico > 20 mmHg (diastolico) o > 140-90 mmHg se precedentemente normale
3	Ipertensione di grado 2 (PAS > 160 mmHg o PAD > 100 mmHg) o in trattamento farmacologico o indicazione ad incremento terapeutico rispetto al basale
4	Pericolo di vita (es. crisi ipertensiva)
5	Decesso

- Meccanismi fisiopatologici dello sviluppo di ipertensione arteriosa

Numerosi meccanismi sono stati proposti per spiegare lo sviluppo di ipertensione arteriosa associato agli inibitori di VSP (vedi *Figura 1*).

- I. L'attivazione del VEGFR-2 tramite legame con VEGF induce la produzione di ossido nitrico (NO) sintetasi e di prostaciclina a livello delle cellule endoteliali, che promuove la vasodilatazione e l'aumento della permeabilità vascolare⁵³. Infatti, quando gli agonisti VEGF sono utilizzati in modelli sperimentali di cardiopatia ischemica per lo studio della neoangiogenesi post-infartuale, uno dei maggiori effetti collaterali è

l'ipotensione⁵⁴. Mentre il trattamento con inibitori del VSP, sia in vitro che in modelli animali ha mostrato una riduzione della produzione di NO con incremento delle resistenze vascolari e sviluppo di ipertensione. Inoltre in uno studio recente condotto su pazienti affetti da carcinoma renale metastatico che ricevevano terapia con inibitori VSP è stata dimostrata una soppressione della produzione di NO⁵⁵. Questi dati suggeriscono un importante ruolo causale delle alterazioni nella produzione di NO nella patogenesi dell'ipertensione legata a inibitori di VSP.

- II. L'altro fenomeno che sembra coinvolto nella genesi dell'IA è la perdita di circolazione capillare parallela, altrimenti nota come impoverimento vascolare, che si verifica nei tessuti solidi non tumorali dei pazienti trattati con inibitori VSP. Questo meccanismo fisiopatologico sembra completamente reversibile dopo l'interruzione della terapia^{56, 57}.

Impoverimento arteriolare e capillare è stato mostrato in modelli animali ipertesi, con il rapido decremento della densità capillare dopo 3 giorni di dieta ad elevato carico salino^{58,59}. Questi dati suggeriscono che l'impoverimento vascolare avviene relativamente precocemente durante lo sviluppo di ipertensione. Fenomeni di impoverimento vascolare sono stati dimostrati anche in studi clinici. In particolare sono stati descritti fenomeni di impoverimento vascolare in pazienti con predisposizione genetica per IA, che hanno preceduto lo sviluppo clinico di elevati valori pressori⁶⁰. Syeeghs et al. per primi dimostrarono impoverimento vascolare in pazienti trattati con inibitori di VSP⁶¹. In un successivo studio prospettico, condotto su pazienti in trattamento con BEVA per cancro colon-rettale metastatico, dopo 6 mesi di terapia è stato dimostrato un significativo aumento dei valori pressori accompagnato da una riduzione della densità capillare media a livello del derma⁶².

- III. Un ulteriore meccanismo proposto è la disfunzione endoteliale che porta a un incremento nella produzione di endotelina-1 e a un incremento nella rigidità arteriosa sia nei vasi prossimali che distali. Veronese et al.⁶³ verificarono che pazienti trattati con inibitori di VSP per 3-6 settimane mostravano un incremento nell'*Arterial Stiffness*, con l'aumento dell'*Augmentation Index* aortico e della *Pulse Wave Velocity*. Il livello di renina plasmatica, aldosterone e catecolamine non erano modificati

rispetto alla media in questa classe di pazienti, e pertanto non risultavano coinvolti nella genesi dell'ipertensione.

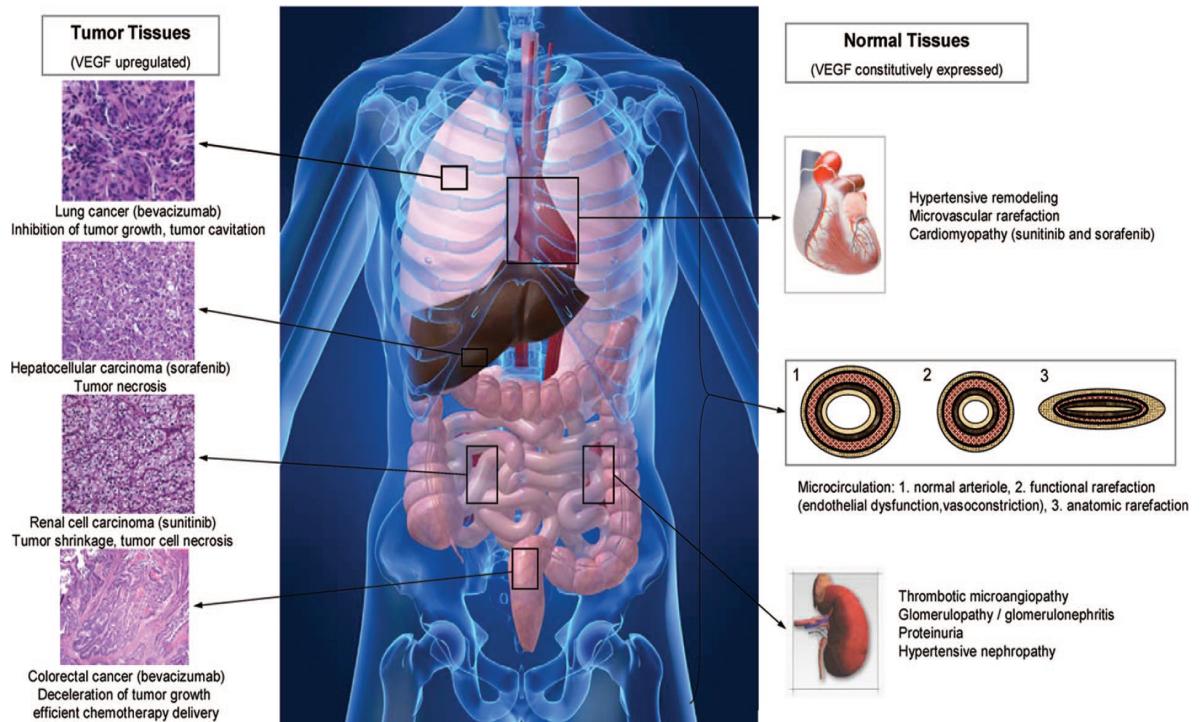


Figura 3: Effetti degli inibitori di VSP a livello delle cellule tumorali e nei tessuti normali

- Riserva di flusso coronarico

E' noto che, specie nel paziente iperteso, esistono anomalie strutturali e/o funzionali in grado di determinare ischemia in assenza di malattia coronarica angiograficamente rilevante. Molti di questi meccanismi sono considerati parimenti responsabili degli effetti cardiotossici degli inibitori del VSP. In particolare:

- I. alterazioni funzionali del microcircolo coronarico (vasocostrizione) o strutturali (rarefazione arteriolo-capillare);
- II. compromissione della vasodilatazione endotelio-dipendente, in particolare ridotta biodisponibilità di ossido-nitrico;
- III. anomalie degli elementi ematici (attivazione piastrinica) e fluidodinamica (viscosità ematica) che configurano uno stato pro-trombotico.

In modelli animali, la promozione della crescita dei capillari con VEGF riduce l'apoptosi e preserva la funzione contrattile in cuori ipertrofici a causa dell'ipertensione⁶⁴. Sempre nei topi è stato dimostrato il potenziale rischio cardiotossico associato all'abrogazione del signaling di VEGF⁶⁵: topi con una delezione specifica del gene VEGF avevano un minor numero di microvasi

coronarici, pareti ventricolari più sottili e funzionalità contrattile depressa. Infine, sempre esperimenti in modelli animali hanno dimostrato che il ruolo del signaling di VEGF nella normale fisiologia cardiaca si estende oltre l'angiogenesi e media un'importante risposta compensatoria allo stress ed al danno miocardico⁶⁶.

Eventi cardiaci sono stati osservati con tutti i farmaci anti-VEGF approvati. Sunitinib e Sorafenib potrebbero avere un effetto tossico diretto sui cardiomiociti, sia causando un danno cellulare, sia inibendo i normali processi di riparazione. Infatti, in virtù della loro non-selettività, possono inibire tirosin-chinasi essenziali per la sopravvivenza dei cardiomiociti⁶⁷. Questo processo può portare ad una complessiva perdita cellulare miocardica, come dimostrato durante somministrazione di Sunitinib in topi.

Non vi sono però attualmente dati in letteratura in merito agli effetti di inibizione del VEGF a livello dei vasi coronarici. In particolare non è noto se i fenomeni di vasocostrizione secondari all'azione del Bevacizumab siano tali da determinare una riduzione della riserva di flusso coronarico (RFC), in questa classe di pazienti, favorendo una successiva evoluzione verso la cardiopatia ischemica.

2. PROTEINURIA

Un altro effetto collaterale dei farmaci inibitori di VSP è la proteinuria che si rileva nel 23-38% dei pazienti con carcinoma colon-rettale e fino al 64% dei pazienti con carcinoma renale. Proprio tra i pazienti con carcinoma renale si è rilevato il rischio maggiore di sviluppare una proteinuria di grado elevato (grado III-IV, vedi *Tabella II*), nel 6,5% dei casi, con conseguente danno strutturale alla barriera glomerulare, mentre nei restanti casi molto rari sono i casi di proteinuria di grado maggiore^{68,69}. La maggior parte dei pazienti è infatti asintomatica (grado I-II, vedi *Tabella II*)⁷⁰. Una meta-analisi di trials controllati randomizzati con pazienti in terapia con Bevacizumab ha indicato un rischio relativo di 1,4 di proteinuria utilizzando il farmaco a bassa dose (da 2,5 a 7,5 mg/Kg) e di 1,6 per l'alta dose (da 10 a 15 mg/Kg), suggerendo una relazione dose-dipendente tra Bevacizumab e sviluppo di proteinuria⁷¹.

La proteinuria non è associata a disfunzione renale e solitamente aumenta dopo l'interruzione della terapia con BEVA. Il meccanismo con cui si instaura non è completamente compreso ma probabilmente è dovuto a un effetto a livello glomerulare, analogo a quello che accade in caso di glomerulonefrite

membrano proliferativa. Infatti la riparazione dell'endotelio glomerulare richiede l'azione del VEGF e pertanto viene inibita dai farmaci anti VEGF, che interferiscono con l'integrità dell'endotelio glomerulare⁷² favorendo la proteinuria. Inoltre l'eritropoietina stimola il rilascio di VEGF e i suoi bassi livelli nei pazienti affetti da neoplasia possono aggravare la proteinuria⁷³.

È da notarsi che la proteinuria solitamente precede lo sviluppo di ipertensione arteriosa⁷⁴ e pertanto potrebbe essere utilizzato come strumento di screening per la diagnosi precoce di cardiotoxicità. Invece la relazione tra la durata del trattamento e la proteinuria, o se lo sviluppo di proteinuria sia un marker di efficacia antitumorale, rimangono punti non definitivamente chiariti⁷⁵. Per quanto concerne il trattamento di questo effetto collaterale, non ci sono al momento indicazioni a trattare una proteinuria di grado lieve-moderato se asintomatica e non associata ad ipertensione; mentre se coesiste un aumento della Pressione Arteriosa, secondo le raccomandazioni K/DOQI⁷⁶ è ragionevole iniziare un trattamento con farmaci ACE-inibitori o Antagonisti del sistema renina-angiotensina, anche se tale indicazione deve essere convalidata da trials controllati randomizzati.

Tabella II: Classificazione proteinuria.

grado	Stick urine	Proteinuria 24 h
1	1+	0,15 – 1,0 gr/24 h
2	2+/3+	> 1,0 -3,5 gr/24 h
3	4+	> 3,5 gr/24 h
4	Sindrome nefrosica	

3. TROMBOEMBOLISMO

Un terzo effetto collaterale del Bevacizumab è la comparsa di eventi tromboembolici, specie quando viene somministrato in associazione con altri chemioterapia (incidenza 0,6 – 1,5%). Fattori di rischio per lo sviluppo di tromboembolismo sono l'età maggiore di 65 anni e l'anamnesi di pregressa aterosclerosi.

Il meccanismo fisiopatologico sembra direttamente correlato al suo effetto antiblastico. Infatti inibendo il recettore per il VEGF e la cascata dei segnali che fisiologicamente promuove (integrità endoteliale e vasale, angiogenesi, regolazione del tono vasale ossido nitrico mediato e omeostasi piastrinica), determina un'incontrollata attivazione piastrinica e l'attivazione della cascata coagulativa con conseguente aumento del rischio tromboembolico⁷⁷.

4. SANGUINAMENTO

Da ultimo il sanguinamento: infatti il VEGF ha un ruolo centrale nel mantenimento dell'integrità tissutale e nella riparazione delle ferite, per questo una sua inibizione può condurre ad una diminuita integrità tissutale, ad una ritardata cicatrizzazione e a sanguinamenti di vario genere.

Per tali motivi, si raccomanda di aspettare un periodo di almeno 28 giorni tra l'ultima somministrazione di Bevacizumab e qualunque procedura chirurgica elettiva.

La maggior parte dei sanguinamenti in pazienti in terapia con Bevacizumab sono di lieve entità (epistassi, sanguinamenti sottocutanei), ma in pazienti affetti da tumori polmonari squamocellulari, localizzati centralmente, si sono verificati casi di gravi sanguinamenti, anche mortali⁷⁸, dovuti probabilmente proprio all'effetto di cavitazione della lesione propria del farmaco. Per tale motivo pazienti affetti da questo tipo di neoplasia sono esclusi dal trattamento con gli Inibitori dell'angiogenesi, così come ne sono esclusi i pazienti con secondarismi cerebrali (per l'elevato rischio di complicanze dato da un eventuale sanguinamento intracranico) e i pazienti già in terapia anticoagulante.

III. IDENTIFICAZIONE DELLA CARDIOTOSSICITA'

Biomarkers

Il potenziale utilizzo di *biomarkers* sierici per valutare il rischio di sviluppare cardiotoxicità nei pazienti trattati con chemioterapici è interessante⁷⁹.

Biomarkers possono essere utilizzati per la diagnosi, la stratificazione del rischio del paziente, la selezione e l'ottimizzazione della terapia oltre allo screening negli stadi preclinici di malattia⁸⁰.

I peptidi natriuretici (*N-TERMINAL PRO-BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE*, *BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE*, *ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE*) sono usati come *markers* predittivi di severità dell'insufficienza cardiaca⁸¹, e sono rilasciati dai cardiomiociti in risposta ad un aumentato stiramento ventricolare. La loro concentrazione sierica correla in modo significativo con le pressioni di riempimento ventricolare sinistro^{82, 83}. E' noto infatti che lo scompenso cardiaco è associato ad un aumento dei livelli circolanti di BNP plasmatico e che anche in pazienti con disfunzione diastolica vi è un incremento di tale ormone.

La concentrazione ematica della TROPONINA cardiaca T e I risulta correlata all'estensione del danno miocardico acuto, essendo rilasciato in caso di necrosi dei cardiomiociti⁸⁴.

in campo Oncologico i lavori di Cardinale et al⁸⁵ dimostrano che un rialzo prolungato dell'enzima Troponina, anche al termine del trattamento chemioterapico, è correlato ad un rischio maggiore di eventi cardiaci. Il meccanismo per il quale il rilascio di Troponina aumenti al termine della chemioterapia non è ancora noto, poichè non si tratta del classico rilascio di enzimi miocardici causato dalla necrosi dei miocardiociti, tipico degli eventi ischemici improvvisi.

La concentrazione plasmatica del peptide natriuretico atriale e cerebrale è stata accertata in uno studio prospettico in 13 adulti affetti da leucemia durante trattamento con doxorubicina e collegata alla Frazione di Eiezione. Dopo la chemioterapia, 3 pazienti hanno sviluppato insufficienza cardiaca cronica e 5 una diminuzione della frazione di eiezione asintomatica. In tutti i pazienti con una disfunzione cardiaca, la concentrazione plasmatica del BNP aumentava al di sopra del range di normalità prima che la Frazione di Eiezione subisse una diminuzione, mentre non si modificava nei pazienti che non hanno sviluppato cardiotossicità. I valori di peptide natriuretico atriale invece non erano correlati con i cambiamenti della FE⁸⁶.

Il ruolo predittivo dei *biomarkers* della cardiotossicità causata da un trattamento antineoplastico non è ancora definito in modo sufficientemente preciso da includere questi due esami come screening di routine, anche se un incremento

persistenze nella loro concentrazione sembra identificare i pazienti ad alto rischio di cardiotoxicità.

Elettrocardiografia

L'elettrocardiografia è un metodo comodo e poco costoso per individuare i disturbi della conduzione cardiaca e i segni di cardiomiopatia. Molti agenti antineoplastici inducono problemi cardiaci che possono condurre cambiamenti nell'ECG, come anomalie della ripolarizzazione e prolungamento dell'intervallo QT.

La maggior parte degli studi prospettici sul ruolo dell'ECG nello screening della cardiotoxicità misurano i cambiamenti nell'intervallo QT corretto, anche per la facilità con cui questo parametro può essere confrontato. Nakamae e collaboratori⁸⁷ hanno mostrato come un allungamento dell'intervallo QT fosse predittivo di una disfunzione cardiaca subacuta (potenzialmente fatale) in 19 pazienti che ricevevano ciclofosfamide ad alte dosi. Gli stessi autori hanno rilevato un'associazione tra il prolungamento del QT e un declino nella funzione sistolica in 72 pazienti adulti dopo trattamento con antracicline⁸⁸, suggerendo il fatto che un intervallo QT allungato potrebbe indicare cardiotoxicità.

Studi più ampi sul valore predittivo del cambiamento nell'intervallo QT corretto non sono ancora stati effettuati. In aggiunta, altri farmaci usati comunemente possono causare variazioni del QT e quindi rendere più difficoltosa l'interpretazione di tale dato.

Pochi dati sono al momento disponibili su cambiamenti in altre variabili elettrocardiografiche. Una diminuzione del voltaggio del QRS entro 24 ore è stata osservata in 6 di 16 pazienti con carcinoma mammario in terapia con alte dosi di ciclofosfamide, ma non è stato fornito un follow-up più lungo delle 24 ore.

In definitiva, non esiste un'importante evidenza per definire il ruolo dell'ECG nell'accertamento di cardiotoxicità. Molti studi suggeriscono che un prolungamento del QT corretto ne sia un marker precoce, ma la sua accuratezza nel predire un danno cardiaco tardivo non è stata univocamente stabilita.

Analogamente l'ECG si presenta come un esame poco costoso per l'identificazione dei pazienti portatori di ipertrofia cardiaca.

La sensibilità della metodica nell'identificare la presenza di ipertrofia ventricolare sinistra è bassa, ma nonostante questo la positività dell'indice di Sokolow-Lyons ($SV1+RV5-6 > 38$ mm) o dell'indice di Cornell modificato (> 2440 mm* msec) è un predittore di eventi cardiovascolari futuri. Almeno nei pazienti di età superiore ai 55 anni si potrebbe utilizzare tale approccio come marker di danno cardiaco o della sua regressione durante trattamento.

Ecocardiografia

Lo scopo, non ancora pienamente raggiunto, dell'*imaging* cardiaco all'interno dei trattamenti antitumorali, consiste nell'individuare precocemente il danno miocardico, ad uno stadio ancora potenzialmente reversibile⁸⁹. Esistono molte linee guida per il monitoraggio degli effetti sul sistema cardiovascolare durante e dopo un trattamento anti-tumorale⁹⁰, ma non forniscono chiare raccomandazioni, ed appaiono basate su evidenze modeste. Inoltre nessuna linea guida definisce un corretto approccio a lungo termine in adulti sopravvissuti al cancro.

L'**ecocardiografia bidimensionale** è un metodo basato sulla riflessione degli ultrasuoni da parte delle differenti strutture cardiache, permettendone l'identificazione e l'analisi della loro funzione in tempo reale. Si tratta di una metodica efficace e consolidata; l'esecuzione di un esame ecocardiografico è standardizzata a livello internazionale secondo le linee guida dell'*American Society of Echocardiography* (ASE).

L'**ecocardiografia Doppler** utilizza la riflessione degli ultrasuoni da parte dei globuli rossi circolanti per misurare la velocità del flusso sanguigno attraverso le valvole, all'interno delle camere cardiache e attraverso i grandi vasi (Doppler ematico). Tali velocità vengono rappresentate in scala colorimetrica, assumendo come rosso i flussi in direzione del trasduttore, blu in allontanamento dal trasduttore, verde se c'è turbolenza.

Esistono differenti tecniche doppler, tra cui:

- Doppler Pulsato: permette di calcolare la velocità del flusso sanguigno in uno specifico punto di un'immagine bidimensionale ed evidenzia la velocità sotto forma di spettro usando il tempo come asse x.
- Doppler continuo: permette di misurare l'alta velocità del flusso sanguigno diretto lungo le linee del fascio doppler.
- Doppler tissutale (*Tissue Doppler Imaging*: DTI), acquisizione recente della tecnica ecocardiografica in cui il principio Doppler, classicamente utilizzato per l'analisi dei flussi intracardiaci, viene applicato, con opportune modifiche, nella determinazione delle velocità parietali miocardiche durante l'intero ciclo cardiaco.

La diagnosi ed il monitoraggio delle disfunzioni cardiovascolari in pazienti sottoposti a trattamento anti neoplastico sono basati su tecniche che misurano i cambiamenti nella perfusione del miocardio e la funzione del ventricolo sinistro⁹¹ ⁹². La misurazione della frazione di eiezione del ventricolo sinistro è appunto il metodo più comunemente usato per il monitoraggio della funzione sistolica⁹³. La frazione di eiezione può però sottostimare il danno cardiaco, anche perchè una precoce alterazione della funzione diastolica può essere presente in assenza di coinvolgimento sistolico. Di conseguenza, controlli della funzione diastolica sono probabilmente più sensibili nell'individuare cambiamenti subclinici della funzionalità cardiaca, anche se il loro valore predittivo nel paziente oncologico non è ancora ben definito⁹⁴ ⁹⁵.

Nuove prospettive vengono dall'utilizzo dell'**ecocardiografia speckle tracking** dello *strain* miocardio. La metodica *Tissue Speckle Tracking* si basa sull'assunzione che ogni segmento miocardico è caratterizzato da un unico e peculiare pattern di grigi all'immagine bidimensionale ("*speckle pattern*"). Una volta identificato tale pattern, riconosciuto all'interno della parete miocardica come gruppo di pixel con specifiche caratteristiche acustiche di riflettività, il software è in grado di seguirlo *frame by frame* durante tutto il ciclo cardiaco, fornendo informazioni circa la velocità e la deformazione attiva del segmento. I principali vantaggi di tale metodica sono quelli di essere angolo indipendente e consentire la valutazione della contrazione/rilasciamento del miocardio lungo la direzione circonferenziale, radiale e longitudinale⁹⁶, ⁹⁷, ⁹⁸. Bisogna qui ricordare che l'ispessimento parietale è generalmente considerato parallelo alla direzione

principale della cinesi parietale, cioè verso il centro del ventricolo. In realtà, durante il ciclo cardiaco la deformazione regionale a livello del miocardio avviene in tre direzioni principali, longitudinale, circonferenziale e radiale contemporaneamente e, dal momento che il muscolo cardiaco è incompressibile e quindi il suo volume rimane costante, ad ogni accorciamento (longitudinale) corrisponde un ispessimento radiale.

Le informazioni derivate dall'analisi degli *speckles patterns* vengono fornite in una presentazione visiva semiquantitativa. Infatti lo spostamento viene calcolato automaticamente, a partire dalla mappa bidimensionale, e rappresentato con una scala di colori. I colori, sovrapposti all'immagine B-mode in scala di grigi, forniscono immagini interpretabili visivamente.

Rispetto alla valutazione dei singoli profili di spostamento, questa tecnica ha il vantaggio di una maggiore semplicità e rapidità. Essa, inoltre, consente la valutazione dell'intera funzione sistolica ventricolare in una singola immagine.

Per prima cosa è necessario acquisire un ciclo cardiaco che viene registrato per essere processato off-line. Sull'immagine acquisita viene dunque tracciato manualmente il bordo endocardico in telesistole. Sulla base di tale traccia il software esegue un *tracking* automatico del bordo epicardico e della linea intramiocardica e individua i segmenti di interesse. L'analisi è dipendente dall'approvazione da parte dell'operatore che, se lo ritiene opportuno, può modificare la regione di interesse in base alla qualità del *tracking*. Generalmente il miocardio viene analizzato in 6 differenti piani: tre assi corti (basale, medio, apicale) e tre piani apicali (4-, 2- e 3-camere). In ciascun piano il miocardio è diviso in 6 segmenti per un totale di 18 segmenti. Tutti i segmenti sono dunque rappresentati numericamente e graficamente in diagrammi che mostrano i differenti parametri analizzabili (*displacement*, *strain*, *strain-rate* e *velocity*). A ciascun segmento viene solitamente associato un codice colore differente.

Inizialmente per l'analisi della meccanica ventricolare sono state utilizzate le curve di *velocity* miocardica. Ma tale parametro ha il limite di essere determinato sia dalle proprietà contrattili ed elastiche del segmento esaminato sia dall'azione di trazione (*thetering*) da parte delle regioni adiacenti. Una possibilità di superare questo limite risiede nella determinazione della contrattilità miocardica non in termini di variazione di velocità miocardica, ma in termini di effettivo ispessimento e rilasciamento parietale durante il ciclo cardiaco, ovvero in termini di deformazione del segmento miocardio o *strain* miocardico.

In generale il termine "strain" indica la deformazione di un tessuto in funzione dell'applicazione di una forza (stress). Per *strain* miocardico, si definisce la deformazione a cui è soggetta la fibra muscolare cardiaca durante la contrazione ventricolare. Lo *strain* è infatti una misura adimensionale e rappresenta l'entità, percentuale, della variazione in lunghezza rispetto ad una dimensione iniziale di riferimento. Può rappresentare sia un'espansione o un allungamento (*strain* positivo) o una compressione o accorciamento (*strain* negativo).

Idealmente la misura corretta dello *strain*, lo *strain* 'Langrangiano', richiede la misura della deformazione di una fibra a partire dalla lunghezza iniziale in assenza di sollecitazioni ed è definito dalla formula:

$$Strain (\epsilon) = \frac{(L - L_0)}{L_0}$$

in cui L_0 è la lunghezza in assenza di stress, L la lunghezza istantanea considerata e $S (\epsilon)$ lo *Strain* risultante. La reale lunghezza in assenza di stress di un segmento miocardico considerato è in realtà di difficile determinazione e L_0 è spesso sostituita dalla lunghezza basale (tele-diastolica).

La curva di *strain* registra durante la sistole una deflessione negativa del tracciato fino ad un valore massimo, detto picco di *strain* sistolico. Durante la diastole il movimento si inverte con allungamento delle miocellule fino a ritornare alla lunghezza telediastolica L_0 . Lo *strain* è dunque espresso in valore percentuale.

Quando è nota la lunghezza al momento zero, successivamente alla deformazione e durante la deformazione, possiamo definire lo strain istantaneo:

$$\epsilon (t) = (L(t) - L(t_0)) / L(t_0)$$

$L(t)$ è la lunghezza dell'oggetto all'istante di tempo t . In questo caso la deformazione istantanea è espressa in relazione alla lunghezza iniziale $L(t_0)$. Questo tipo di *strain* è detto *Lagrangian strain*.

Tuttavia è possibile esprimere la deformazione miocardica anche in relazione alla lunghezza immediatamente precedente a quella dell'istante considerato:

$$d\epsilon_N(t) = (L(t+dt) - L(t)) / L(t)$$

dove dt è un intervallo di tempo infinitamente piccolo;

$N(t)$ è l'entità infinitesima di deformazione che avviene nell'intervallo di tempo considerato.

Lo *strain* totale, si ottiene sommando tutti gli infinitesimi

$$\epsilon_N(t) = \int d\epsilon_N(t)$$

$L(t)$ non è costante nel tempo ma cambia durante la deformazione stessa.

Questo è definito *strain* naturale o ϵ_N .

A seconda del territorio analizzato possiamo definire lo *strain* come:

- *strain* principale, che esprime la deformazione di un singolo segmento;
- *strain* globale, media degli *strain* di tutti i 16 segmenti, che esprime la deformazione complessiva del ventricolo in quella direzione (longitudinale, radiale, circonferenziale);
- *strain* territoriale, che rappresenta la deformazione del territorio di irrorazione di ogni singola coronaria.

A seconda della direzione in cui analizziamo la deformazione lo *strain* può essere definito:

- *strain* longitudinale, ovvero deformazione lungo l'asse base-apice;
- *strain* radiale, ovvero deformazione verso il centro della cavità;
- *strain* circonferenziale, ovvero accorciamento delle fibre lungo la direzione del perimetro ventricolare.

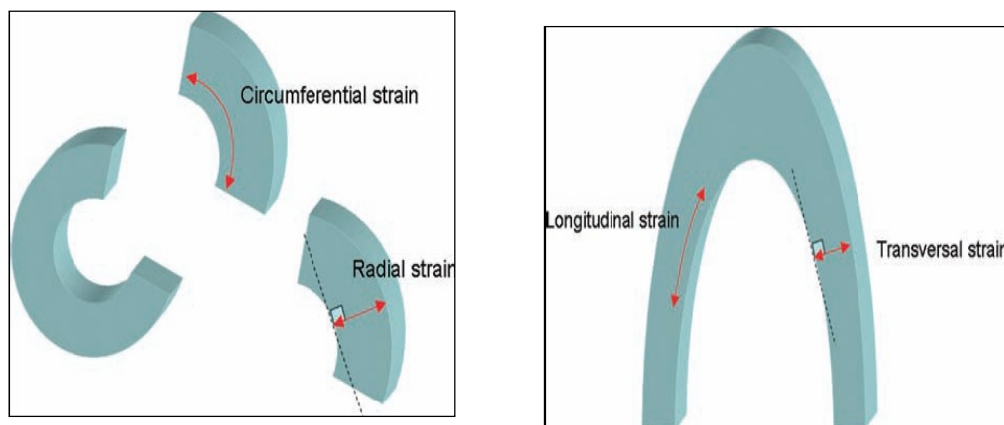


Figura 4: Parametri di *strain* miocardico

In direzione longitudinale e circonferenziale avremo un deformazione sistolica in negativo, in quanto la deformazione in tali direzioni riflette l'accorciamento delle fibre cardiache durante la contrazione. In direzione radiale invece ci sarà un ispessimento in sistole perciò avremo una deformazione di segno positivo. Infatti se intendiamo come *strain* il movimento di 2 punti di miocardio vicini, essi si avvicineranno in direzione longitudinale e circonferenziale in sistole, poiché la fibra si accorcia; si allontaneranno invece in direzione radiale, quando la fibra si ispessisce, per poi avvicinarsi in diastole quando la fibra si assottiglia.

Parametri importanti da considerare quando valutiamo lo *strain* sono il picco di *strain* e il tempo di picco, ovvero il tempo in cui si raggiunge questo picco di deformazione. Entrambi sono importanti per definire la funzione ventricolare sinistra in quanto la fisiologica efficace funzione ventricolare, dipende sia dal raggiungimento del picco di deformazione, sia dalla sincronia e quindi dal raggiungimento sincrono del picco da parte di tutti i segmenti.

Tramite temporizzazione delle fasi del ciclo cardiaco è possibile distinguere uno

- *strain* durante il tempo di eiezione (ϵ_{et}) che rappresenta il massimo accorciamento parietale durante la fase di contrazione sistolica.
- *strain* massimo durante il ciclo cardiaco (ϵ_{max}), la contrazione totale misurabile dalla lunghezza iniziale e il massimo accorciamento registrato durante il ciclo cardiaco.
- *strain* post-sistolico (ϵ_{ps}), il massimo *strain* misurabile tra la chiusura della valvola aortica e l'inizio della fase di allungamento segnata dal riempimento rapido transmitralico ⁽⁵⁹⁾; può essere calcolato con la seguente equazione:

$$\epsilon_{ps} = (\epsilon_{max} - \epsilon_{et}) / \epsilon_{et}. \quad (58)$$

da questi valori è possibile calcolare

- il rapporto $\epsilon_{ps} / \epsilon_{max}$ ed il rapporto $\epsilon_{ps} / \epsilon_{et}$ che esprime l'entità del movimento di accorciamento presente dopo il tempo di eiezione in rapporto all'accorciamento sistolico globale.

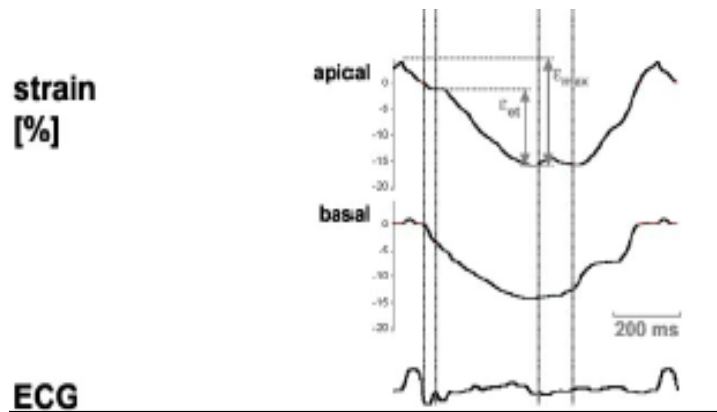


Figura 5: Rappresentazione della fase sistolica della curva di strain

Lo *strain* viene modificato dal carico a cui è sottoposto il muscolo cardiaco: infatti esso è ridotto da un aumento del postcarico, mentre è aumentato da un aumento del precarico.

Quindi vari sono i fattori che possono influire su tale valutazione, andando a modificare il carico, fra tutti ricordiamo i vizi valvolari e lo sviluppo di ipertensione arteriosa, fattori cioè agiscono modificando direttamente il carico emodinamico a cui viene sottoposto il miocardio.

Anche l'età va a influenzare l'entità della deformazione delle fibre miocardiche; studi recenti evidenziano come l'entità della deformazione sia maggiore nel soggetto giovane rispetto al soggetto anziano, indipendentemente dalle condizioni di patologia⁹⁹.

Anche danni diretti al miocardio possono andare a modificare l'entità della deformazione miocardica; ad esempio farmaci chemioterapici cardiotossici possono agire in tal senso.

IV. IDENTIFICAZIONE DEL DANNO CARDIOVASCOLARE SUBCLINICO

Valutazione danno d'organo cardiaco

1. IPERTROFIA CARDIACA

Una valutazione ecocardiografica appropriata dovrebbe includere la misurazione del setto interventricolare, dello spessore della parete posteriore e del diametro telediastolico ventricolare sinistro, con il calcolo del valore della massa ventricolare sinistra. La relazione tra massa ventricolare sinistra e rischio

cardiovascolare è di tipo continuo, nonostante ciò esistono valori soglia di 125 g/m² per gli uomini e di 110 g/m² per le donne che sono largamente utilizzati come stima conservativa di ipertrofia ventricolare sinistra.

VALORI DI RIFERIMENTO	A.S.E.		E.S.H./E.S.C.	
	Donne	Uomini	Donne	Uomini
IVS (BSA) g/m ²	96	115	110	125
IVS (h ^{2.7}) g/m ^{2.7}	45	49	51	51

Figura 6: Valori di riferimento della massa ventricolare sinistra indicizzati per BSA.

La massa ventricolare viene solitamente calcolata utilizzando due possibili formule:

Formula (ASE): $Massa = 0.83 [(SIVd + PPd + VSd)^3 - VSd^3] + 0.6$

Formula (PENN): $Massa = 1.04 [(SIVd + PPd + VSd)^3 - VSd^3] - 13.6$

Solitamente i grossi studi e le Linee guida hanno utilizzato la formula di Penn, data la migliore accuratezza.

In relazioni a quelli che sono i rapporti tra spessori parietali e diametri intracavitari del ventricolo sinistro sono stati descritti differenti pattern geometrici, espressione dell'evoluzione del danno d'organo cardiaco.

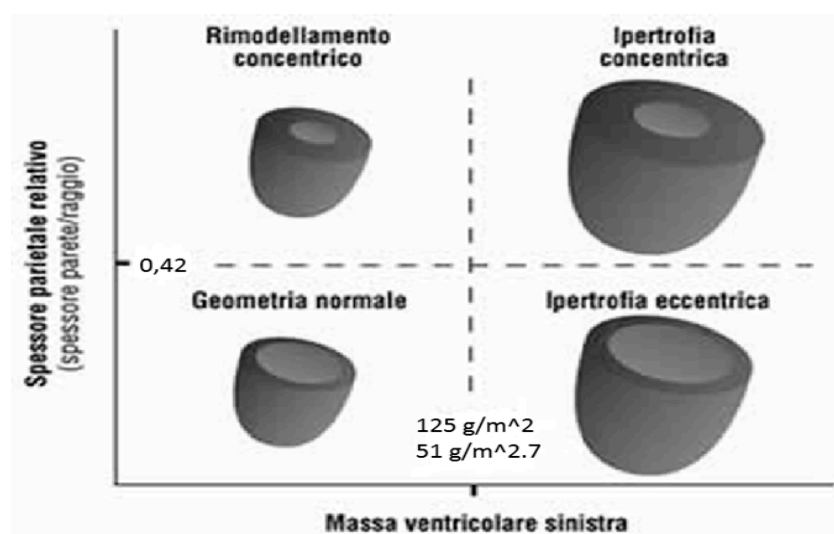


Figura 7: Pattern di geometria ventricolare sinistra

L'ipertrofia concentrica (rapporto H/R, parete su raggio ≥ 0.42 con massa ventricolare sinistra aumentata)¹⁰⁰, l'ipertrofia eccentrica (aumento della massa ventricolare sinistra con $H/R < 0.42$) e il rimodellamento concentrico ($H/R \geq 0.42$ con massa ventricolare sinistra normale) predicono tutti un aumentata incidenza di patologie cardiovascolari, ma è stato dimostrato che l'ipertrofia concentrica è la condizione che più marcatamente aumenta il rischio. L'esame ecocardiografico valuta inoltre funzione sistolica del ventricolo sinistro, la frazione di eiezione e la frazione di accorciamento centroparietale e quest'ultima è stata proposta come fattore predittivo aggiuntivo dell'incidenza di eventi cardiovascolari.

2. DISFUNZIONE DIASTOLICA

L'Ecocardiocolordoppler è l'esame principale per la valutazione della funzione diastolica mediante un'analisi multiparametrica²⁰.

Doppler pulsato sulla valvola mitrale:

Il profilo di velocità del flusso transmitralico è solitamente il primo parametro utilizzato per caratterizzare la funzione diastolica del ventricolo sinistro e la sua dinamica di riempimento.

Le curve di velocità al Doppler pulsato, ottenute posizionando il volume campione a livello dei margini liberi dei lembi valvolari mitralici, descrivono il flusso di sangue dagli atri ai ventricoli durante la diastole ventricolare. Il riempimento ventricolare sinistro consiste in un flusso diastolico precoce (passivo) e in un flusso più tardivo dato dalla contrazione atriale (attiva), corrispondenti rispettivamente alle onde E ed A della curva di velocità Doppler.

Queste curve forniscono i seguenti parametri clinici:

- picco di velocità dello svuotamento passivo (ampiezza dell'onda E, in m/s), influenzato da gradiente pressorio tra atrio e ventricolo e che, a sua volta, è influenzato da molte variabili, comprese la pressione atriale e la compliance del ventricolo sinistro
- picco di velocità del flusso atriale (ampiezza dell'onda A, in m/s), influenzata pertanto dalla contrattilità atriale e dalla compliance del ventricolo sinistro

- tempo di decelerazione dell'onda E (DT, in m/s), influenzato dal tempo di equilibrio delle pressioni atriali e ventricolari
- tempo di dimezzamento del gradiente pressorio trans mitralico (PHT, in m/s), con il Doppler continuo.

In condizioni di normalità l'onda E è maggiore dell'onda A, il rapporto E/A è compreso tra 0.75 e 1.5 e il *deceleration time* è compreso tra 160 e 240 msec.

Il vantaggio di questo tipo di valutazione consiste nel suo essere facilmente ottenibile in quasi tutti i soggetti e nella possibilità di fornire informazioni sia diagnostiche e che prognostiche.

Tuttavia presenta alcuni limiti: innanzitutto è altamente dipendente dal precarico e le misure sono influenzate dalla posizione del volume campione e dalle elevate frequenze. Inoltre la misurazione risulta problematica in presenza di blocchi atrio ventricolari, fibrillazione atriale, ritmo stimolato e risulta talora difficoltosa la misura del DT se il declino della velocità non è lineare.

Bisogna inoltre tener conto però che i valori di normalità variano per età, in particolare per età al di sotto dei 50 anni si considerano normali valori di $E/A > 1.0$ e di $DT < 220$ msec, mentre per età maggiori di 50 anni i valori di normalità cambiano ($E/A > 0.5$ e $DT < 280$ msec).

Infatti nei soggetti giovani, il valore normale del rapporto E/A mitralico è 1.7 ± 0.438 e la frazione di riempimento atriale $< 30\%$. Nei soggetti sani di mezza età il picco di velocità E è leggermente più elevato (0.81 ± 0.2 m/s) del picco di velocità A (0.44 ± 0.12 m/s) e la frazione di riempimento atriale aumenta¹⁰¹. Con l'età l'ampiezza dell'onda E decresce mentre l'ampiezza dell'onda A aumenta (onda E 0.58 ± 0.2 m/s e onda A 0.67 ± 0.21 m/s nella decade tra i 70 e gli 80 anni), in quanto aumenta il contributo atriale al riempimento ventricolare¹⁰², mentre decresce il riempimento ventricolare precoce passivo¹⁰³.

Con il Doppler pulsato possiamo registrare anche il flusso venoso di ingresso negli atri: quello delle vene polmonari (per l'atrio sinistro)¹⁰⁴ e delle vene cave ed epatiche (per l'atrio destro)¹⁰⁵, utilizzando sia l'ecocardiografia transtoracica sia l'ETE.

Possono essere valutati i seguenti parametri di flusso venoso:

- picco sistolico della velocità del flusso venoso anterogrado (S, che consiste spesso in due componenti S1 e S2, entrambe in m/s) e durata del flusso venoso sistolico anterogrado (durata dell'S, in m/s);

- picco diastolico di velocità del flusso venoso anterogrado (D, m/s) e durata del flusso venoso diastolico anterogrado (durata D, m/s);
- picco della velocità di flusso venoso retrogrado durante la contrazione atriale (AR) e durata del flusso venoso retrogrado (durata AR)¹⁰⁶.

Durante la contrazione atriale, infatti, il sangue è espulso dall'atrio nei ventricoli attraverso le valvole AV, ma una quota di sangue è espulsa indietro nelle vene (flusso retrogrado), per la mancanza di un meccanismo valvolare a livello degli osti venosi.

Tissue Doppler:

L'esame TDI (*Tissue Doppler Imaging*) è un esame ultrasonografico che completa la valutazione Doppler standard.

Esso registra le basse frequenze ad alta energia generate dal movimento di parete e permette di analizzare la dinamica delle pareti ventricolari durante l'intero ciclo cardiaco.

Il pattern standard del TD pulsato comprende una velocità miocardica sistolica (Sm) anterograda (al di sopra della linea di base) e due velocità miocardiche diastoliche, una protodiastolica precoce (Em) ed una dovuta alla sistole atriale (Am), retrograde.

Nei soggetti in ritmo sinusale gli anelli atrioventricolari mostrano due movimenti distinti in direzione del versante atriale :

- il movimento precoce corrisponde alla velocità miocardia protodiastolica ("early": Em) e comincia simultaneamente all'inizio dell'afflusso mitralico (velocità E), ma la sua velocità di picco precede il picco della E flussimetrica e termina prima della stessa E,
- il secondo movimento diastolico dell'anello mitralico corrisponde alla velocità Am, dovuta alla sistole atriale.

Le applicazioni cliniche nella valutazione della funzione diastolica si basano sulla dimostrazione della minore precarico-dipendenza del TD pulsato anulare rispetto al Doppler flussimetrico transmitralico.

Valori di $Em < 8 \text{ cm/s}$, soprattutto se associati a un rapporto $Em/Am < 1$, indicano anomalie di rilasciamento miocardico, anche in presenza di un rapporto $E/A > 1$. Em è inversamente correlata con la percentuale di fibrosi

miocardia identificata mediante biopsia endomiocardica ed è quindi capace di leggere la fibrosi interstiziale, prima causa di disfunzione ventricolare diastolica¹⁰⁷. Considerata la sua relativa indipendenza dal precarico, il TD pulsato dell'anello mitralico è stato proposto con successo per correggere il flusso transmitralico. Il rapporto E/Em consente di ottenere una stima non invasiva attendibile del grado di pressione di riempimento ventricolare, anche in condizioni considerate difficili per l'esplorazione ultrasonora, come la tachicardia sinusale, la fibrillazione atriale e l'insufficienza mitralica.

Il rapporto E/Em è risultato più accurato in confronto alla manovra di Valsalva e al flusso venoso polmonare nel predire il grado di pressioni di riempimento del ventricolo sinistro.

Quando il rapporto E/Em è < 8 le pressioni di riempimento ventricolare sono sicuramente nella norma; quando il rapporto E/Em è > 15 esse sono aumentate, mentre il range 8-15 rappresenta una fascia grigia in cui la stima delle pressioni di riempimento è incerta ed è necessario considerare misure aggiuntive (Valsalva, flusso venoso polmonare, dimensioni dell'atrio sinistro) ¹⁰⁸.

Dall'associazione dei parametri del doppler pulsato sulla valvola mitrale e del TDI risulta dunque possibile classificare la disfunzione diastolica:

- Grado I: alterato rilasciamento

Il rilasciamento ventricolare ritardato o incompleto genera un ritardo nel passaggio di sangue tra l'atrio e il ventricolo. Le pressioni che impediscono il flusso anterogrado sono riflesse a monte in atrio e nelle vene polmonari. La velocità di riduzione di pressione nel ventricolo sinistro diminuisce ed aumenta la durata rilasciamento (il Dec Time diviene >240 msec), contemporaneamente si riduce la *driving force* tra atrio e ventricolo sinistro (per cui si riduce l'onda E) e questo è compensato da una più vigorosa contrazione atriale (di riflesso si ha un incremento dell'onda A). Ne risulta quindi una riduzione del rapporto E/A (< 0.75).

- Grado II: pattern pseudo-normale

Con il progressivo impedimento allo svuotamento atriale incrementa la pressione in atrio sinistro e decresce il gradiente pressorio atrio-ventricolare (il Dec Time si accorcia, con valori compresi tra 160 e 240 msec). Il rapporto E/A ri-aumenta

fino ad apparire normale (0.9-1.5). Il rapporto E/A diviene < 1 durante la manovra di Valsalva, che determina una riduzione precarico. Comunque, E' rimane ridotto (< 10 cm/s), identificando la sottostante anomalia di rilasciamento. Quindi un'onda E' ridotta, un incremento del rapporto E/E' (> 12), ed associato un incremento di volume atriale (> 28 ml/m²) identifica il pattern pseudonormale e la disfunzione diastolica di II grado.

- Grado III: alterata compliance (pattern restrittivo)

Aumentando ulteriormente la pressione media in atrio sinistro incrementa nuovamente il gradiente pressorio atrio – ventricolare, e questo si riflette in un progressivo aumento dell'onda E. Il rapido aumento delle pressioni in ventricolo sinistro si riflette in una riduzione rapida del flusso tra atrio e ventricolo ed in un accorciamento del Dec Time.

Il pattern restrittivo o da alterata *compliance* è definito quindi da un rapporto E/A > 2 e un Dec Time < 160 msec. Si differenzia una disfunzione diastolica di III o di IV grado in base alla risposta alla manovra di Valsalva (pattern reversibile o irreversibile).

3. FUNZIONE ATRIALE

Le dimensioni dell'atrio sinistro costituiscono un fattore prognostico indipendente, giacché riflettono la storia dell'aumento della pressione inter-atriale sia essa causata da una disfunzione diastolica, o da una valvulopatia mitralica. Le dimensioni atriali sinistre si misurano in tele-sistole quando la camera assume le sue dimensioni maggiori. Una delle misure più utilizzate è certamente il diametro antero-posteriore dall'approccio parasternale asse lungo (Fig. 8). La misura deve essere perpendicolare alla parete atriale e deve essere presa dalla parete anteriore a quella posteriore dell'atrio sinistro. In realtà, la parete anteriore dell'atrio sinistro non è visibile poiché essa poggia sulla parete posteriore dell'aorta dalla quale è divisa da una cavità virtuale: il seno trasverso.

Si utilizza quindi come punto anteriore il confine che divide gli echi che rappresentano la parete posteriore dell'aorta (ma anche la parete anteriore dell'atrio sinistro) e la cavità atriale; come punto posteriore il confine fra la cavità atriale e la parete posteriore dell'atrio. Questa misura, a lungo utilizzata nei laboratori di ecocardiografia e nei trial clinici, costituisce generalmente il diametro più piccolo della cavità: esso, infatti, misura quella regione della cavità

atriale che rimane "schiacciata" fra lo sterno e le vertebre. Il diametro antero-posteriore pertanto non si modifica sensibilmente nelle dilatazioni modeste (bassa sensibilità); tuttavia, quando è aumentato, è certo che l'atrio sia ingrandito (alta specificità)¹⁰⁹. Negli ultimi anni, questo diametro è stato sostituito da altre misure che riflettono più accuratamente le dimensioni della cavità. Utilizzando l'approccio quattro camere apicale possono essere misurate la distanza fra il setto interatriale e la parete laterale (diametro latero-mediale) e la distanza fra la valvola mitrale e la parete posteriore (diametro supero-inferiore) (Fig. 8).

Ovviamente l'area e il volume sono considerate misure ancora più accurate per la determinazione delle dimensioni della cavità. Queste due misure sono eseguite ancora dall'approccio apicale quattro camere. Si traccia il bordo interno della cavità atriale escludendo le vene polmonari e (quando visibile) la cavità auricolare. Per il volume si usa generalmente il metodo "Simpson" come per il ventricolo sinistro, utilizzando un'adeguata formula matematica:

$$V = 8/3 \cdot L \cdot A1 \cdot A2$$

dove L è il diametro comune infero-superiore misurato con l'eco bidimensionale sia nella sezione 4 sia 2 camere apicale.

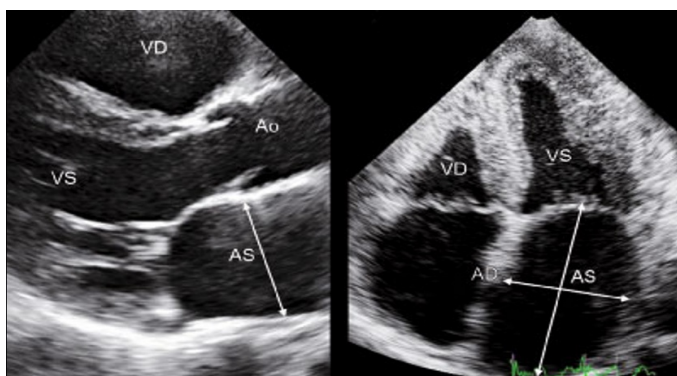


Figura 8: Misure lineari dell'atrio sinistro. AS, atrio sinistro; VS, ventricolo sinistro; AD, atrio destro; VD, ventricolo destro; Ao, aorta

Negli ultimi anni è stato messo a disposizione della pratica clinica un nuovo parametro, lo *strain* dell'atrio sinistro. Questo, derivando dall'applicazione dell'analisi della deformazione miocardica mediante *speckle tracking* alle camere atriali, risulta essere il primo parametro utile per l'analisi funzionale e dinamica dell'atrio sinistro e, come dimostrato da recenti studi, è dotato di notevole fattibilità e riproducibilità¹¹⁰.

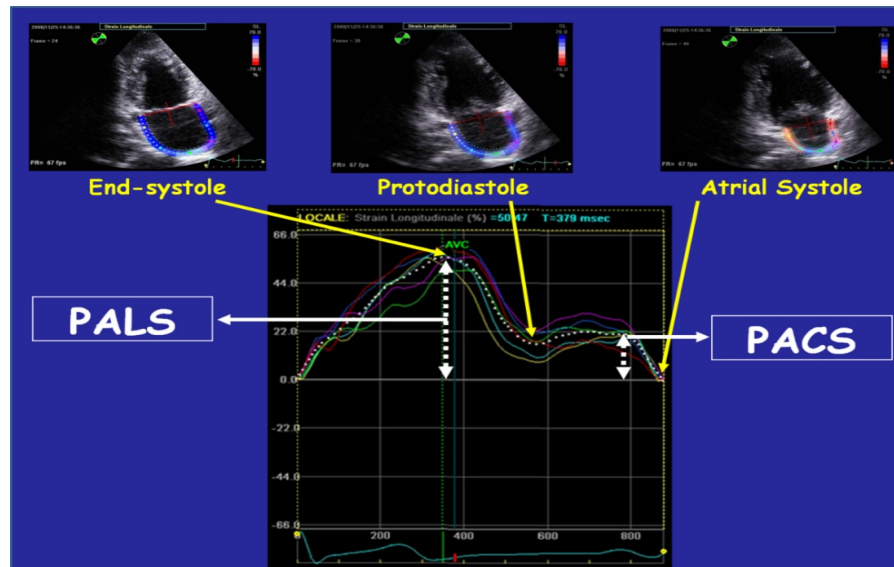


Figura 9: Misurazione delle curve di strain atriale mediante STE.

La tecnica di analisi ecocardiografica *speckle tracking* alle camere atriali permette un'ottima valutazione della deformazione del profilo atriale durante un intero ciclo cardiaco. Per lo studio dell'atrio sinistro con STE vengono registrate le sezioni apicali 4 e 2 camere e l'analisi è condotta off-line tracciando il bordo endocardico con la tecnica del "punta e clicca". Il sistema delinea in maniera semiautomatica una regione di interesse (ROI), la quale viene successivamente divisa in 6 segmenti.; dopo che l'operatore ha approvato tale suddivisione (con l'eventuale possibilità di correzione della ROI), il software genera le curve di *strain* longitudinale per ogni segmento, ed una curva media di tutti i segmenti, le quali riflettono la fisiopatologia atriale: durante la fase di *reservoir*, l'atrio si riempie, si distende passivamente e si allunga; in ragione di ciò la deformazione atriale, lo *strain*, aumenta, raggiungendo il picco positivo al termine del riempimento atriale, prima dell'apertura della mitrale; con l'apertura della mitrale, l'atrio si vuota rapidamente, si accorcia, lo *strain* diminuisce, fino ad un plateau corrispondente alla fase di diastasi; segue un secondo picco positivo, ma minore rispetto al primo, che corrisponde alla fase che precede la contrazione atriale, e successivamente un picco negativo al termine della contrazione atriale.

Dalla curva media di *strain* ottenuta è possibile calcolare il picco massimo di *strain* longitudinale atriale (*peak atrial longitudinal strain*, PALS); dalla media dei valori di PALS analizzati dalle immagini apicale 4 e 2 camere otteniamo il global PALS; al termine del ciclo atriale, nel caso in cui il paziente analizzato sia in ritmo

sinusale, troviamo una seconda deflessione della curva di *strain* atriale, corrispondente alla sistole atriale (*peak atrial contraction strain*, PACS).

L'analisi dell'atrio viene effettuata utilizzando un software creato per il ventricolo sinistro. Per tale motivo è necessario, innanzitutto, tenere in considerazione la presenza di limiti legati alla metodica (necessità di immagini di alta qualità, *frame rate* alto ed esperienza dell'operatore nell'elaborazione off-line), fare attenzione nel tracciare in modo accurato il bordo endocardico, escludendo dal territorio di analisi, l'auricola e lo sbocco delle vene polmonari al fine di ridurre al massimo rischio di artefatti dovuto a segnali provenienti da tali strutture.

Numerosi studi metodologici hanno mostrato i range di riferimento e buoni valori di fattibilità e riproducibilità dell'applicazione della tecnica *speckle tracking* alla misurazione della deformazione miocardica longitudinale dell'atrio sinistro¹¹¹.

Riguardo alla misurazione del picco di deformazione atriale, l'elaborazione finale del software mostrerà un'ampia onda iniziale positiva, stima della fase di *reservoir* atriale, una prima deflessione rapida subito dopo l'apertura della valvola mitrale, una fase di plateau in mesodiastole ed infine una seconda deflessione in telediastole, in concomitanza con la sistole atriale .

I pazienti con insufficienza cardiaca diastolica (DHF) soffrono di un aumento della morbilità e mortalità¹¹². Anche se l'età avanzata, l'ipertensione, il diabete, la malattia coronarica e il genere femminile identificano i pazienti ad alto rischio di DHF, i sottostanti meccanismi fisiopatologici per il passaggio da uno stato asintomatico ad uno stato di insufficienza cardiaca sintomatica non sono ben definiti.

Diversi studi hanno richiamato l'attenzione sulla presenza di maggiori valori di massa ventricolare, di volume atriale e di una ridotta riserva contrattile dell'atrio sinistro in pazienti con DHF.

Tuttavia, fino a poco tempo fa solo alcuni parametri clinici, in mancanza di parametri di analisi della performance atriale, sono stati utilizzati nell'identificare pazienti a rischio di sviluppare DHF. Recentemente, con l'avvento di metodiche più avanzate, è stato possibile definire in questo contesto l'importanza di un'analisi quantitativa della deformazione miocardica atriale.

Già uno studio, eseguito mediante misurazione *strain rate* Doppler della performance atriale, ha messo in luce come una misurazione dello *strain rate* atriale sia in grado, a differenza della massa ventricolare e del volume atriale, di

differenziare pazienti con DHF rispetto a pazienti con semplice disfunzione diastolica.

Sempre mediante *strain rate* Doppler è stato dimostrato come tale metodica rilievi cambiamenti significativi della deformazione atriale in risposta a diversi stadi di disfunzione diastolica in soggetti con frazione di eiezione conservata, confermando il fatto che un'analisi quantitativa della funzione atriale, piuttosto che la misurazione dei volumi, presenti maggior potere nel predire precocemente la disfunzione diastolica del ventricolo sinistro in soggetti con frazione di eiezione conservata.

Mediante *speckle tracking* è stato dimostrato come in pazienti ipertesi, diabetici ed ipertesi-diabetici, con frazione di eiezione e volumi conservati, lo *strain* atriale si presenti progressivamente ridotto, dimostrando la capacità di questa nuova metodica nell'identificare la precoce disfunzione atriale prima ancora che si instaurino alterazioni organiche identificabili anche con metodiche standard (dilatazione atriale).

A conferma di ciò, uno studio condotto in pazienti ipertesi in fase iniziale, senza evidenza di incremento della massa ventricolare, ha evidenziato come lo *strain* atriale si alteri precocemente ancor prima dello sviluppo di disfunzione diastolica¹¹³

Lo *strain* longitudinale atriale ha invece dimostrato una buona correlazione e una accurata performance diagnostica nella stima delle pressioni di incuneamento capillare polmonare elevate (> 18 mm Hg); maggiore è la pressione di riempimento ventricolare sinistro e peggiore risulta essere la deformazione atriale sinistra¹¹⁴.

Valutazione del danno coronarico

4. RISERVA DI FLUSSO CORONARICO

La riserva di flusso coronarico (RFC) è definita come il rapporto tra il flusso sanguigno delle coronarie in iperemia (sotto stimolo) rispetto al flusso coronarico basale (a riposo) per una pressione di perfusione stabilita. In condizioni normali ed in assenza di stenosi il flusso coronarico aumenta approssimativamente di circa 4-6 volte conseguentemente al consumo miocardio di ossigeno. Questo

effetto che è mediato dalla vasodilatazione arteriolare crea una riduzione delle resistenze coronariche ed un aumento del flusso.

In condizioni normali ed in assenza di stenosi il flusso coronarico aumenta approssimativamente di circa 4-6 volte conseguentemente al consumo miocardio di ossigeno. Questo effetto che è mediato dalla vasodilatazione arteriolare crea una riduzione delle resistenze coronariche ed un aumento del flusso. La RFC rappresenta la capacità del circolo coronarico di dilatarsi in risposta alle aumentate richieste metaboliche e nella pratica clinica la RFC viene stimata come rapporto tra il flusso coronarico iperemico e flusso coronarico in condizioni basali. Si assume che una RFC > 3 sia considerata "normale", in base ai dati di Doppler *flow wire*, *gold standard* della metodica¹¹⁵.

Lo stimolo iperemico si ottiene mediante infusione e.v. di farmaci quali dipiridamolo o adenosina che inducono una vasodilatazione arteriolare e quindi un aumento del flusso coronarico. Il dipiridamolo viene comunemente utilizzato in due modalità: lenta o rapida. L'infusione lenta con dose di 0,56 mg/kg in 4 min, seguito da un intervallo libero e da una dose ulteriore di 0,28 mg/Kg min. L'infusione rapida utilizza dose di 0,84 mg/Kg per 6 min seguita da un intervallo libero di 2 min.

L'infusione di adenosina utilizza un dosaggio di 0,14 mg/Kg/min con una durata massima di 4 min. Il dipiridamolo agisce bloccando la degradazione dell'adenosina per cui le controindicazioni al suo utilizzo sono le stesse dell'adenosina (asma bronchiale, BAV di II-III grado e WPW).

Dal momento che flusso coronarico e perfusione tissutale sono interdipendenti, le modificazioni della RFC forniscono informazioni fondamentali per la valutazione quantitativa dell'ischemia miocardia in presenza di stenosi significative di un vaso epicardico¹¹⁶ o, in assenza di stenosi significative dei vasi epicardici, dello stato del microcircolo coronarico^{117,118,119,120,121}. Inoltre l'alterazione della RFC assume anche valore prognostico come osservato nella cardiomiopatia ipertrofica¹²² e dilatativa¹²³.

L'interventricolare discendente anteriore (IVA), nei tratti medio e distale, si presta particolarmente all'identificazione ecocardiografica, in quanto si trova alquanto vicino alla parete toracica anteriore. L'approccio che consente il miglior allineamento tra flusso nell'IVA distale e fascio ultrasonoro è una sezione 2 camere apicale modificata. Data la posizione superficiale dell'IVA solitamente vengono utilizzati trasduttori ad elevata frequenza con minor potere di

penetrazione e quindi una migliore risoluzione spaziale. La regolazione dell'ecocardiografo deve rispettare alcune modalità: l'utilizzo di una bassa frequenza di ripetizione degli impulsi del color Doppler (PRF 11-25), dimensione del gate aumentate al massimo, potenza di emissione del colore al massimo livello, guadagno aumentato fino a che il rumore diventa debole, dimensione variabile del volume campione del doppler pulsato ma > 2 mm, per superare i possibili motivi di registrazioni qualitativamente inadeguate in caso di iperventilazione indotta da dipiridamolo/adenosina.

La migliore registrazione della velocità di flusso coronarico avviene sotto la guida del segnale color: il posizionamento del volume campione del Doppler pulsato nel vaso si effettua riferendosi alla diastole dell'ECG, quando l'immagine dell'IVA è più stabile; viene così registrato un flusso continuo con una componente sistolica (meno ampia) ed una diastolica (più ampia), prima a riposo e poi dopo iperemia. E' fondamentale che l'angolo doppler sia mantenuto costante per tutta la durata dello studio e sempre inferiore a 45° . Gli agenti di contrasto possono essere utilizzati per migliorare il segnale doppler qualora l'immagine non sia adeguata. In questo caso è importante ridurre leggermente la potenza ed il guadagno del color-Doppler ed aumentare lievemente la PFR per evitare una eccessiva "ridondanza" al color.

Attualmente la fattibilità della RFC si IVA tramite ecocardiografia transtoracica risulta prossima al 100% ed è caratterizzata da un'eccellente concordanza con la RFC misurata tramite Doppler *Flow-wire* come dimostrato dalla bassa variabilità inter- e intra-osservatore evidenziata in varie casistiche^{124, 125}.

Oltre che un metodo per la valutazione delle stenosi coronariche dei vasi epicardici, come già detto, una riduzione della RFC può riflettere anche la presenza di compromissione del microcircolo coronarico (ad esempio in conseguenza di ipertensione arteriosa, diabete mellito, ipercolesterolemia, sindrome X, cardiomiopatia dilatativa e malattie del tessuto connettivo)¹²⁶. In particolare uno studio condotto su pazienti con artrite reumatoide in fase iniziale, senza sintomi e segni di cardiopatia ischemica e di terapia anti-infiammatoria e/o steroidea, ha evidenziato una RFC significativamente ridotta rispetto ai controlli sani in associazione con elevati livelli plasmatici di dimetilarginina simmetrica (ADMA), marker ematochimico di disfunzione endoteliale. I risultati di questo studio mostrano come la disfunzione endoteliale sia presente già negli stadi più precoci di aterosclerosi, quando non sono ancora evidenti manifestazioni cliniche

di cardiopatia ischemica, ma è già presente la compromissione del microcircolo coronarico come suggerito dalla significativa riduzione della RFC¹²⁷.

Va ricordato però che oltre alla patologia del microcircolo coronarico diversi altri fattori possono alterare la RFC quali l'età¹²⁸, il fumo di sigarette¹²⁹, l'assunzione di tè e caffè¹³⁰, le variazioni ormonali del ciclo mestruale¹³¹, la presenza di valvulopatia aortica (stenosi) o mitralica (insufficienza) significative¹³².

SCOPI DELLO STUDIO

Studio clinico osservazionale condotto su pazienti sottoposti a terapia con Bevacizumab che ha come obiettivo la valutazione degli effetti del farmaco a livello coronarico nell'ipotesi che l'effetto sistemico vasocostrittore e di promozione dei meccanismi di disfunzione endoteliale si esplichino anche sui vasi epicardici determinando una riduzione della riserva coronarica.

Inoltre ci proponiamo valutare l'efficacia di parametri ecocardiografici e laboratoristici nell'individuazione precoce dei pazienti a rischio di sviluppare ipertensione arteriosa e danno d'organo a livello cardiaco, dati che di routine vengono richiesti in tutti pazienti oncologici trattati con farmaci potenzialmente cardiotossici.

I. OBIETTIVO PRIMARIO:

Studiare gli effetti del Bevacizumab sul microcircolo coronarico nell'ipotesi che i fenomeni di vasocostrizione e disfunzione endoteliale si esplichino anche a a questo livello determinando una riduzione della riserva coronarica nei distretti analizzati.

II. OBIETTIVO SECONDARIO:

- I. Valutare l'eventuale effetto ischemico diretto dei Farmaci anti-VEGF a livello cardiaco, globalmente attraverso lo studio della Frazione di Eiezione e dello *Strain* Ventricolare, nello specifico a livello dei miocardiociti tramite il dosaggio degli enzimi di necrosi (Troponina-T)
- II. Studiare gli effetti dei Farmaci anti-VEGF e dell'ipertensione da essi causata sulla funzionalità cardiaca diastolica, tramite valutazione dei parametri ecocardiografici 2D e dello *Strain* atriale.

Inoltre ci proponiamo di:

- Valutare il contributo relativo di ciascun parametro laboratoristico ed ecocardiografico analizzato nel predire il rischio di ipertensione arteriosa e danno d'organo a livello cardiaco
- Effettuare una sottoanalisi della popolazione in relazione al profilo di rischio cardiovascolare globale e alla terapia farmacologica in corso

MATERIALI E METODI:

I. POPOLAZIONE:

Reclutamento soggetti:

Sono stati arruolati 20 pazienti provenienti dall'U.O. di Clinica Oncologica dell'Ospedale San Gerardo, emodinamicamente stabili, candidati a chemioterapia con farmaco antiangiogenico. Tutti i soggetti ricevono e firmano un consenso informato scritto allo studio, autorizzato dal Comitato Etico dell'A.O.

Criteri di inclusione:

- Età compresa tra i 18 e gli 85 anni
- Espressione del consenso informato e scritto per l'esecuzione dello studio, l'uso dei propri dati personali non sensibili e prelievo di materiale biologico/ematico
- Indicazione a chemioterapia con Bevacizumab

Criteri di esclusione:

- Aspettativa di vita < 6 mesi
- Precedenti trattamenti chemoterapici cardiotossici
- Anamnesi positiva per cardiopatia ischemica
- Disturbi del ritmo al momento dell'arruolamento (fibrillazione atriale, extrasistolia sopraventricolare o ventricolare frequente, aritmie maggiori)
- Frazione di eiezione ventricolare sinistra < 50%
- Ipertensione arteriosa in scarso controllo farmacologico, ovvero PA > 150/90 mmHg o recente (< 1 mese) necessità di modifica della terapia antiipertensiva
- Proteinuria > 2mg nelle 24 ore.
- Storia di coagulopatia o attuale assunzione di terapia anticoagulante orale
- Broncopneumopatia severa (stadio Gold III-IV)

II. PROTOCOLLO

I pazienti candidati al trattamento con Bevacizumab sono stati sottoposti precedentemente all'inizio della chemioterapia a :

- Visita medica con raccolta del consenso informato, dei dati anamnestici e valutazione clinica con misurazione della pressione arteriosa ambulatoriale tramite tecnica sfigmomanometrica
- Elettrocardiogramma 12 derivazioni (ECG)
- Esami ematici per la definizione del profilo di rischio cardiovascolare (profilo lipidico, glicemia, filtrato glomerulare)
- Dosaggio dei *biomarkers* basali (TnT_{hs}, stick urine, proteinuria e microalbuminuria)
- Esame ecocardiografico transtoracico con metodica bidimensionale (2D) e con analisi *speckle tracking* per l'analisi della funzione diastolica ventricolare sinistra e studio dello *Strain* atriale e ventricolare
- Test di riserva coronarica con Ecotress Adenosina/Dipiridamolo con studio del flusso della coronaria discendente anteriore

Durante la terapia il paziente è stato seguito con un follow-up a cadenza bimensile, ovvero in corrispondenza del ciclo di terapia con Bevacizumab, in cui sono stati ripetuti i seguenti esami:

- Ecocardiogramma transtoracico con sonda 2D
- Ecotress Adenosina/Dipiridamolo con studio del flusso della coronaria discendente anteriore
- Dosaggio biomarkers (TnT_{hs}, stick urine, proteinuria microalbuminuria)

Per il protocollo riassuntivo vedi Appendice 2

III. PROCEDURE E MISURE

Consenso informato

Prima del reclutamento allo studio è stato ottenuto un consenso informato da ciascun soggetto in accordo con le raccomandazioni della *Dichiarazione di Helsinki*⁶¹, elaborato in accordo con i dettami e le regolamentazioni italiane in vigore, come indicato dal Comitato Etico di quest'Azienda Ospedaliera.

Visita medica

Durante la visita medica sono state ottenute le seguenti informazioni:

- valutazione dei criteri di inclusione/esclusione.
- luogo e data di nascita.
- peso corporeo, altezza, BMI (Kg/m²)
- familiarità per malattie cardiovascolari in particolare cardiopatia ischemica, cardiomiopatia dilatativa, ipertensione e diabete mellito
- abitudine al fumo di sigaretta, distinguendo i soggetti in non fumatori, fumatori ed ex fumatori; nel caso in cui il paziente riferisse di essere fumatore attivo, è stata anche indagata la quantità di sigarette fumate ogni giorno.
- abitudine al consumo di alcol; nel caso il paziente riferisse di consumare alcol, è stata anche indagata la quantità assunta/die.
- abitudine al consumo di caffè.
- storia di TIA o ictus, cardiopatia ischemica, diabete mellito, ipertensione arteriosa, dislipidemia.
- terapia medica in atto.
- esame obiettivo.
- misurazione della pressione arteriosa ottenuta con metodica sfigmomanometrica

Esami bioumorali

1. Urinari: Proteinuria e Microalbuminuria¹³³

Come già messo in evidenza in precedenza, la proteinuria asintomatica è uno degli effetti collaterali più frequenti degli agenti anti-VEGF, parzialmente correlata con l'ipertensione

Una valutazione quantitativa e qualitativa della proteinuria è importante per la diagnosi del danno renale. Urine contenenti una escrezione giornaliera di 30-300 mg riflettono una condizione di microalbuminuria, mentre se l'escrezione è superiore ai 300mg si definisce macroalbuminuria.

Esistono molteplici test qualitativi e quantitativi disponibili per la misurazione delle proteine urinarie.

Lo Stick Urine o l'esame urine standard è abbastanza sensibile per l'individuazione di albuminuria, ma non sensibile per la presenza di proteine differenti, individuabili invece con una raccolta urine delle 24 ore. La positività allo stick o esame urine (che si ottiene solo quando l'escrezione di proteine supera i 300 mg/die) solitamente riflette una proteinuria di origine glomerulare. Risultati falsi positivi possono essere ottenuti con urine concentrate o alcaline e con molti mezzi di contrasto iodati¹³⁴. Al contrario, falsi negativi possono essere causati da urina diluita o molto acida.

L'identificazione della microalbuminuria, e quindi del danno glomerulare precoce (tipico anche delle condizioni di ipertensione arteriosa e nefropatia diabetica) non è invece possibile tramite un semplice esame urine, ma richiede un dosaggio particolare con metodiche di immunodiffusione radiale o ELISA.

Nel nostro protocollo di studio, per l'identificazione della proteinuria si è deciso di utilizzare l'esame urine estemporaneo o stick urine e di associare il dosaggio della microalbuminuria (effettuata nel nostro laboratorio tramite metodo immunoturbidimetrico). Questa scelta è stata dettata dalla difficile gestione da parte di pazienti oncologici della complessità di una raccolta urinaria delle 24 ore, e dalla buona sensibilità dell'associazione dei due esami, che permettono una identificazione precoce del possibile danno a livello glomerulare causato dagli anti-VEGF.

Cut off Laboratorio Analisi Ospedale San Gerardo:

MICROALBUMINURIA < 20mg / l

PROTEINE URINARIE : assenti.

L'esame urine e il dosaggio della microalbuminuria sono stati effettuati prima dell'inizio della terapia con farmaci antiangiogenici, per conoscere la condizione basale del paziente. Successivamente sono stati ripetuti con cadenza bimensile, per rilevare l'eventuale sviluppo o modificazione di tali problematiche.

1. Ematochimici: Troponina-T e NT-ProBNP

La misurazione di biomarkers sierici rappresenta una strategia attraente per il monitoraggio della cardiotossicità, poichè si tratta di un metodo semplice, minimamente invasivo e soggetto a scarsa variabilità interindividuale per ciò che riguarda l'interpretazione.

In particolare la Troponina, nelle sue diverse isoforme, è un marker sierico che individua un danno alle miofibrille ed ai cardiomiociti, utile quindi nell'identificare una cardiotossicità acuta indotta da agenti terapeutici che causano morte cellulare¹³⁵..

Un approccio corretto all'utilizzo di questo strumento sarebbe di effettuare una valutazione basale in ogni paziente e una misura periodica durante ed al termine di un trattamento potenzialmente cardiotossico. L'aumento nelle concentrazioni di questi *markers* potrebbe essere il segnale di allarme che rende necessario ulteriori accertamenti cardiaci.

Proprio in quest'ottica nel nostro protocollo di studio abbiamo inserito il dosaggio del NT PRO BNP e della TROPONINA T prima di avviare il trattamento antiangiogenetico, e una periodica rivalutazione ogni 2 mesi. Il nostro proposito è quello di valutare se questi *biomarkers* possano dare un contributo nell'identificazione della cardiotossicità da anti-VEGF, nello specifico nell'identificare in modo precoce eventi ischemici a livello cardiaco.

Nel caso di questi due enzimi risulta difficile stabilire dei *range* di normalità. Appare più utile, come visto in precedenza, seguirne l'evoluzione nel tempo.

Cut Off Laboratorio Analisi Ospedale San Gerardo:

Troponina T < 14ng/l

NTproBNP < 300 pg/ml.

Elettrocardiogramma (ECG)

L'elettrocardiogramma è un metodo comodo ed economico per individuare la presenza di disturbi della conduzione e segni di cardiomiopatia, anche se non esistono ancora ampie evidenze per definire il ruolo di questa metodica nell'individuazione di cardiotossicità in ambito oncologico¹³⁶.

Nel nostro protocollo i pazienti sono stati sottoposti ad un elettrocardiogramma basale, prima dell'inizio della chemioterapia associata al farmaco antiangiogenetico, in modo da rilevare eventuali anomalie del ritmo o pregresse problematiche ischemiche. In seguito, in corrispondenza dei successivi controlli ecocardiografici ed ematochimici, quindi sempre con cadenza bimensile, l'ECG è stato ripetuto. E' stato così possibile analizzare le variazioni rispetto all'ECG basale, in particolare della lunghezza dell'intervallo QT corretto, considerando come valori normali quello compresi fra 0.30 e 0.44 secondi (0.45 per le donne).

Ecocardiografia

E' stato utilizzato l'ecocardiografo Vivid™ E9, GE Healthcare con Sonda bidimensionale multifrequenza a larga banda (M5S-D).

Esecuzione dell'esame:

1. Registrazione dell'eco basale bidimensionale standard secondo protocollo del nostro Laboratorio (vedi Appendice A) cui segue la registrazione di sezioni 2-3-4 camere apicali per l'analisi *ST imaging*. L'acquisizione è stata eseguita mediante *trigger-mode*, durante singolo ciclo cardiaco, invitando il paziente a mantenere l'apnea in fase di media espirazione per evitare eccessivi movimenti del cuore durante le fasi del respiro e cercando di mantenere, per quanto

possibile, un intervallo RR stabile. Il *frame* è stato mantenuto intorno ai 50 FPS. L'ampiezza del piano di scansione è stata ottimizzata così da permettere la completa visualizzazione del AS e da massimizzare il *frame rate*, regolando il guadagno così da meglio definire sia i bordi endocarditi che quelli epicardici. Sulle immagini bidimensionali registrate abbiamo esaminato:

- Studio del ventricolo sinistro

1. misure secondo la convenzione Penn delle dimensioni del ventricolo sinistro e degli spessori del setto interventricolare (SIV) e parete posteriore (PP) dalla sezione parasternale asse lungo in telediastole e telesistole
2. misure dei volumi telediastolico e telesistolico del ventricolo sinistro e calcolo della frazione di eiezione espressa come rapporto tra la gittata sistolica (differenza tra volume telediastolico e volume telesistolico) ed il volume telediastolico
3. valutazione della massa ventricolare (valore assoluto e indicizzata per BSA) secondo formula PENN:
$$\text{Massa} = 1.04 [(SIVd + PPd + VSd)^3 - VSd^3] - 13.6$$
4. calcolo del relative wall thickness (RWT) espresso come $SIVd + PPd / VSd$
5. identificazione del pattern geometrico ventricolare sinistro integrando i dati di RWT con il calcolo della massa distinguendo tra pattern normale, rimodellamento concentrico, ipertrofia concentrica ed ipertrofia eccentrica.

Studio dell'atrio sinistro:

1. Misura con modalità M-mode, dalla sezione parasternale asse lungo del diametro massimo dell'atrio sinistro (Fig. 10).

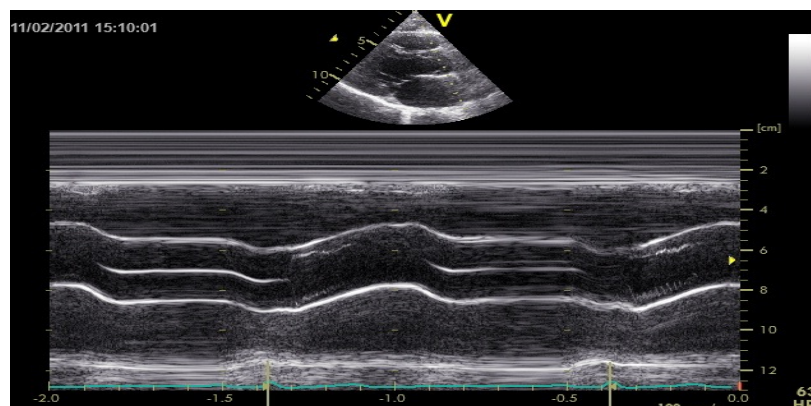


Figura 10: Diametro atriale sinistra misurato mediante ecocardiografia M-mode.

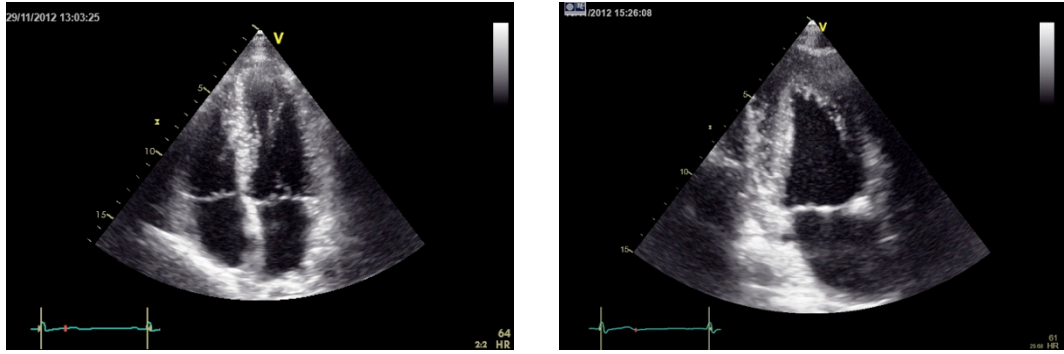


Figura 11: Volumetria atriale sinistra mediante ecocardiografia bidimensionale.

2. Misura dalla sezione apicale 4 camere e 2 camere dell'area atriale in diastole e calcolo del volume atriale (Fig. 11).

- Funzionalità cardiaca diastolica

1. Con modalità color-doppler pulsato si valuta il flusso transmitralico in corrispondenza dell'apertura della valvola mitrale e a livello delle vene polmonari.

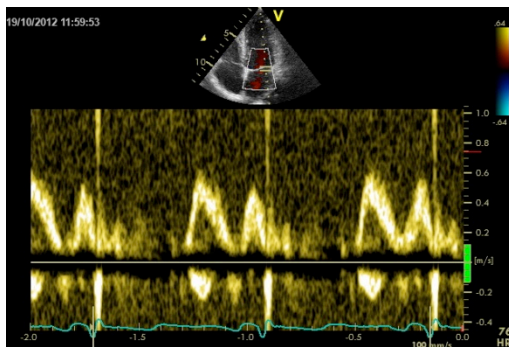


Figura 12: Pattern Doppler transmitralico diastolico.

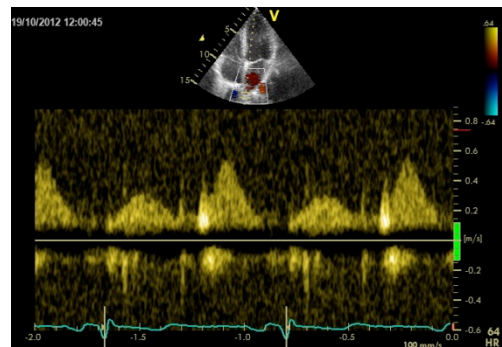
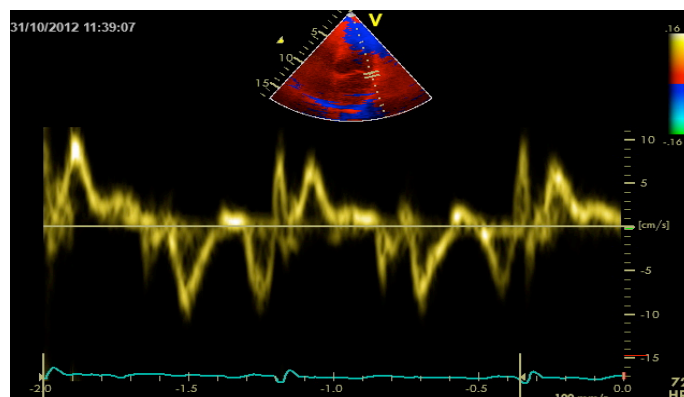
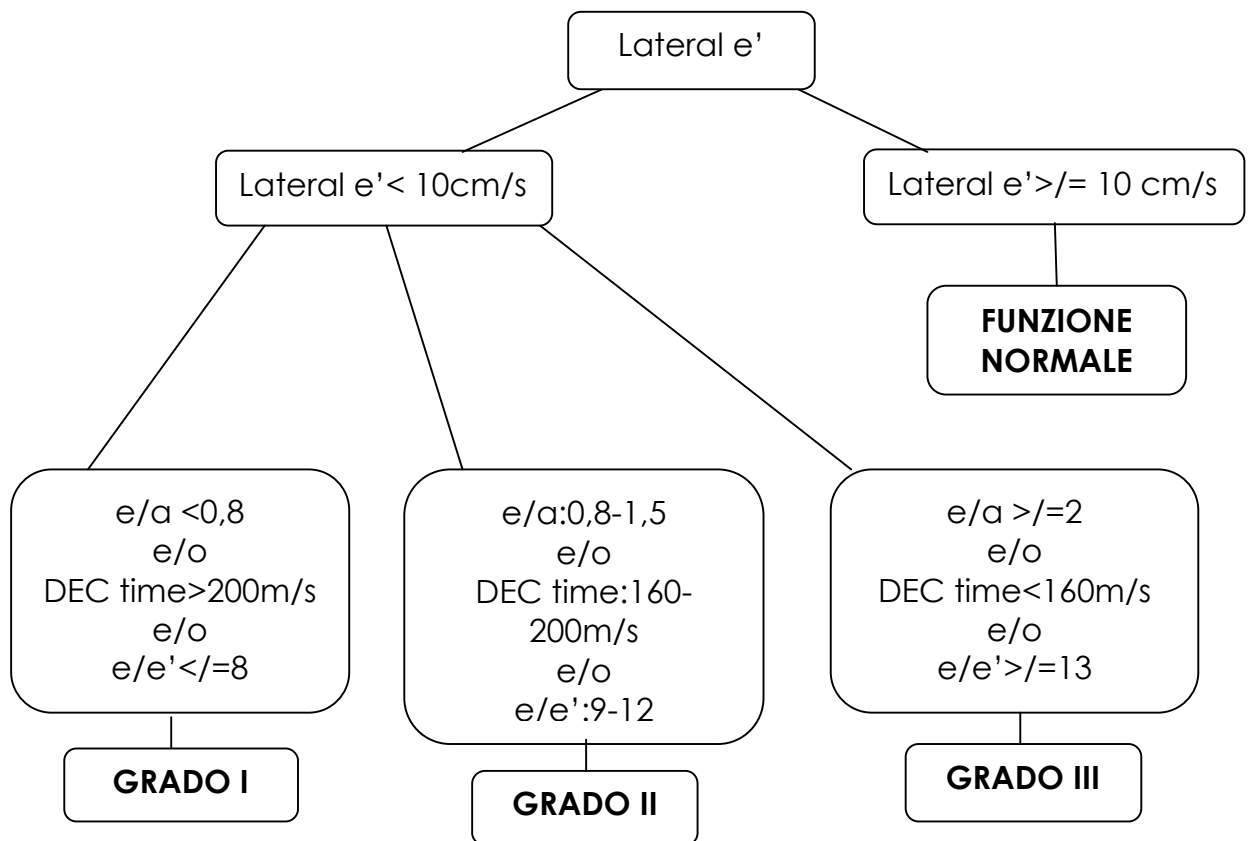


Figura 13: Flusso venoso polmonare.

2. Con modalità TVI si valuta l'anello mitralico laterale (Figura 14)



3. Dall'integrazione dei parametri PW, TVI e area dell'atrio sinistro si può derivare un livello di disfunzione diastolica come indicato nello schema seguente.



2. Analisi speckle tracking durante post-processing utilizzando il software automatizzato EchoPAC PC (versione 110.1.2, GE Healthcare)

- Analisi 2D: traccia del bordo endocardico tramite un approccio *point-and-click* su ciascuna sezione con la generazione automatica di una primo perimetro endocardio e di una seconda traccia a livello epicardico, con la possibilità di ottimizzazione manuale. Divisione automatica di ogni sezione bidimensionale in 6 segmenti. Generazione delle curve di *strain* per ciascuno segmento presentate secondo codice colore sia a livello dell'immagine bidimensionale, individuando l'ispessimento/accorciamento miocardico con codice arancio e il rilasciamento/allungamento con codice blu, che in rappresentazione grafica.
- L'analisi dei valori di *strain* ventricolare globale consente una stima affidabile della funzionalità ventricolare sistolica, permettendo una precoce

identificazione di un eventuale danno ischemico. Come limite inferiore di normalità abbiamo considerato il valore di 18¹³⁷.

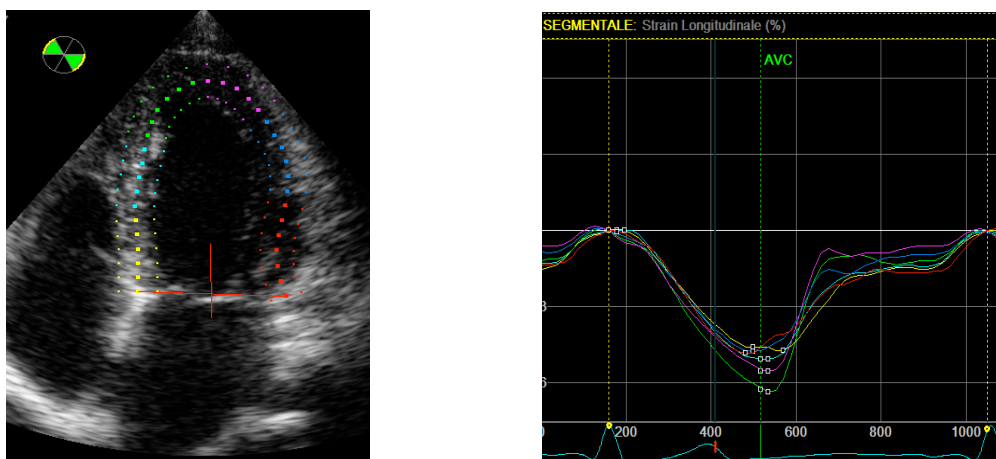


Figura 15: Strain ventricolare dalla sezione 4 e 2 camere apicale

- L'analisi dei valori di strain atriale globale consente invece una stima della funzionalità diastolica, individuando precocemente alterazioni a tale livello. In questo caso, come limite inferiore di normalità abbiamo considerato il valore di 32¹³⁸

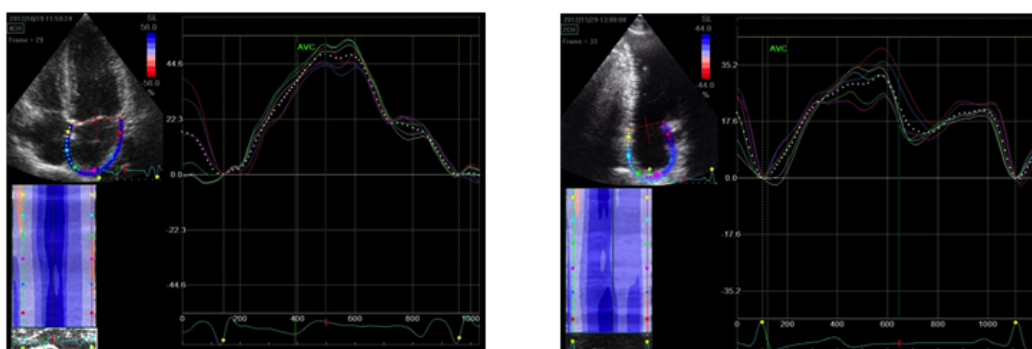


Figura 16: Strain atriale dalla sezione 4 e 2 camere apicale

3. Studio Riserva Coronarica

- Visualizzazione del segnale color della coronaria discendente anteriore a livello del solco interventricolare anteriore tramite una sezione 2 camere modificata, ottenibile con uno slittamento superiore, solitamente di uno spazio intercostale, e mediale della sonda transtoracica, che viene leggermente ruotata in senso antiorario e angolata medialmente.

- Acquisizione mediante doppler pulsato del flusso coronarico basale

Data la posizione superficiale dell'IVA vengono utilizzati trasduttori ad elevata frequenza con minor potere di penetrazione e quindi una migliore risoluzione

spaziale. La regolazione dell'ecocardiografo deve rispettare alcune modalità: l'utilizzo di una bassa frequenza di ripetizione degli impulsi del color Doppler (PRF 11-25), dimensione del gate aumentate al massimo, potenza di emissione del colore al massimo livello, guadagno aumentato fino a che il rumore diventa debole, dimensione variabile del volume campione del doppler pulsato ma > 2 mm, per superare i possibili motivi di registrazioni qualitativamente inadeguate in caso di iperventilazione indotta da dipiridamolo/adenosina.

La migliore registrazione della velocità di flusso coronarico avviene sotto la guida del segnale color: il posizionamento del volume campione del Doppler pulsato nel vaso si effettua riferendosi alla diastole dell'ECG, quando l'immagine dell'IVA è più stabile; viene così registrato un flusso continuo con una componente sistolica (meno ampia) ed una diastolica (più ampia), prima a riposo e poi dopo iperemia. E' fondamentale che l'angolo doppler sia mantenuto costante per tutta la durata dello studio e sempre inferiore a 45°. Gli agenti di contrasto possono essere utilizzati per migliorare il segnale doppler qualora l'immagine non sia adeguata. In questo caso è importante ridurre leggermente la potenza ed il guadagno del color-doppler ed aumentare lievemente la PFR per evitare una eccessiva "ridondanza" al color.

Il mezzo di contrasto utilizzato sarà SonoVue (Bracco, Milano, Italia), agente costituito da microbolle di esafluoruro di zolfo incapsulato in gusci fosfolipidico iniettato in singolo bolo di 0,5 ml¹³⁹.

- Infusione di vasodilatatore (Dipiridamolo 0,84 mg/Kg/min per massimo 6 minuti o Adenosina 0,14 mg/Kg in infusione per max 4 minuti) con monitoraggio Doppler continuo del flusso coronarico a livello della coronaria discendente anteriore
- In condizioni di riposo e al picco di infusione del vasodilatatore registrati PA ed ECG a 12 derivazioni
- Criteri di interruzione del test sono lo sviluppo effetti collaterali che non rendano di un'anomala risposta pressoria con PA >220/110 mmHg, un repentino calo pressorio \geq 40 mmHg, comparsa di anomalie del ritmo minacciose o limitanti la successiva interpretazione del test (tra queste ultime la fibrillazione atriale, bigeminismo ventricolare fisso, aritmie ventricolari maggiori).
- In fase di recupero, se utilizzato dipiridamolo, viene infusa Aminofillina (120 mg ev in 1', fino a 240 mg ev in 2') indipendentemente dal risultato del test.

Un *cut off* sotto stimolo iperemico di 2 della RFC è stato dimostrato predittivo di stenosi coronarica emodinamicamente significativa in numerosi studi. Una ridotta RFC non risulta specifico per coronaropatia epicardica ma può anche essere espressione di patologia del microcircolo. Non esiste un valore di *cut-off* per la disfunzione del microcircolo

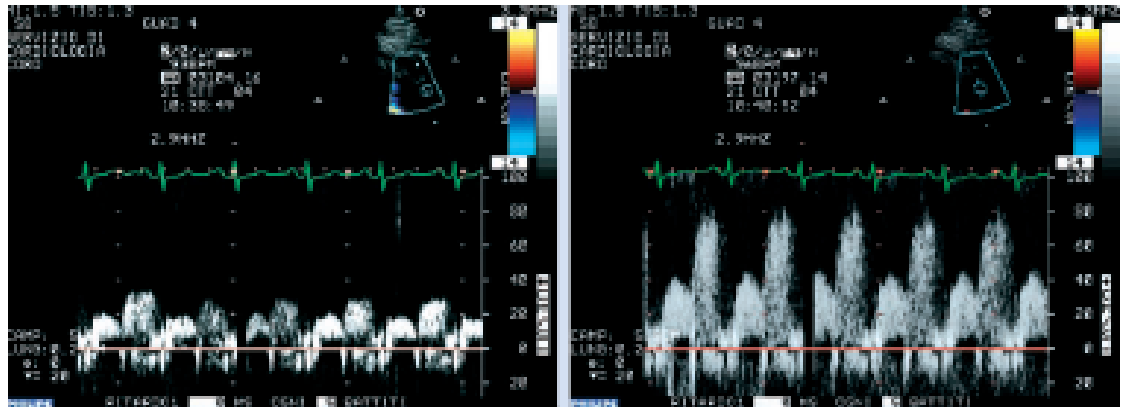


Figura 17-18: Doppler pulsate su IVA basale e dopo stimolo iperemico

Follow up

Raccolti tutti i parametri sinteticamente descritti nel protocollo sintetico- flow chart (vedi Appendice 2) il paziente continuerà ad essere seguito presso l'unità di Clinica Oncologica.

ANALISI DEI DATI

Il numero di pazienti ipotizzati è coerente con la relativa rarità di pazienti con le caratteristiche specifiche indicate, previamente testata sulla popolazione afferente all'Unità Operativa di Clinica Oncologica del nostro Ospedale. Inoltre gli elevati costi della terapia con antiangiogenetici e la ristrettezza delle indicazioni in letteratura limitano fortemente la numerosità della popolazione.

Per quanto concerne l'analisi descrittiva, tutte le variabili categoriche sono state espresse in termini di frequenze assolute e percentuali delle diverse classi.

Le variabili continue, invece, sono state previamente testate con il test di Kolmogorov-Smirnov, al fine di verificarne la distribuzione normale.

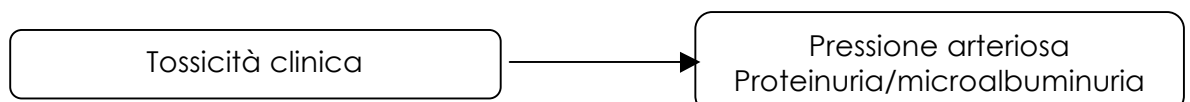
Nel caso di distribuzione normale le abbiamo mediate ed analizzate ottenendo medie, mediane, *standard deviation*, *standard error* e intervalli di confidenza per ciascuna di esse. Nel caso di distribuzione non normale è stata calcolata la mediana e l'intervallo interquartile.

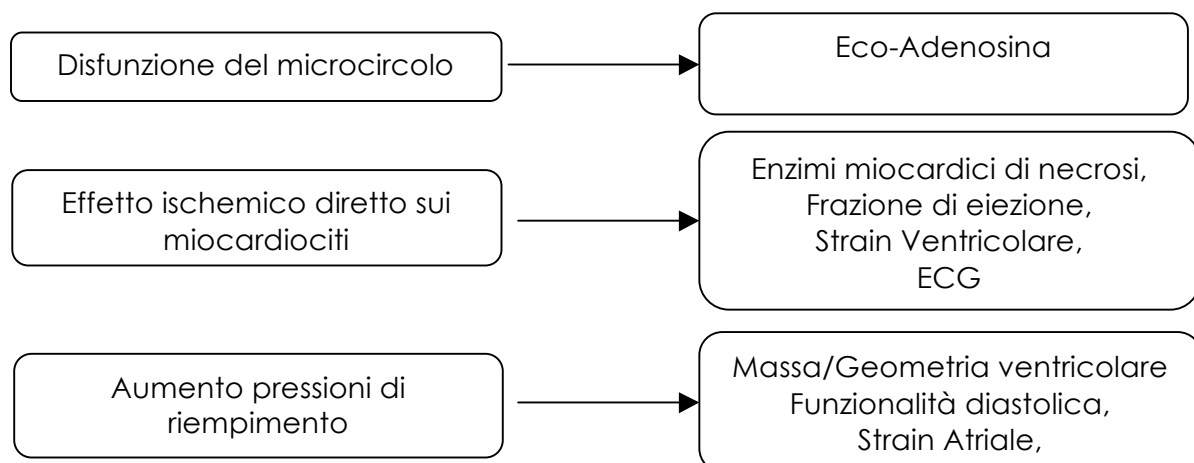
Abbiamo poi diviso la nostra popolazione in due gruppi secondo l'evidenza clinica di tossicità farmacologica.

Per il confronto delle variabili continue nei due gruppi abbiamo utilizzato il test T di Student per dati non appaiati, considerando come significatività statistica un valore di $p < 0.05$. Le variabili categoriche sono state invece analizzate con l'uso del X^2 test.

All'interno del singolo gruppo abbiamo inoltre confrontato le variabili continue pre e post terapia usando il test T di Student per dati appaiati, considerando come significatività statistica un valore di $p < 0.05$. Anche in questo caso le variabili categoriche sono state analizzate con l'uso del X^2 test.

Per effettuare un'analisi descrittiva sistematica dei dati raccolti e verificare eventuali rapporti causali con i parametri clinici, li abbiamo suddivisi secondo i tre meccanismi di tossicità diretta e indiretta che lo studio si prefigge di studiare.





Al fine di verificare il rapporto causale tra gli indicatori di tossicità (clinici, variabili indipendenti) e i parametri in esame (ecocardiografici e laboratoristici, variabili dipendenti) costruiremo dei modelli di regressione lineare univariata per poter calcolare il coefficiente di correlazione parametrica di Pearson (r) o il coefficiente di correlazione non parametrica di Spearman (p), in dipendenza della distribuzione dei parametri in oggetto. Sono stati considerati significativi valori di r diversi da zero. Le analisi di correlazione sono state in ogni caso aggiustate per i parametri noti per esercitare una influenza importante sulla pressione arteriosa, ovvero i dati antropometrici, la presenza di fattori di rischio cardiovascolari e l'eventuale terapia farmacologica in corso.

Per quanto riguarda l'*end point* secondario di valutazione della predittività di ciascun parametro laboratoristico ed ecocardiografico nella valutazione del rischio di sviluppo di ipertensione arteriosa e di danno d'organo a livello cardiaco, stante la ridotta numerosità campionaria non abbiamo ritenuto opportuno eseguire analisi di sensibilità e la specificità con il confronto delle "aree sotto le curve" (Area Under the Curve) delle curve ROC (*Receiver Operating Characteristics*), che ci avrebbero dato risultati di scarso significato clinico.

Occorre precisare però che, in considerazione dell'esiguo numero attuale dei pazienti, tali valori sono meramente indicativi e ci permettono di fare solo delle analisi preliminari sui dati al momento disponibili.

RISULTATI

IV. CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE

Da Gennaio 2012 a Giugno 2013 abbiamo arruolato 20 pazienti candidati a terapia anti-VEGF come I – IV linea di K metastatico.

La nostra popolazione era composta da 11 donne e 9 uomini di età compresa tra i 48 e gli 80 anni (62 ± 10 anni).

Di questi 7 sono affetti da carcinoma colon-rettale metastatico, 7 da carcinoma mammario metastatico, 1 da carcinoma polmonare metastatico, 5 da carcinoma renale metastatico. La localizzazione della neoplasia primitiva è quindi diversa, ma in comune tutti hanno la presenza di secondarismi (come da linea guida).

I pazienti arruolati sono stati sottoposti a una media di 6 ± 4 cicli di terapia col farmaco e successivi 12 ± 3 cicli di mantenimento per un massimo di 14 mesi continuativi (media $5 \pm 4,02$ mesi, mediana 3,5 mesi). I pazienti affetti da neoplasia renale sono stati sottoposti a terapia con Pazopamib (800 mg/die) e Sunitinib (50 mg/die). La restante parte della popolazione è stata trattata con Bevacizumab (5-10 mg/Kg).

Tabella III: Stadiazione e schema di terapia

K	Stadio	T	N	M	Grading	F. anti-VEGF	Dose F. anti-VEGF
Mammella	I	2	0	0		Bevacizumab	10mg/Kg
Mammella	IIIC	1c	3a (14/16)	0		Bevacizumab	10mg/Kg
Mammella	IIA	1c	1 (1/15)	0		Bevacizumab	10mg/Kg
Mammella	I	2	0	0	G3	Bevacizumab	10mg/Kg
Mammella		2	1b(1/15)	0	G3	Bevacizumab	10mg/Kg
Mammella	I	2	0	0	G3	Bevacizumab	10mg/Kg
Retto	I	2	0	0	G2	Bevacizumab	5mg/Kg
Retto,	IIIB	3	1	0	G2	Bevacizumab	7,5mg/Kg
Colon	IVB	4a	0	1b	G2	Bevacizumab	7,5mg/Kg
Colon	I	2	0	0	G2	Bevacizumab	5mg/Kg
Colon	IVB	3	2b(7/13)	1b	G2	Bevacizumab	7,5mg/Kg
Colon	IV	Ca in sede		1		Bevacizumab	7,5mg/Kg
Rene	IV		0	1		Pazopanib	800mg/die
Rene	IV	1b	x	1	G2	Pazopanib	800mg/die
Rene	IV	3a	1	1	G3	Pazopanib	800mg/die
Rene	IV	3a	1	1	G3	Sunitinib	50mg/die
Rene	IV	3a	0	0	G2	Sunitinib	50mg/die
Polmone	IV	4	3	1b		Bevacizumab	7,5mg/Kg

Dei 20 pazienti solo 6 (30%) sono ancora in terapia di mantenimento per evidente miglioramento del quadro oncologico, 2 (10%) l'hanno sospesa per riduzione della massa tumorale alle indagini di *imaging* che ha permesso di avviarli a terapia chirurgica, 1(5%) è andato incontro a dissecazione acuta dell'aorta addominale (controindicazione maggiore a terapia con farmaci anti-VEGF), la restante parte (11 pazienti, pari al 55%) ha sospeso la terapia per progressione di malattia.

Le caratteristiche antropometriche della popolazione in esame sono elencate in tabella.

VARIABILE	POPOLAZIONE
Numero	20
Sesso (M/F)	9/11
Età (aa)	62 ± 10
Altezza (cm)	164 ± 9
Peso (kg)	66 ± 12
BSA (m ²)	1,72 ± 0,20
BMI (Kg/m ²)	24 ± 3

Durante la visita di arruolamento è stata eseguita un'attenta anamnesi riguardante i fattori di rischio cardiovascolare e i pazienti sono stati sottoposti a prelievi ematici basali atti alla valutazione del profilo di rischio cardiovascolare globale (GRS, sec LG 2013 ESH/ESC *Guidelines for the management of arterial hypertension*).

Alla luce di questa analisi la nostra popolazione si presentava con profili di rischio cardiovascolare globale medio basso (GRS 1,4 ± 1,3).

Di questi solo 7 erano affetti da ipertensione arteriosa, peraltro in buon controllo farmacologico, stando ai valori di PAS/PAD basale che si mantenevano nei limiti di norma (rispettivamente range 130-100, media 124 ± 10 mmHg per la PAS e range 60-90, media 76 ± 7 mmHg per la PAD). Tra questi 4 pazienti presentavano ipertensione arteriosa isolata, ma nella maggioranza dei casi (3/4) già determinante danno d'organo cardiaco. Gli altri pazienti associavano all'ipertensione arteriosa 1 o più fattori di rischio cardiovascolare aggiuntivi. In

particolare 2 pazienti presentavano ipercolesterolemia e diabete di tipo 2 in trattamento con statine e antidiabetici orali con buon controllo glicometabolico, 1 paziente associava il solo diabete mellito di tipo 2 in scarso controllo glicometabolico. A fronte di un peggiore profilo di rischio CV globale questi pazienti presentavano una prevalenza di pattern geometrico normale (2/3), con assenza di danno d'organo cardiaco, probabilmente a motivo di una terapia farmacologica più aggressiva.

Un unico paziente presentava ipercolesterolemia isolata nota in trattamento con statine, mentre agli esami ematochimici basali ben in 6 pazienti si sono rivelati elevati valori di colesterolemia basale (> 200 mg/dl, range 204-256 mg/dl, media 230 ± 20 mg/dl). Questi erano anche i pazienti in cui era presente maggior coinvolgimento cardiaco con pattern geometrici di rimodellamento concentrico e ipertrofia concentrica, a fronte di valori pressori basali normali.

Un totale di 8 pazienti presentava valori di BMI > 25 Kg/m² indicativi di lieve sovrappeso (range 25,9-30,7, media $27,3 \pm 1,7$ Kg/m²).

Un solo paziente era fumatore attivo (60 pack/year da 50 anni), mentre 2 pazienti avevano anamnesi di tabagismo pregresso con interruzione dell'abitudine al fumo da > 5 anni.

Infine, per quanto riguarda gli indicatori di danno d'organo a livello renale, tutti i pazienti presentavano valori di Creatininemia normale. Alla valutazione della Velocità di Filtrazione Glomerulare calcolato secondo la formula di Cockcroft-Gault il valore medio globale si presentava normale (VFG, rispettivamente range media 0,6-1,1 mg/dl, media $0,8 \pm 0,2$ mg/dl e range 44-109 ml/min, media 76 ± 18 ml/min) con una lieve riduzione (30 ml/min $<$ VFG $<$ 60 ml/min, range 47-44ml-min, IRC stadio 3) solo nei pazienti affetti da neoplasia renale.

VARIABILE	POPOLAZIONE
PAS (mmHg)	124 ± 10
PAD (mmHg)	76 ± 7
BMI (Kg/m ²)	24 ± 3
Glicemia (mg/dl)	101 ± 20
Colesterolemia (mg/dl)	196 ± 35
VFG (ml/min)	76 ± 18
GRS	$1,4 \pm 1,3$

V. VALUTAZIONE TOSSICITA' FARMACOLOGICA

All'interno della nostra popolazione 10 pazienti (50%) hanno sviluppato effetti collaterali attribuibili al farmaco

Nello specifico, dopo l'inizio di terapia, è stata rilevata, in 6 pazienti (30%), ipertensione isolata e, in 4 pazienti (20%), ipertensione arteriosa lieve moderata e proteinuria. Non si sono avuti casi di ipertensione severa e insufficienza renale acuta tali da dover sospendere la terapia oncologica. È da notarsi che solo uno dei pazienti che ha sviluppato proteinuria de novo era affetto da neoplasia metastatica renale.

Nelle successive analisi dei dati abbiamo dunque diviso la nostra popolazione in due gruppi: un primo gruppo di pazienti (che chiameremo Gruppo A) con evidenza di tossicità del farmaco (10 pazienti, 50% popolazione) e un secondo gruppo (che chiameremo Gruppo B) composto dai pazienti in cui non è stata rivelata tossicità farmacologica (10 pazienti, 50% popolazione).

Siamo dunque andati a confrontare le caratteristiche antropometriche e il profilo di rischio cardiovascolare globale della nostra popolazione alla valutazione basale come mostrato in tabella.

VARIABILE	GRUPPO A	GRUPPO B	p-value
Numero (%)	10 (50)	10(50)	
Sesso (M/F)	4/6	5/5	
Età (aa)	63 ± 12	62 ± 8	0,84
Altezza (cm)	162 ± 10	167 ± 8	0,29
Peso (kg)	64 ± 13	66 ± 12	0,73
BSA (m ²)	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,2	0,58
BMI (Kg/m ²)	24,4 ± 3,9	23,7 ± 2,6	0,66
PAS (mmHg)	125 ± 7	120 ± 11	0,28
PAD (mmHg)	79 ± 6	74 ± 7	0,14
Glicemia (mg/dl)	98 ± 9	106 ± 29	0,43
Colesterolemia (mg/dl)	187 ± 34	206 ± 37	0,28
VFG (ml/min)	77 ± 18	75 ± 19	0,86
GRS	1,2 ± 1,3	1,8 ± 0,9	0,29

Da questa analisi abbiamo rilevato che le popolazioni risultano simili per quanto riguarda le caratteristiche antropometriche e i maggiori determinanti il profilo di rischio cardiovascolare globale, non avendo rilevato differenze statisticamente significative tra i due campioni. Da rilevare è che le maggiori differenze, pur non raggiungendo i limiti di significatività, si rilevavano nei valori di PAS e PAD basale con una lieve prevalenza dei valori pressori basali nei soggetti che svilupperanno poi tossicità farmacologica.

Pressione arteriosa

Di seguito riportiamo i dati relativi ai valori pressori medi (pressione arteriosa sistolica-PAS e pressione arteriosa diastolica-PAD) nelle due popolazioni (vedi Tabella IV-V).

Tabella IV

PAS (mmHg)	GRUPPO A	GRUPPO B	p-value
Pre-CT	125±6,99	120±10,69	0,156
Post-CT	145±13,54	129±8,66	0,003
differenziale	19,00	6,7	
p-value	0,001	0,150	

Tabella V

PAD (mmHg)	GRUPPO A	GRUPPO B	p-value
Pre-CT	79±6,00	74±7,265	0,186
Post-CT	82±6,79	76±3,63	0,023
differenziale	3,07	10,6	
p-value	0,165	0,433	

Risulta evidente che nella popolazione di soggetti che vanno incontro a ipertensione vi è una differenza statisticamente significativa tra i valori di pressione arteriosa sistolica Pre-CT e Post-CT (p-value: 0,001) così come si rileva una differenza statisticamente significativa nei valori di PAS postCT tra i due gruppi (p-value: 0,003).

Per quanto riguarda i valori di pressione arteriosa diastolica invece non vi è un incremento significativo pre-Post-CT in entrambi i gruppi nonostante alle rilevazioni Post-CT si dimostri una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi (p-value: 0,023).

Proteinuria

Di seguito riportiamo i dati relativi ai valori di proteinuria nelle due popolazioni (vedi *Tabella VI*).

Tabella VI

Proteinuria mg/l	GRUPPO A	GRUPPO B	p-value
Pre-CT	7,75±9,02	4,21±2,72	0,264
Post-CT	102,59±193,04	9,51±8,70	0,161
differenziale	94,84	4,22	
p-value	0,156	0,143	

Come è evidente non vi sono differenze statisticamente significative fra i valori medi delle due popolazioni, nonostante nel Gruppo A abbiamo rilevato una maggior percentuale di sviluppo di proteinuria (4/10 vs 1/10 nel Gruppo B). Inoltre solo uno dei pazienti che hanno sviluppato proteinuria significativa era affetto da carcinoma renale.

VI. ANALISI DESCRITTIVA

Disfunzione del microcircolo

Come detto per valutare l'azione del farmaco a livello del microcircolo abbiamo utilizzato come indicatore di disfunzione endoteliale la riserva coronarica (RFC) dopo stimolo farmacologico con Adenosina a livello del territorio dell'arteria interventricolare anteriore

I valori di RFC misurati durante tutto lo studio sono sempre stati superiori al cut-off di 2,0 noto indicatore di ridotta riserva coronarica, dimostrando una non significativa riduzione della reattività del microcircolo coronarico durante la terapia farmacologica.

I valori di RFC basali (Pre-CT) e dopo l'inizio della terapia antiangiogenetica (Post-CT) non erano statisticamente differenti tra le due popolazioni (p-value RFC preCT : 0,78 vs RFC Post-CT: 0,37).

In entrambi i gruppi abbiamo rilevato un lieve aumento dei valori di RFC fra le misurazioni basali e quelle dopo l'inizio della terapia (RFC differenziale media

Gruppo A 0,25 vs gruppo B 0,51) che si è dimostrato statisticamente significativo solo nel Gruppo B (p value Gruppo A 0,25 vs Gruppo B 0,03) verosimilmente attribuibile a una maggior reattività del microcircolo coronarico nei soggetti che non sono andati incontro a effetti collaterali farmacologici endotelio mediati (vedi *Tabella VII*)

Tabella VII

RFC	GRUPPO A	GRUPPO B	p-value
Pre-CT	2,29 ± 0,41	2,44 ± 0,62	0,78
Post-CT	2,77 ± 0,55	2,87 ± 0,44	0,37
differenziale	0,25	0,51	
p-value	0,25	0,03	

Effetto ischemico diretto sui cardiomiociti

Per valutare eventuali effetti ischemici diretti dei farmaci antiangiogenetici a livello del miocardio siamo andati a valutare differenti parametri ematochimici e strumentali, quali:

- Markers enzimatici di miocardiocitolisi quali la Troponina T ultrasensibile (TnT_{hs}) e il Peptide natriuretico cerebrale (NTproBNP) misurati in basale e nelle ore immediatamente successive la somministrazione del farmaco chemioterapico;
- La frazione di eiezione ventricolare sinistra (FEVS) e il *global longitudinal strain* ventricolare sinistro (GLS);
- La misurazione dell'intervallo QT e QTcorretto (QTc) all'ECG a riposo.

Per quanto riguarda questi indicatori non abbiamo rilevato delle differenze statisticamente significative tra i due gruppi e tra le analisi basali e dopo l'inizio della terapia farmacologica.

In particolare tutti i valori ematochimici indicativi di miocardiocitolisi e congestione cardiaca si sono mantenuti al di sotto dei limiti di norma e non abbiamo assistito a movimento dei *markers* miocardici nelle ore immediatamente successive alla somministrazione del farmaco né dei fattori biumorali di scompenso cardiaco nelle settimane successive alla terapia oncologica (vedi *Tabella VIII*).

Tabella VIII

TnThs (ng/ml)	GRUPPO A	GRUPPO B	p-value
Pre-CT	6,28±3,77	9,33±8,55	0,427
Post-CT	9,95±6,18	5,8±6,2	0,260
differenziale	4,22	4,22	
p-value	0,062	0,407	

A livello ecocardiografico nessun paziente ha sviluppato disfunzione sistolica, mantenendo sempre i valori di frazione di eiezione oltre i limiti di norma, né si sono evidenziate riduzioni significative del GLS ventricolare sinistro (vedi *Tabella IX e X*)

Tabella IX

FEVS (%)	GRUPPO A	GRUPPO B	p-value
Pre-CT	62,3±3,47	62,33±3,81	0,984
Post-CT	61,68±2,45	62,77±2,48	0,352
differenziale	-0,62	0,44	
p-value	0,454	0,686	

Tabella X

GLS(%)	GRUPPO A	GRUPPO B	p-value
Pre-CT	18,23±1,53	17,91±3,24	0,745
Post-CT	17,55±1,42	17,53±2,93	0,857
differenziale	-0,68	1,50	
p-value	0,171	0,230	

Analogamente anche le analisi del QT/QTc non hanno evidenziato differenze significative tra le misurazioni pre-Post-CT e tra i due gruppi.

Aumento delle pressioni di riempimento

Come noto l'aumento della pressione arteriosa esercita i suoi effetti anche a livello della cavità e delle pareti cardiache determinando lo sviluppo di danno d'organo.

Nelle nostre popolazioni siamo andati a valutare i parametri noti indicatori di danno cardiaco subclinico secondario alle elevate pressioni di riempimento quali:

- l'aumento della massa e la modifica della geometria ventricolare sinistra con lo sviluppo di ipertrofia cardiaca
- l'alterazione della funzione diastolica secondo vari gradi di disfunzione diastolica
- l'alterazione delle proprietà di deformazione atriale, ovvero dello strain atriale.

1. STUDIO E QUANTIFICAZIONE DEL VENTRICOLO SINISTRO

Per valutare il ventricolo sinistro abbiamo eseguito le misurazioni del setto interventricolare, dello spessore della parete posteriore e del diametro telediastolico ventricolare sinistro con il calcolo del valore della massa ventricolare sinistra, utilizzando come valori soglia di ipertrofia ventricolare sinistra il cut-off di 125 g/m² per gli uomini e di 110 g/m² per le donne.

La nostra popolazione aveva valori medi di massa ventricolare sinistra simile alle misurazioni basali (Gruppo A vs Gruppo B: 87,59±30,39 vs 92,35±26,48, p 0,719) e dopo terapia non si sono rilevate cambiamenti statisticamente significativi rispetto al basale in entrambi i gruppi(vedi *Tabella XI*).

Tabella XI

Massa (g/m²)	GRUPPO A	GRUPPO B	p-value
Pre-CT	87,59±30,39	92,35±26,48	0,719
Post-CT	81,48±33,72	83,25±14,27	0,880
differenziale	-6,10	-6,26	
p-value	0,503	0,294	

Peraltro, pur in assenza di differenze statistiche, abbiamo rilevato maggiori valori di massa ventricolare sinistra nella popolazione di soggetti normotesi post CT vs la popolazione dei soggetti ipertesi post CT forse a motivo della relativa prevalenza di soggetti maschi. Tuttavia l'esiguità del campione non ci permette di fare ulteriori analisi in proposito.

Inoltre non è stato possibile dimostrare un comportamento ripetibile nelle modifiche di geometria ventricolare ai controlli successivi al basale.

2. STUDIO E QUANTIFICAZIONE DELLA DIASTOLE

La funzione diastolica è stata valutata secondo l'algoritmo presentato.

Tutti i pazienti hanno mostrato pattern diastolici indicativi di normali pressioni di riempimento sia alle misurazioni basali che dopo terapia, in assenza di differenze statisticamente significative tra i due gruppi. Infatti i valori di E/e' si sono sempre mantenuti al di sotto del cut off di 15 che individua i pattern diastolici indicativi di incremento delle pressioni di riempimento atriali sinistre. Tuttavia si è dimostrato un relativo decremento nei valori di e' tra la misurazione basale e i controlli, analogamente a quanto avviene nell'evoluzione della disfunzione diastolica, che però non raggiunge criteri di significatività.

Tabella XII

E/e'	GRUPPO A	GRUPPO B	p-value
Pre-CT	6,23±1,94	6,40±2,89	0,887
Post-CT	5,92±2,31	6,62±2,07	0,858
differenziale	-0,54	-0,58	
p-value	0,306	0,519	

Tabella XIII

e'(m/s)	GRUPPO A	GRUPPO B	p-value
Pre-CT	0,16±0,10	0,13±0,07	0,656
Post-CT	0,10±0,02	0,08±0,03	0,590
differenziale	-0,05	-0,03	
p-value	0,255	0,194	

Così come precedentemente detto per la geometria ventricolare sinistra non è stato possibile dimostrare un comportamento ripetibile nei cambiamenti della funzione diastolica ai controlli successivi al basale.

3. STUDIO E QUANTIFICAZIONE DELL'ATRIO SINISTRO

L'atrio sinistro è stato valutato nei suoi parametri morfostrutturali e funzionali, misurando i diametri dell'atrio sinistro, le aree e i volumi.

Considerando il dato morfo-strutturale da una prima analisi risulta che in entrambi i gruppi, i volumi dell'atrio sinistro, sia in valore assoluto che indicizzati per BSA, sono pressoché uguali e non vi è alcuna differenza statisticamente significativa: ciò ad indicare che consideriamo dei soggetti che non presentano alterazioni nella geometria atriale sinistra, analogamente a quanto rilevato per la geometria ventricolare sinistra.

Tabella XIV

VolAS(ml/m2)	GRUPPO A	GRUPPO B	p-value
Pre-CT	22,75±5,95	20,19±7,37	0,439
Post-CT	20,26±5,03	19,68±5,24	0,820
differenziale	-2,49	0,01	
p-value	0,090	0,878	

Le misurazioni di *strain* atriale sono state eseguite in sezione 4 camere apicale che 2 camere apicale con un lieve incremento del valore medio quando si consideri la sezione 2 camere, fenomeno verosimilmente attribuibile a minor accuratezza nel delineare il bordo endocardico nel punto di sbocco delle vene polmonari con maggiore possibilità di artefatti in tale sede. E' stato poi calcolato il picco di *Global Longitudinal Strain* (PALS) mediando i valori rilevati in sezione 4 camere e 2 camere apicale.

Non vi è differenza statisticamente significativa nei valori di PALS nei due gruppi, ipertesi e normotesi post-CT, sia all'analisi basale che ai controlli post terapia (p-value Gruppo A vs Gruppo B: 0,452 vs 0,415).

Mentre, nel Gruppo A, si evidenzia una riduzione dei valori di PALS ai controlli Post-CT rispetto ai valori basali che supera i limiti di significatività (PALS Pre-CT vs Post-CT: 34,54±6,12 vs 28,97±5,95; differenziale: -5,57; p-value: 0,042) a differenza di quanto rilevato nel Gruppo B (PALS Pre-CT vs Post-CT: 31,28±11,85 vs 31,12±9,68; differenziale: 0,84; p-value: 0,935).

Tabella XV

PALS(%)	GRUPPO A	GRUPPO B	p-value
Pre-CT	34,54±6,12	31,28±11,85	0,452
Post-CT	28,97±5,95	31,12±9,68	0,415
differenziale	-5,57	0,84	
p-value	0,042	0,935	

VII. ANALISI DI CORRELAZIONE

Abbiamo eseguito infine le analisi di correlazione dei nostri dati per verificare il rapporto causale tra gli indicatori di tossicità (clinici, variabili indipendenti) e i parametri in esame (ecocardiografici e laboratoristici, variabili dipendenti) costruendo modelli di regressione lineare univariata per poter calcolare il coefficiente di correlazione parametrica di Pearson (r) o il coefficiente di

correlazione non parametrica di Spearman (ρ), in dipendenza della distribuzione dei parametri in oggetto. Abbiamo considerato significativi valori di r diversi da zero.

Riguardo a tali analisi possiamo dire che nella nostra popolazione né i parametri classici indicativi delle pressioni di riempimento (e' e E/e') né lo strain atriale hanno mostrato un buon grado di correlazione con i parametri clinici di PA pre- e post CT, questo probabilmente a motivo della ridotta mediana di osservazione e della non significatività statistica del dato basale. Mentre abbiamo dimostrato un buon grado di correlazione tra tali i parametri ecocardiografici e lo strain atriale (vedi Grafico 1-2) con una progressiva riduzione dei valori di strain atriale all'aumentare del rapporto E/e' e una correlazione direttamente proporzionale tra e' e lo strain atriale, ad indicare che il PALS risulta un indicatore preciso e precoce dei fenomeni emodinamici atriale, precedente le modificazioni cliniche.

Grafico 1.

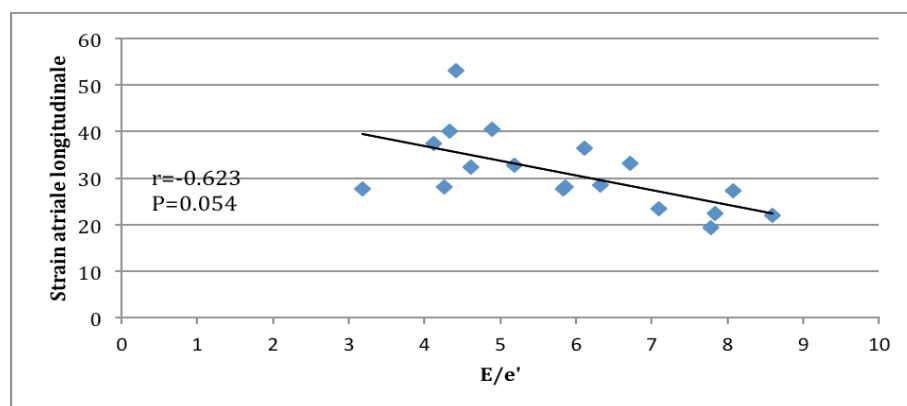
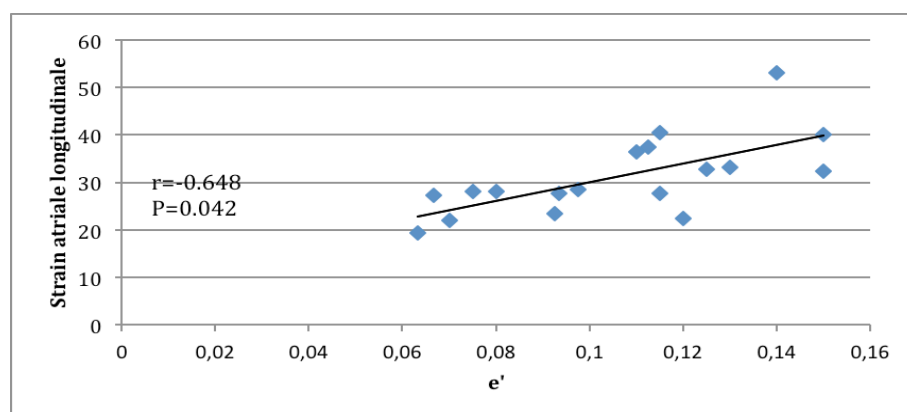


Grafico 2.



DISCUSSIONE

I progressi farmacologici nel trattamento chemioterapico dei pazienti tumorali hanno consentito una significativa riduzione della mortalità con un miglioramento della prognosi del paziente oncologico. Tutto ciò pagando un prezzo in termini di effetti collaterali legati a questo tipo di terapia. La cardiotossicità è uno degli effetti collaterali più rilevanti sia dei farmaci chemioterapici tradizionali che dei nuovi farmaci biologici.

L'instaurarsi di complicanze cardiovascolari ha infatti importanti ricadute sia in termini di morbilità e che di mortalità con un forte impatto sulla qualità di vita e sulla sopravvivenza del paziente indipendentemente dal problema oncologico. Pertanto le nuove Linee Guida internazionali hanno inserito il peggior trattamento chemioterapico nel novero dei fattori di rischio cardiovascolari. Un'importanza fondamentale in questo ambito rivestono sia la possibilità di effettuare una diagnosi precoce, sia una migliore comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base dello sviluppo di cardiotossicità..

I farmaci a target molecolare anti-VEGF, primo fra tutti il Bevacizumab, sono farmaci introdotti abbastanza recentemente nella pratica clinica, ed hanno come scopo quello di bloccare la neoangiogenesi, impedendo così l'apporto di nutrienti al tumore. I principali effetti collaterali sono ipertensione arteriosa (IA), anche severa, proteinuria, eventi tromboembolici ed emorragie il tutto mediato da fenomeni di vasocostrizione, di impoverimento vascolare e di disfunzione endoteliale. Allo stato attuale però in letteratura esistono pochi lavori specifici che si propongano di valutare se questa classe di nuovi farmaci abbia un vero e proprio effetto tossico a livello cardiaco.

In particolare non sono noti gli effetti di inibizione del VEGF a livello dei vasi coronarici e se i fenomeni di vasocostrizione e disfunzione endoteliale secondari all'azione del farmaco si verificano anche a questo livello e se siano tali da determinare una riduzione della riserva coronarica in questa classe di pazienti, favorendo una successiva evoluzione verso la cardiopatia ischemica, fatto che rappresenterebbe un fattore di rischio aggiuntivo non trascurabile.

Il nostro studio è uno studio pilota di tipo osservazionale prospettico che si pone come obiettivo la valutazione degli effetti del farmaco a livello coronarico nell'ipotesi che l'effetto sistemico vasocostrittore e di promozione dei meccanismi di disfunzione endoteliale si esplichino anche sui vasi epicardici determinando una riduzione della riserva coronarica. Inoltre ci proponiamo di valutare la fattibilità e l'appropriatezza delle metodiche utilizzate per l'individuazione precoce di cardiotoxicità causata da farmaci anti-VEGF e, alla luce dei dati raccolti, poter rispondere ai quesiti più specifici sull'effetto a livello miocardico di questi farmaci. Occorre precisare però che, in considerazione l'esiguo numero attuale dei pazienti ci permette di fare solo delle analisi preliminari sui dati al momento disponibili.

Preliminarmente abbiamo valutato i maggiori determinanti del rischio cardiovascolare all'interno della nostra popolazione. Dette analisi ci hanno permesso di definire un rischio cardiovascolare globale omogeneamente basso tra i nostri soggetti, così da poter escludere preliminarmente che i successivi risultati fossero determinati da particolari caratteristiche di rischio della popolazione in esame.

Dopo questa analisi abbiamo suddiviso la nostra popolazione in due gruppi a seconda dello sviluppo o meno di tossicità farmacologica. Tale suddivisione è risultata in due gruppi omogenei, sia per numerosità che per caratteristiche antropometriche e di rischio cardiovascolare globale. È da notarsi che la percentuale di pazienti che hanno evidenziato tossicità da farmaci è risultata ai limiti superiori di quelli riportati in letteratura^{140, 141}, probabilmente a motivo della maggiore età media della nostra popolazione. Analogamente ai dati di letteratura i nostri pazienti hanno mostrato una mediana di 3,5 mesi dall'inizio del farmaco per lo sviluppo dell'effetto collaterale, con un incremento medio di 19 ± 9 mmHg, e un rialzo più marcato in caso di ipertensione pre-esistente con una chiara associazione tra il tempo di esposizione a Bevacizumab e lo sviluppo di ipertensione¹⁴².

Nel caso di pre-esistente incremento della pressione arteriosa risulta importante la valutazione dei fattori di rischio cardiovascolari pregressi del soggetto. Infatti, come sottolineato dal lavoro di Vaklavas¹⁴³, in molteplici studi prospettici e retrospettivi con il Bevacizumab, l'ipertensione è stata riportata più frequentemente in pazienti con ipertensione pregressa. Un controllo maggiore

dei fattori di rischio cardiovascolare nella loro globalità, non limitato al solo abbassamento della pressione arteriosa è stato associato ad una diminuzione dei livelli di VEGF attivo circolante¹⁴⁴ con una riduzione dei casi di ipertensione severa ed del rischio cerebrovascolare. Questa osservazione implica che un controllo ottimale di tutti i fattori di rischio cardiovascolari potrebbe diminuire il potenziale ipertensivo della terapia antiangiogenica. Anche nel nostro studio la problematica ipertensiva è stata sviluppata maggiormente, pur con frequenza non statisticamente significativa, da quei pazienti che erano già in terapia con farmaci antipertensivi, sebbene la loro pressione fosse ben controllata in condizioni basali.

La valutazione della pressione arteriosa rimane uno dei parametri più importanti da controllare in corso di terapia con farmaci anti-VEGF, anche perchè un aumento della pressione arteriosa è stato proposto come marker dell'attività antitumorale del farmaco. In un recente studio, Scartozzi e collaboratori¹⁴⁵ hanno indagato pazienti affetti da neoplasia colon rettale metastatica, trattati secondo schema FOLFIRI più Bevacizumab. I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi secondo i valori di pressione arteriosa ottenuti da una serie di misurazioni effettuate prima, durante, immediatamente dopo ed un'ora dopo l'infusione di Bevacizumab. I pazienti con un'ipertensione (diagnosticata secondo i criteri del *National Cancer Institute Common Toxicity Criteria*) correlata al Bevacizumab, avevano un *outcome* migliore rispetto ai pazienti normotesi in termini di percentuale di risposta (75% versus 32%) e di *Progression-Free Survival interval* (14,5 mesi versus 3,1 mesi); nessuna differenza è stata osservata tra i due gruppi in termini di *Overall Survival*. Nonostante il campione fosse piccolo, l'evidenza ottenuta suggerisce che un'ipertensione clinicamente rilevante potrebbe essere utilizzata come un affidabile e gratuito marker di attività antitumorale. All'interno della casistica del nostro studio questa ipotesi trova conferma, poichè i pazienti che hanno sviluppato ipertensione, hanno anche ottenuto una risposta significativa della malattia oncologica; proprio per questo proseguono con una terapia con il solo farmaco anti-VEGF di mantenimento.

Bisogna inoltre sottolineare che nei pazienti ipertesi abbiamo rilevato una maggior percentuale di casi di proteinuria e/o evidente microalbuminuria (4/10 vs 1/10). Come dimostrato dal lavoro di Miller e collaboratori sulle pazienti affette da neoplasia mammaria metastatica¹⁴⁶, la proteinuria potrebbe essere in parte causata dall'aumento della pressione intraglomerulare causato dall'ipertensione.

Così anche nel nostro studio è stata quindi dimostrata un'associazione tra le due variabili possibilmente secondario a un danno ipertensivo a livello glomerulare. Rimane però ancora bene da definire se esiste un chiaro nesso di causalità tra le due condizioni, o se sono entrambe indipendentemente causate dal blocco di VEGF.

Il confronto dei dati clinici, laboratoristici e strumentali ci ha permesso di raggiungere alcuni risultati principali in merito agli obiettivi previsti.

1. Per quanto riguarda i risultati ottenuti sulla valutazione della riserva coronarica, al momento attuale possiamo dire che la nostra ipotesi di rilevanza del danno endoteliale come eziopatogenetica di un danno microvascolare a livello coronarico, non è stata confermata, riportando una non significativa differenza nei valori di RFC nei due gruppi. Ciò nonostante vi siano stati casi di disfunzione endoteliale in altra sede (proteinuria). Si tratta però di un risultato coerente con il fatto che fino ad ora non abbiamo verificato casi di ipertensione severa indicativi di un maggior grado di disfunzione endoteliale.

2. Analogamente non è stato dimostrato un effetto citotossico diretto della terapia con antiangiogenetici sul cardiomiocita in assenza di modificazioni significative nei dosaggi dei markers di cardiomiocitonecrosi, né riduzione della funzione sistolica e dello *strain* globale longitudinale del ventricolare sinistro.

Per quanto riguarda i marker di necrosi miocardica il ridotto tempo di osservazione ci impedisce di valutare se, anche le piccole variazioni riscontrate, possano essere significative. Infatti, nello studio prospettico condotto da Schmidinger¹⁴⁷, è stata misurata la concentrazione ematica di Troponina I immediatamente dopo e dopo un mese dal completamento del regime chemioterapico ad alte dosi per differenti tipi di tumore in 703 pazienti adulti. Pazienti con elevata concentrazione di Troponina T ad una o ad entrambe le rilevazioni, hanno avuto una elevata incidenza di eventi cardiovascolari (37% se solo ad una rilevazione, 84% se ad entrambe) nei 3 seguenti anni di follow-up, paragonati ai pazienti senza rialzo della Troponina T.

Tuttavia in letteratura per gli enzimi esistono molte più evidenze riguardanti Sunitinib e Sorafenib, che potrebbero avere un effetto tossico diretto sui

cardiomiociti, inibendo i pathway tirosin-chinasici essenziali per la sopravvivenza di tali cellule.

Anche per quanto riguarda i dati di disfunzione sistolica la ridotta numerosità campionaria rimane un grosso limite per le nostre analisi. Infatti nella metanalisi del 2011 di Choueiri et al.¹⁴⁸ che ha è stato dimostrato per la prima volta un significativo incremento nell'insorgenza di insufficienza cardiaca in pazienti in trattamento con Bevacizumab, l'incidenza complessiva è stata stimata dell' 1,6% (in un totale di 704 pazienti), per cui comprendiamo come all'interno della nostra ridotta casistica difficilmente potesse verificarsi un evento significativo.

Più significativi sono i dati riguardanti la diminuzione della FE in pazienti in terapia con Sorafenib o Sunitinib per neoplasia renale. In questo caso nello studio di Schmidinger¹⁴⁹ già citato, su 74 pazienti ben il 34% ha sviluppato tossicità cardiaca e nel 12 % si è avuta una diminuzione significativa della FE. Anche in altri lavori, si è dimostrato un effetto cardiotossico maggiore dei Tkis rispetto al Bevacizumab, ed in questo il nostro studio essendo costituito per la grande maggioranza da pazienti in terapia con il Bevacizumab non ci può fornire informazioni.

3. Per quanto riguarda invece il danno d'organo subclinico delle elevate pressioni arteriose abbiamo osservato una scarsa differenza nei due gruppi tra i parametri morfologici tradizionalmente acquisiti (massa/ geometria ventricolare e parametri doppler di funzione diastolica). Questo risultato è verosimilmente secondario al ridotto tempo di esposizione della cavità ventricolare ad elevate pressioni di riempimento che non ha permesso lo sviluppo di significative alterazioni strutturali. Analogamente non si sono dimostrate differenze statisticamente significative anche nelle dimensioni atriali sinistre. La dimensione dell'atrio infatti può essere considerata come l'espressione morfologica della cronicità della disfunzione diastolica. L'esposizione dell'atrio sinistro per lungo tempo ad elevate pressioni di riempimento risulta in un rimodellamento che si riflette nell'aumento delle sue dimensioni ¹⁵⁰. Nella nostra popolazione, però, la ridotta mediana di terapia non ha permesso lo sviluppo delle suddette modificazioni morfostrutturali.

Mentre, confrontando i dati di *strain* atriale con i parametri di funzione atriale sinistra tradizionalmente acquisiti con metodica ecocardiografica mono e bidimensionale, abbiamo dimostrato un'elevata sensibilità dello studio *strain*

nell'identificare danno d'organo precoce, rilevando differenze statisticamente significative tra i valori basali di PALS e quelli dopo terapia.

I dati ottenuti dalla nostra analisi confermano il fatto che una valutazione quantitativa della funzione atriale piuttosto che la misurazione dei volumi presenti un maggior potere nel predire precocemente la disfunzione diastolica del VS in soggetti con FE conservata. Nella popolazione ipertesa infatti lo *strain* atriale dopo terapia si presenta ridotto in maniera statisticamente significativa rispetto al basale dimostrando la capacità di questa nuova metodica nell'identificare la precoce disfunzione atriale prima ancora che si instaurino alterazioni organiche identificabili con metodiche standard.

Questo riscontro risulta coerente con i dati della letteratura, in particolare in particolare del già citato lavoro del gruppo di Mondillo et al. che nel recente 2010 dimostrarono che pazienti ipertesi in fase iniziale, senza evidenza di incremento della massa ventricolare, lo *strain* atriale si altera precocemente ancor prima dello sviluppo di disfunzione diastolica¹¹³, ed inoltre che il suddetto parametro dimostra una buona correlazione e una accurata performance diagnostica nella stima delle pressioni di incuneamento capillare polmonare elevate (> 18 mm Hg); maggiore è la pressione di riempimento ventricolare sinistro e peggiore risulta essere la deformazione atriale sinistra¹¹⁴.

Anche il nostro gruppo ha dimostrato recentemente in una coorte di pazienti ipertesi senza incremento della massa ventricolare che lo *strain* atriale si altera ancora prima dello sviluppo di disfunzione diastolica e della dilatazione atriale sinistra.

Come detto la ridotta numerosità della nostra popolazione non ci permette di dare raccomandazioni mandatorie. Tuttavia risulta evidente l'opportunità di proseguire nelle analisi così da poter individuare eventuali fattori predittivi di cardiotoxicità che ci permettano di stratificare la popolazione candidata a terapia oncologica.

Sicuramente risulta evidente l'importanza di individuare i fattori di rischio cardiovascolari del singolo paziente, prima di iniziare una terapia con farmaci anti-VEGF, ma anche con altri farmaci antineoplastici potenzialmente cardiotoxici, così da selezionare meglio i pazienti cui somministrare il farmaco, di seguire più attentamente i pazienti maggiormente a rischio.

Inoltre, in letteratura sono stati descritti recenti progressi inerenti la possibilità di prevenire un danno cardiaco mediante la somministrazione di farmaci già noti per la loro capacità di indurre una protezione d'organo in altre patologie cardiache (Swain SM 1998; Lipshultz SE 2002; Kalay 2006)^{151, 152, 153}

In questo modo, in un futuro, riconoscendo i pazienti maggiormente predisposti allo sviluppo di questo effetto collaterale, sarà possibile impostare per tempo un trattamento efficace, superando il paradosso in base al quale pazienti che ottengono un effetto palliativo importante vadano incontro a disfunzione cardiaca e ad un peggioramento della qualità di vita.

Appropriatezza e fattibilità delle metodiche utilizzate

Per quanto riguarda le metodiche utilizzate, l'intento del nostro studio è quello di effettuare una valutazione globale delle eventuali problematiche cardiache che il paziente in terapia con farmaci anti-VEGF potrebbe sviluppare. Per indagare quindi la complessità della situazione cardiovascolare, abbiamo utilizzato molteplici parametri, sia di tipo strumentale, che bioumorali.

In campo oncologico la misurazione della FE è la metodica più comunemente utilizzata nel follow-up cardiologico dei pazienti in terapia. In realtà, come già dimostrato da Zambelli et al.¹⁵⁴, spesso questa metodica può sottostimare il danno a livello cardiaco, e può modificarsi in modo tardivo rispetto ad altri parametri. E' ormai assodato che una disfunzione della funzionalità diastolica è più precoce e più sensibile nell'identificare modificazioni subcliniche della funzionalità cardiaca, così come esistono metodiche di *imaging* più avanzate che sono note individuare in maniera più precoce la disfunzione sistolica del ventricolo sinistro. Per questo motivo la nostra valutazione durante l'esame ecocardiografico ha previsto sia una valutazione della funzione sistolica che di quella diastolica ventricolare sinistra. In entrambi i casi abbiamo integrato alle informazioni acquisite mediante ecocardiografia standard 2D anche quelle raccolte mediante metodica *Speckle Tracking*, con la valutazione dello *Strain* Globale del ventricolo sinistro e dell'atrio sinistro.

Diversi studi hanno infatti ormai sancito la superiorità dello *Strain* ventricolare rispetto alla frazione di eiezione come indice predittivo, capacità di predire eventi cardiaci¹⁵⁵, (dimostrandosi superiore alla FE anche nella valutazione e stratificazione dei pazienti con eventi cardiaci acuti) e infine come affidabilità e riproducibilità della metodica¹⁵⁶ .

Analogamente, per quanto riguarda le analisi di funzionalità diastolica, l'utilità dello *strain* 2D come predittore di danno d'organo precoce è emersa in molteplici studi che hanno dimostrato la sua capacità di andare ad identificare in maniera affidabili le alterazioni ultrastrutturali all'origine della disfunzione diastolica. Già in un recente lavoro nel nostro gruppo abbiamo dimostrato, confrontando i dati di *strain* atriale con i parametri di funzione atriale sinistra tradizionalmente acquisiti con metodica ecocardiografica mono e bidimensionale, l'elevata sensibilità dello studio *strain* nell'identificare danno d'organo precoce in una coorte di pazienti ipertesi vs controlli sani.

Per quanto riguarda gli esami ematici abbiamo valutato la concentrazione di Troponina T e di Nt-Pro-BNP. Infatti, come dimostrato dal lavoro di Cardinale et al.¹⁵⁷, un rialzo prolungato dell'enzima Troponina, anche al termine del trattamento chemioterapico, è correlato ad un rischio maggiore di eventi cardiaci. Il meccanismo per il quale il rilascio di Troponina aumenti al termine della chemioterapia non è ancora noto, poichè non si tratta del classico rilascio di enzimi miocardici causato dalla necrosi dei miocardiociti, tipico degli eventi ischemici improvvisi. Analoghi risultati sono stati dimostrati in diverse popolazioni di pazienti oncologici anche per il Nt-Pro-BNP.

Per ciò che riguarda invece la ricerca di proteinuria e microalbuminuria, esse sono giustificate dal fatto che la terapia con Bevacizumab è risultata associata allo sviluppo di proteinuria nel 23-38% dei pazienti con carcinoma colon-rettale e nel 64% dei pazienti con carcinoma renale. Come già ricordato in precedenza, una valutazione quantitativa e qualitativa della proteinuria è importante per la diagnosi del danno renale. Urine contenenti una escrezione giornaliera di 30-300 mg riflettono una condizione di microalbuminuria, pertanto l'unione delle due metodiche garantisce un'identificazione del possibile danno renale, anche in fasi molto precoci.

Infine, l'inclusione dell'Ecocardiografia sotto stress farmacologico costituisce l'innovazione principale del nostro studio, che prevede una valutazione diretta dell'integrità del sistema microvascolare coronarico. L'Eco-Stress rappresenta il Gold-Standard per l'identificazione di disfunzioni dell'endotelio coronarico, e quindi per valutare l'appropriatezza della nostra ipotesi di danno al microcircolo coronarico causato dai farmaci anti-VEGF.

Abbiamo infine rilevato un'elevata fattibilità delle metodiche di *imaging* utilizzate per le analisi della nostra popolazione, che infatti sono state eseguite al basale in tutti i soggetti in esame, secondo gli standard del protocollo di studio. Nel follow-up solo un paziente (1/20; 5% popolazione) ha interrotto le analisi di riserva coronarica, proseguendo nel follow-up solo le analisi strumentali non invasive, data la ridotta compliance alla somministrazione di Adenosina e.v. durante Ecostress.

Limiti e prospettive future

Le principali limitazioni al nostro studio:

A. Ridotta numerosità del campione.

I farmaci anti-VEGF allo stato attuale sono riservati ad un gruppo di pazienti molto selezionato, ed in aggiunta a ciò, il nostro protocollo prevedeva una ulteriore selezione sulla base dell'anamnesi cardiovascolare, in modo che lo studio non fosse inficiato da elementi di disturbo come presenza di patologie vascolari o cardiopatie pregresse. Per queste ragioni, ad oggi sono stati arruolati dieci pazienti.

Prevediamo di superare questo limite proseguendo nel nostro lavoro nei mesi futuri, in modo tale da raggiungere una casistica (50 pazienti previsti dal protocollo) sufficientemente ampia per ottenere una significatività statistica all'analisi dei risultati.

B. Durata limitata del tempo di osservazione

Al momento la mediana di terapia con farmaci anti-VEGF è di 3,5 mesi, e questo fatto costituisce la seconda importante limitazione al nostro studio. Infatti, come sottolineato anche nell'introduzione, da una analisi di tre studi di fase II ^{158,159,160}

emerge che l'intervallo medio tra l'inizio del Bevacizumab e lo sviluppo di ipertensione arteriosa è di 4.5-6 mesi. Allo stesso modo, lo sviluppo di proteinuria, strettamente correlato all'ipertensione, avviene all'incirca con le stesse tempistiche (tra i 6 ed i 12 mesi). Infatti, i due effetti collaterali principali conosciuti dei farmaci anti-VEGF sono stati dimostrati essere dose-dipendenti, per cui è necessario un controllo del medesimo paziente durante tutta la durata della sua terapia perchè queste problematiche possano svilupparsi ed essere individuate.

Per quanto riguarda le prospettive future i nostri interessi si svolgono in due diverse direzioni.

- A. Valutare gli effetti a livello vascolare periferico dei farmaci anti-VEGF, ed in particolare degli indici di rigidità arteriosa. Infatti è stato dimostrato che indici non invasivi di *stiffness* cardiovascolare come la *pulse pressure* e la PWV carotido-femorale possono essere predittori di rischio cardiovascolare nella comunità, in modo indipendente dai tradizionali fattori di rischio cardiovascolare.¹⁶¹ Nostra intenzione sarebbe quella di valutare questi indicatori nella nostra popolazione per poter definire se possano avere un significato prognostico.
- B. Inserire all'interno dei parametri analizzati dal nostro studio, un marker biochimico precoce di disfunzione endoteliale. Allo stato attuale, la ricerca si sta concentrando sull'identificazione di un tale marcatore; al momento la proteina PTX3 sembra essere uno dei marcatori più sensibili. Questo permetterebbe di aggiungere al nostro lavoro un marcatore biochimico precoce, capace di identificare un danno dell'endotelio microvascolare, ipotesi principale di danno dei farmaci anti-VEGF.

APPENDICI

Appendice A

L'esecuzione dell'esame prevede una sequenza di operazioni fisse e sempre effettuate a prescindere dalla patologia.

L'esame ecocardiografico si compone di:

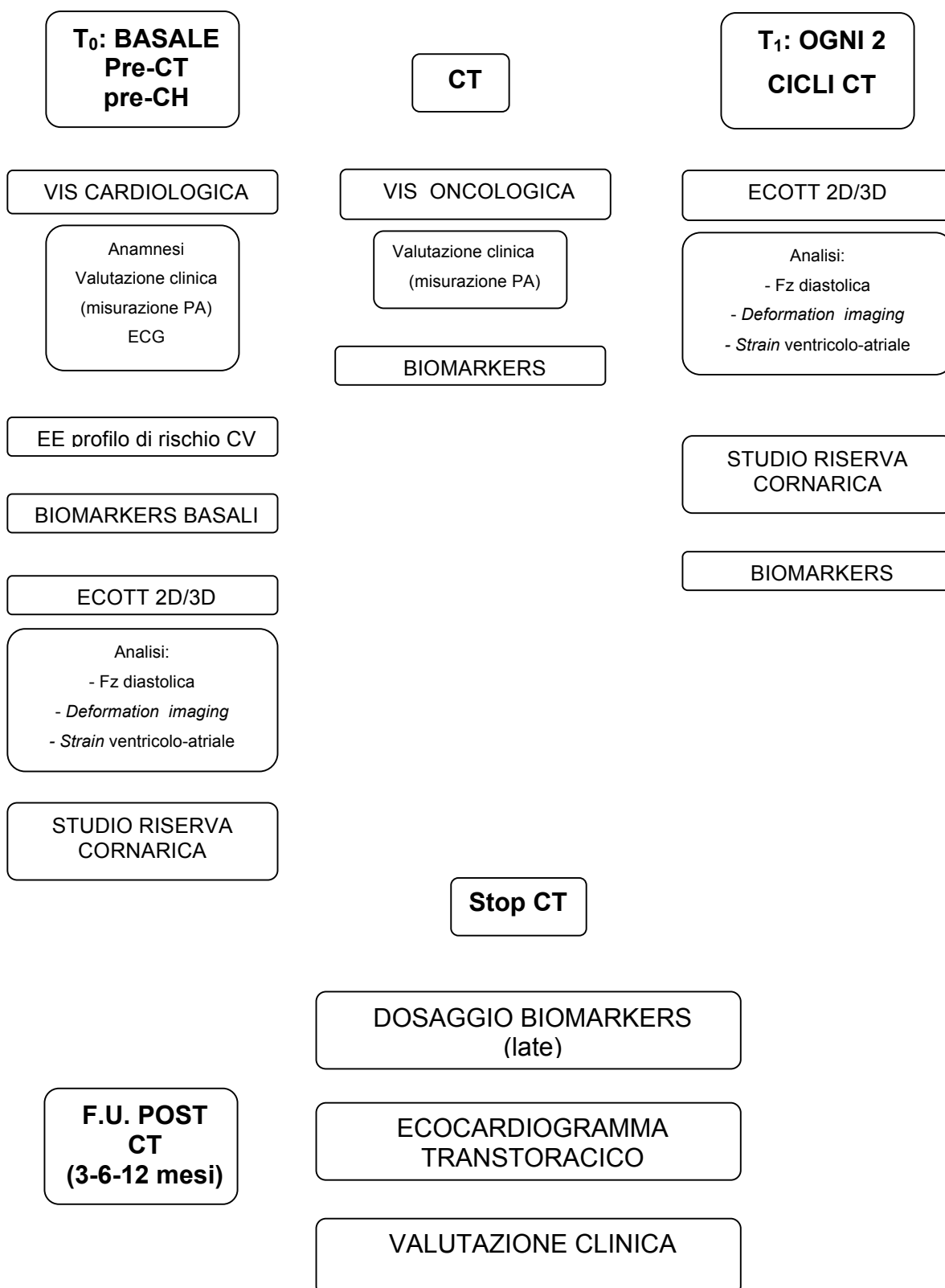
- un pool standard di immagini (frame – F o loop - L)/misure (vedi *Tabella XVI*)
- un pool di immagini/misure accessorie specifiche per patologia

Tabella XVI

	Sezione	Mode	Tipo	Misure	Calcoli	se patologia
Parasternale	1 AL	2D	L			
	2 ALmod per AO	2D	L	AO asc		studio aorta
	3 Asse corto AO	2D	L			valvulopatia aortica
	4 Asse corto MV	2D	L			valvulopatia mitralica
	5 Asse corto VS	2D	L			ipertensione polmonare
	6 Ventricolo	M-Mode	F	Cavità pareti S/D	Massa, RWT	ipertrofia
	7 Aorta	M-Mode	F	AO/AS antero-post		valvulopatia
	8 AL	CD Mitrale	L			
	9 AL	CD Aorta	L			
Apicale	10 4c	2D	L	Volume S/D, Volume AS	FE	cardiomiopatie
	11 2c	2D	L	Volume S/D, Area AS		volume biplano
	12 3c	2D	L			valvulopatia
	13 4c	2D + CD	L			
	14 2c	2D + CD	L			
	15 3c	2D + CD	L			
	16 5c Flusso AO	Doppler C	F	Vmax, Vmedia		
	17 Flusso MV	Doppler P	F	E/A, DT		
	18 Vel. Anello MV	DTI	F	E'		
	19 Flusso TV	2D + CD	L			ipertensione polmonare
	20 Flusso TV	Doppler C	L	grad VD-AD	PAP	
21 4c	M-Mode	F	TAPSE			
subxifo	22 4c	2D	L			DIA
	23 4c setto	CD	L			
	24 Vena cava sup	2D	L			
	25 Vena cava sup	M-Mode	F	diametro max/insp	Press. Atrio dx	
S	26 Arco aortico	2D				

Appendice B

Pazienti candidati a terapia con Bevacizumab seguiranno il seguente Protocollo.



VIII. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Robert A. Hong; Takeshi Limura,; Kenneth N. Sumida; Robert M. Eager Review Cardio-Oncology/Onco-Cardiology, , *Clin. Cardiol.* 33, 12, 733–737 (2010)
- ² A. Albini, G.Pennesi, F.Donatelli, R.Cammarota, S.De Flora, D. M. Noonan. Cardiotoxicity of Anticancer Drugs: The Need for Cardio-Oncology and Cardio-Oncological Prevention Review *J Natl Cancer Inst* Vol. 102, Issue 1 January 6, 2010
- ³ Di Bella S, Venturini F, Marrapese G, Tarenzi E, Siena S. Cardiotoxicity of novel molecular targeted therapies of cancer. *J Cardiovascular Echography* 21 (2011) 78-85.
- ⁴ Seidman A , Hudis C , Pierri MK , et al . Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience . *J Clin Oncol* . 2002 ; 20 (5): 1215 – 1221
- ⁵ Deng S , Wojnowski L . Genotyping the risk of anthracycline-induced cardiotoxicity . *Cardiovasc Toxicol* . 2007 ; 7 (2): 129 – 134 .
- ⁶ Huang RS , Duan S , Kistner EO , et al . Genetic variants contributing to daunorubicin-induced cytotoxicity . *Cancer Res.* 2008 ; 68 (9): 3161 – 3168 .
- ⁷ Andersson A , Naslund U , Tavelin B , Enblad G , Gustavsson A , Malmer B . Long-term risk of cardiovascular disease in Hodgkin lymphoma survivors —retrospective cohort analyses and a concept for prospective intervention . *Int J Cancer* . 2009 ; 124 (8): 1914 – 1917 .
- ⁸ Allender S , Scarborough P , Peto V , et al . *European cardiovascular disease statistics* . 2008 . Brussels, Belgium : European Heart Network , www .ehheart . org . Accessed July 14, 2009 .
- ⁹ Schmidinger M , Zielinski CC , Vogl UM , et al . Cardiac toxicity of sunitinib and sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma . *J Clin Oncol* . 2008 ; 26 (32): 5204 – 5212
- ¹⁰ Zell JA , Pelot D , Chen WP , McLaren CE , Gerner EW , Meyskens FL . Risk of cardiovascular events in a randomized placebo-controlled, double-blind trial of difluoromethylornithine plus sulindac for the prevention of sporadic colorectal adenomas . *Cancer Prev Res (Phila Pa)* . 2009 ; 2 (3): 209 – 212
- ¹¹ J. Folkman, "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease," *Nature Medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 27–31, 1995.
- ¹² Force T , Krause DS , Van Etten RA . Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition . *Nat Rev Cancer* . 2007 ; 7 (5): 332 – 344 .

-
- ¹³ B. A. Warren and P. Shubik, "The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch," *Laboratory Investigation*, vol. 15, no. 2, pp. 464–478, 1966
- ¹⁴ M. Greenblatt and P. Shubi, "Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 41, no. 1, pp. 111–124, 1968
- ¹⁵ J. Folkman, E. Merler, C. Abernathy, and G. Williams, "Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 133, no. 2, pp. 275–288, 1971.
- ¹⁶ J. Folkman, "Tumor angiogenesis: therapeutic implications," *The New England Journal of Medicine*, vol. 285, no. 21, pp. 1182–1186, 1971
- ¹⁷ N. Ferrara, H.-P. Gerber, and J. LeCouter, "The biology of VEGF and its receptors," *Nature Medicine*, vol. 9, no. 6, pp. 669–676, 2003
- ¹⁸ J. E. Park, H. H. Chen, J. Winer, K. A. Houck, and N. Ferrara. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 41, pp. 25646–25654, 1994.
- ¹⁹ K. Paavonen, P. Puolakkainen, L. Jussila, T. Jahkola, and K. Alitalo. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *American Journal of Pathology*, vol. 156, no. 5, pp. 1499–1504, 2000
- ²⁰ G. Korpanty et al. Molecular and Clinical Aspects of Targeting the VEGF Pathways in Tumors. *Journal of Oncology* 2010
- ²¹ Dong X, Han ZC, Yang R. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;62:105–118.
- ²² Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358:2039–2049.
- ²³ Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3: 721–732.
- ²⁴ Kaelin WG Jr. Treatment of kidney cancer: Insights provided by the VHL tumor-suppressor protein. *Cancer* 2009;115:2262–2272.
- ²⁵ N. Ferrara and R. S. Kerbel, "Angiogenesis as a therapeutic target," *Nature*, vol. 438, no. 7070, pp. 967–974, 2005
- ²⁶ Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29(sup 16):15–18

-
- ²⁷ C. Vaklavas, D. Lenihan, R. Kurzrock, A. M. Tsimberidou. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapies and Cardiovascular Toxicity: What Are the Important Clinical Markers to Target? *The Oncologist* 2010;15:130–141
- ²⁸ H. Hurwitz, L. Fehrenbacher, W. Novotny, et al., “Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, vol. 350, no. 23, pp. 2335–2342, 2004.
- ²⁹ L.B. Saltz, S. Clarke, W. Scheithauer, A. Figer, R. Wong, S. Koski, M. Lichinitser, T. Yang, F. Rivera, F. Couture, F. Sirzen, J. Cassidy. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based Chemotherapy as first line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 26:2013-2019
- ³⁰ Guarneri V, Conte PF, The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31 (Suppl. 1): 149-161, 2004.
- ³¹ Hutson TE, Davis ID, Machiels JP, De Souza PL, Rottey S, Hong BF, Epstein RJ, Baker KL, McCann L, Crofts T, Pandite L, Figlin RA. Efficacy and safety of pazopanib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 20;28(3):475-80. Epub 2009 Dec 14.
- ³² Sonpavde G, Hutson TE, Sternberg CN Pazopanib for the treatment of renal cell carcinoma and other malignancies. *Drugs Today (Barc)*. 2009 Sep;45(9):651-61.
- ³³ Ferry A.L.M. Eskens*, Jaap Verweij The clinical toxicity profile of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) targeting angiogenesis inhibitors; A review *European Journal of Cancer* 42 (2006) 3127–3139
- ³⁴ Gordon MS, Margolin K, Talpaz M et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patient with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 843-850
- ³⁵ Hurwitz H Saini S. bevacizumab in the treatment of metastatic colorectal cancer: safety profile and management of adverse events. *Semin Oncol* 2006; 33 (5 Suppl. 10): 26-34.
- ³⁶ Siegel AB, Cohen EI, Ocean A et al. Phase II trial evaluating the clinical and biological effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2992-2998.
- ³⁷ Burger RA Sill MW, Monk BJ, Greer BE, Sorosky JI. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5165 – 5171.
- ³⁸ Cannistra SA, Matulonis UA, Penson RT et al. Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5180 – 5186.

-
- ³⁹ Chen HX, Cleck JN. Adverse effect of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nat REV Clin Oncol* 2009; 6 (8): 465-77.
- ⁴⁰ Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335–2342.
- ⁴¹ Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: Results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007;25:1539–1544.
- ⁴² Hurwitz H, Fehrenbacher L, Hainsworth JD et al. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: An active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:3502–3508.
- ⁴³ Sandler A, Gray R, Perry MC et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;355: 2542–2550.
- ⁴⁴ Miller K, Wang M, Gralow J et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007;357: 2666–2676.
- ⁴⁵ Jang YC, Haworth RM, Sherry. A randomized trial of bevacizumab, an antivascular growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *NEJM* 2003; 349(5): 427-434.
- ⁴⁶ Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:2184 –2191.
- ⁴⁷ Panade AU, Lombardo JC, Fakhri M, Fakhri et al. Bevacizumab induced hypertension: a manageable toxicity. *J Clin Oncol* 2006, 24. 13539
- ⁴⁸ Kabbinavar F, Hurwitz H, Fehrenbacher L et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:60–65.
- ⁴⁹ Yang JC, Haworth L, Sherry RM et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003;349:427– 434.
- ⁵⁰ Grothey A, Sugrue MM, Purdie DM et al. Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: Results from a large observational cohort study (BRiTE). *J Clin Oncol* 2000; 26: 5326-5334.

-
- ⁵¹ Maitland ML, Kasza KE, Karrison T et al. Ambulatory monitoring detects sorafenib-induced blood pressure elevation on the first day of treatment. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6250-6257.
- ⁵² Azizi M, Chedid A, Oudard S. Home blood pressure monitoring in patients receiving sunitinib. *N Engl J Med* 2008; 358: 95-97.
- ⁵³ Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-welsh L. VEGF receptor signalling: in control vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 359-371.
- ⁵⁴ Henry TD, Annex BH, McKendall GR et al. The VIVA trial: Vascular Endothelial Growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 2003; 107: 1359-1365.
- ⁵⁵ Robinson ES, Khankin EV, Choueiri TK et al. Suppression of the nitric oxide pathway in metastatic renal cell carcinoma patients receiving vascular endothelial growth factor-signaling inhibitors. *Hypertension* 2010; 56: 1131-1136.
- ⁵⁶ Mourand JJ, des Guetz G, Debbabi H, Levy BI. Blood pressure rise following angiogenesis inhibition by bevacizumab: a crucial role of microcirculation. *Ann Oncol* 2008; 19: 3470-3476.
- ⁵⁷ Steeghes N, Gelderblom H, Roodt JO et al. Hypertension and rarefaction during treatment with telatinib, a small molecule angiogenesis inhibitor. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3470-3476.
- ⁵⁸ Chen HH, Prewitt RL, Dowell RF. Microvascular rarefaction in spontaneously hypertensive rat cremaster muscle. *Am J Physiol* 1981; 10(3): 306-310.
- ⁵⁹ Hutchins PM, Lynch CD, Cooney PT, Curseen KA. The microcirculation in experimental hypertension and aging. *Cardiovasc Res* 1996; 32 (4): 772-780.
- ⁶⁰ Noon JP, Walzer BR, Webb DJ et al. Impaired microvascular dilatation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high blood pressure. *J Clin Invest* 1997; 99: 1873-1879.
- ⁶¹ Pande AU, Lombardo JC, Fakih M et al. Bevacizumab induced hypertension: a manageable toxicity. *J Clin Oncol* 2004; 22(11): 1353-1359.
- ⁶² Mourad JJ, des Guetz G, Debbabi H et al. Blood pressure rise following angiogenesis inhibition by bevacizumab. A crucial role for microcirculation. *Ann Oncol* 2008; 19: 927-934.
- ⁶³ Veronese ML, Mosenkins A, Flaherty KT et al. Mechanism of hypertension associated with BAY43-9006. *J Clin Oncol* 2006; 24 (9): 1363-1369.

-
- ⁶⁴ Friehs I, Barillas R, Vasilyev NV et al. Vascular endothelial growth factor prevents apoptosis and preserves contractile function in hypertrophied infant heart. *Circulation* 2006;114(1 suppl):I290–I295.
- ⁶⁵ Giordano FJ, Gerber HP, Williams SP et al. A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5780–5785.
- ⁶⁶ Zentilin L, Puligadda U, Lionetti V et al. Cardiomyocyte VEGFR-1 activation by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction. *FASEB J* 2009 Dec 17
- ⁶⁷ Force T, Krause DS, Van Etten RA. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7 (5): 332 – 344
- ⁶⁸ Yang JC, Haworth L, Sherry RM et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003;349:427–434.
- ⁶⁹ Gordon MS, Cunningham D. Managing patients treated with bevacizumab combination therapy. *Oncology* 2005;69:S25–33
- ⁷⁰ Kabbinar FF, Schulz J, McLeod M. Addition of bevacizumab to bolus 5FU/leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: result of a randomized Phase II trial. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3697-3705.
- ⁷¹ Zhu X, Wu S, Dahut WL, Parikh CR. Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2007;49:186–93.
- ⁷² Onstendorf T, Kunter U, Eitner F. VEGF mediates glomerular endothelial repair. *J Clin Invest* 1999, 104: 913-23.
- ⁷³ Alvarez A, Castilla MA, Gonzalez FR. Role of vascular endothelial growth factor and erythropoietin-related endothelial cell proliferation. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1998-2004.
- ⁷⁴ Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J et al. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* 2008; 358:1129-1136.
- ⁷⁵ H.Izzedine, C.Massard, J. P.Spano, F.Goldwasser, D.Khayat, J.C. Soria. VEGF signalling inhibition-induced proteinuria: Mechanisms, significance and management. *European Journal of Cancer* 46 (2010)439–448
- ⁷⁶ Kdoqui I. et al. Clinical practice guidelines on hypertension and antihypertensive agents in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2004,43:S1–290.

-
- ⁷⁷ Scapaticci FA, Skillings JR, Holden SN et al. Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab, *J Nat Cancer Inst* 2007; 99 (16): 1232-9.
- ⁷⁸ Johnson D, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Randomized Phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:2184–91.
- ⁷⁹ Altana R, Perik PJ, van Veldhuisen DJ, de Vries EG, Gietema JA. Cardiovascular toxicity caused by cancer treatment: strategies for early detection. *Lancet Oncol* 2009;10(4):391e9
- ⁸⁰ Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89e95
- ⁸¹ Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* 2008; 358: 2148–59.
- ⁸² Tschöpe, Kasner, Westermann et al. The role of NT-pro BNP in the diagnostics of isolated diastolic dysfunction: correlation with echocardiographic and invasive measurements. *Eur Heart J* 2005; 26:2277
- ⁸³ Anand, Fisher, Chiang et al. Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial *Circul* 2003; 107: 1278
- ⁸⁴ Steen H, Giannitsis E, Futterer S, et al. Cardiac troponin T at 96 hours after acute myocardial infarction correlates with infarct size and cardiac function. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 2192–94.
- ⁸⁵ Cardinale D et al . Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy . *Circulation* . 2004 ; 109 (22) : 2749 – 2754
- ⁸⁶ Okumura H, Iuchi K, Yoshida T, et al. Brain natriuretic peptide is a predictor of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Haematol* 2000; 104: 158–63.
- ⁸⁷ Nakamae H, Tsumura K, Hino M, et al. QT dispersion as a predictor of acute heart failure after high-dose cyclophosphamide. *Lancet* 2000; 355: 805–06.
- ⁸⁸ Nakamae H, Tsumura K, Akahori M, et al. QT dispersion correlates with systolic rather than diastolic parameters in patients receiving anthracycline treatment. *Intern Med* 2004; 43: 379–87.

-
- ⁸⁹ Cardinale D, Colombo A, Cipolla CM. Prevention and treatment of cardiomyopathy and heart failure in patients receiving cancer chemotherapy. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2008 Dec; 10(6):486e95
- ⁹⁰ Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American heart association Task Force on Practice guidelines : developed in collaboration with the American College of chest Physicians and the International Society for heart and lung Transplantation: endorsed by the heart Rhythm Society. *Circulation* 2005; 112: 154e235.
- ⁹¹ Dobrucki LW, Sinusas AJ. PET and SPECT in cardiovascular molecular imaging. *Nat Rev Cardiol* 2010 Jan;7(1):38e47
- ⁹² Jannazzo A, Hoffman J, Lutz M. Monitoring of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Pharmacother* 2008;42:99e104
- ⁹³ Ewer MS, Lenihan DJ. Left ventricular ejection fraction and cardiotoxicity: is our ear really to the ground? *J Clin Oncol* 2008;26:1201e3
- ⁹⁴ Nousiainen T, Jantunen E, Vanninen E, et al. Early decline in left ventricular ejection fraction predicts doxorubicin cardiotoxicity in lymphoma patients. *Br J Cancer* 2002;86:1697e700
- ⁹⁵ Tassan-Mangina S, Codorean D, Metivier M, Costa B, Himberlin C, Jouannaud C, et al. Tissue Doppler imaging and conventional echocardiography after anthracycline treatment in adults: early and late alterations of left ventricular function during a prospective study. *Eur J Echocardiogr* 2006 Mar; 7(2):141e6
- ⁹⁶ Leitman M, Lysyansky P, Sidenko S et al. Two dimensional strain a novel software for real time quantitative echocardiographic assessment of myocardial function. *J Am Soc Echocardiogr* 2004;17: 1021-9.
- ⁹⁷ Reisner SA, Lysyansky P, Friedman Z et al. Global longitudinal strain: a novel index of left ventricular systolic function. *J Am Soc Echocardiogr* 2004; 17: 630-3.
- ⁹⁸ Sivesgaars M, Christensen SD et al. Speckle tracking ultrasound is independent of insonation angle and gain: an in vitro investigation of agreement with sonomicrometry. *J Am Soc Echocardiogr* 2009; 22: 852-58.
- ⁹⁹ Santillo E, Ventura G, Cassano S, Ritacco A, Rago R, Lamprinoudi T, Ferraro A, Corsini I, Rosselli F, Grosso G, Vasile M, Migale M, Cariello FP. Analisi dello strain e strain rate sistolico longitudinale del ventricolo sinistro in pazienti adulti ed anziani. *G Gerontol* 2009; 57: 252-261

-
- ¹⁰⁰ Muiesan ML, Salvetti M, Monteduro C, Bonzi B, Pains A, Viola S, Poisa P, Rizzoni D, Castellano M, Agabiti-Rosei E. Left ventricular concentric geometry during treatment adversely affects cardiovascular prognosis in hypertensive patients. *Hypertension* 2004;43:731–738.
- ¹⁰¹ Galderisi M, Benjamin EJ, Evans JC, et al. Intra- and interobserver reproducibility of Doppler-assessed indexes of left ventricular diastolic function in a population-based study (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 1992; 70: 1341-6.
- ¹⁰² Mantero A, Gentile F, Gualtierotti C, et al. Left ventricular diastolic parameters in 288 normal subjects from 20 to 80 years old. *Eur Heart J* 1995; 16: 94-105.
- ¹⁰³ Miyatake K, Okamoto M, Kinoshita N, et al. Augmentation of atrial contribution to left ventricular inflow with aging assessed by intracardiac Doppler flowmetry. *Am J Cardiol* 1984; 53: 586-9.
- ¹⁰⁴ Smallhorn JF, Freedom RM, Olley PM. Pulsed Doppler echocardiographic assessment of extraparenchymal pulmonary vein flow. *J Am Coll Cardiol* 1987; 9: 573-9.
- ¹⁰⁵ Murai K, Iida H, Itagane H, et al. Assessment of superior vena caval blood flow velocity in ischemic heart disease. *Jpn Circ J* 1991; 55: 576-80.
- ¹⁰⁶ Appleton CP, Hatle LK, Popp RL. Superior vena cava and hepatic vein Doppler echocardiography in healthy adults. *J Am Coll Cardiol* 1987; 10: 1032-7.
- ¹⁰⁷ Shan K, Bick RJ, Poindexter BJ, et al. Relation of tissue Doppler derived myocardial velocities to myocardial structure and beta-adrenergic receptor density in humans. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 891-6
- ¹⁰⁸ Steven J. Lester, MD, A. Jamil Tajik, Rick A. Nishimura, Jae K. Oh, Bijoy K. Khandheria, James B. Seward, Unlocking the Mysteries of Diastolic Function. Deciphering the Rosetta Stone 10 Years Later, *J Am Coll Cardiol* 2008;51:679–89
- ¹⁰⁹ Hatle L, Sutherland GR. Regional myocardial function: a new approach. *Eur Heart J* 2000; 21: 1337-57.
- ¹¹⁰ Cameli M, Capuo M, Mondillo S, Ballo P, Palmerini E, Lisi M, Galderisi M. feasibility and reference values of left atrial longitudinal strain imaging by two-dimensional speckle tracking. *Cardiovascular Ultrasound* 2009; 7:6
- ¹¹¹ Rossi A, Vassanelli C. Left atrium: no longer neglected. *Ital Heart J* 2005; 6: 881-885.
- ¹¹² Kurt M, Wang J, Torre-Amione G, Nagueh Sf. Left atrial function in diastolic heart failure. *Circ Cardiovasc Imaging* 2009; 2: 10-15

-
- ¹¹³ Cameli M, Lisi M, Mondillo S. et al. Left atrial longitudinal strain by speckle tracking echocardiography correlates well with left ventricular filling pressures in patients with heart failure. *Cardiovascular ultrasound* 2010 Apr 21; 8-14
- ¹¹⁴ Cameli M, Lisi M, Padeletti M, Giacomini E, Ballo P, Galderisi M, Mondillo S. Left atrial speckle tracking analysis in patients with mitral insufficiency and history of paroxysmal atrial fibrillation. *Esc Congress. Stockholm* 2010.
- ¹¹⁵ Graham SP, Cohen MD, Hodgson JM. Estimation of coronary flow reserve by intracoronary Doppler flow probes and digital angiography. *Cathet CardiovascDiagn* 1990; 19:214-221.
- ¹¹⁶ Gould KL, Lipacomb K, Hamilton GW. Physiologic basis for assessing critical coronary stenosis. Instantaneous flow response and regional distribution during coronary hyperemia as measures of coronary flow reserve. *Am J Cardiol* 1974; 33:87-94.
- ¹¹⁷ Hoffman JI. A critical review of coronary reserve. *Circulation* 1987; 75: 6-11.
- ¹¹⁸ Kozavova M, Palombo C, Pratali L, Pittella G et al Mechanisms of Coronary Flow Reserve Impairment in Human Hypertension. *Hypertension* 1997; 29: 551-559
- ¹¹⁹ Strauer BE, Motz W, Vogt M, Schwartzkopff B. Impaired coronary flow reserve in NIDDM: a possible role for diabetic cardiopathy in humans. *Diabetes* 1997; 46: S119-S124.
- ¹²⁰ Galluto L, Sestito A, Brachetta S et al. Non invasive evaluation of flow reserve in the left anterior descending coronary artery in patients with cardiac syndrome X. *Am J Cardiol* 2007; 99: 1387-1383.
- ¹²¹ Dimitrov PP, Galderisi M, Rigo F et al. The non-invasive documentation of coronary microcirculation impairment: role of transthoracic echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2003; 16: 607-613.
- ¹²² Cecchi F, Olivetto I, Gistri R, Lorenzoni R, Chiriatti G, Camici PG. Coronary microvascular dysfunction and prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 1027-1035
- ¹²³ Rigo F, Ghepari S, Galderisi M, Pratali L, Cortigiani L, Sicari R, Picano E. The prognostic impact of coronary flow reserve in non ischemic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2006; 27: 1319-1323.
- ¹²⁴ Hozumi T, Yoshida K, Ogata Y et al. Noninvasive assessment of significant left anterior descending coronary artery stenosis by coronary flow velocity reserve with transthoracic color-doppler echocardiography. *Circulation* 1998; 97: 1557-1567

-
- ¹²⁵ Pizzuto F, Voci P, Mariano E, Puddu PE, sardella G, Nigri A. assessment of flow velocity riserve by transthoracic Doppler echocardiography and venous adenosine infusion before and after anterior descending coronary artery stenting. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 155-62
- ¹²⁶ Turiel M, Peretti , Sarzi-pittini P, Atzeni F, Doria A. cardiac imaging techniques in systemic autoimmune diseases. *Lupus* 2005; 14: 727-731
- ¹²⁷ Turiel M, Tomasoni L, Delfino L, Bodini B, Baccani G, Atzeni F, Sarzi-Putini P, De Gennaro Colonna V. Clinical implications of assessing coronary flow riserve and plasma asymmetric dimethylarginine in early rheumatoid arthritis. *EUROECHO Lisbon* 2007; 312:S35.
- ¹²⁸ Czerin J, Muller P, Chan S, et al. Influence of age and hemodynamics on myocardial blood flow and flow reserve. *Circulation* 1990; 82: 1595-1606.
- ¹²⁹ Park SM, Shim WJ, Song WH, et al. Effects of smoking on coronary blood flow velocity and coronary flow reserve assessed by transthoracic Doppler echocardiography. *Echocardiography* 2006; 23: 465-470
- ¹³⁰ Hirata K, Shimada K, Watanabe H, et al. Black tea increases coronary flow velocity reserve in healthy male subjects. *Am J Cardiol* 2004; 93: 1384-1388
- ¹³¹ Hirata K, Shimada K, Watanabe H, et al. Modulation of coronary flow velocity reserve by gender, menstrual cycle and hormone replacement therapy. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 1879-1884.
- ¹³² Hildick-Smith DJ, Shapiro LM. Coronary flow reserve improves after aortic valve replacement for aortic stenosis: an adenosine transthoracic echocardiography study. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1889-1896
- ¹³³ Hassane Izzedine , Christophe Massard , Jean Philippe Spano , Franc_ois Goldwasser ,David Khayat , Jean Charles Soria VEGF signalling inhibition-induced proteinuria: Mechanisms, significance and management, *European Journal of Cancer* 46(2010) 439–448
- ¹³⁴ Morcos SK, El-Nahas AM, Brown P Haylor J. Effect of iodinated water soluble contrast media on urinary protein assays. *BMJ* 1992;305:29.
- ¹³⁵ Cardinale D , Sandri M , Colombo A , et al . Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratifi cation of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy . *Circulation* . 2004 ; 109 (22) : 2749 – 2754
- ¹³⁶ Nakamae H, Tsumura K, Hino M, Hayashi T, Tatsumi N. QT dispersion as a predictor of acute heart failure after high-dose cyclophosphamide. *Lancet* 2000 Mar 4;355(9206):805e6

-
- ¹³⁷ Evaluation of Longitudinal and radial left ventricular function by two-dimensional speckle-tracking echocardiography in a large cohort of normal probands. N. Reckefuss, T. Butz, D. Horstkotte, L. Faber. *Int J Cardiovascular Imaging* 2010.
- ¹³⁸ Feasibility and reference values of left atrial longitudinal strain imaging by two-dimensional speckle tracking. M. Cameli, M. Caputi, S. Mondillo, P. Ballo, E. Palmerini, M. Lisi, E. Marino, M. Galderisi. *Cardiovascular Ultrasounds* 2009, 7:6.
- ¹³⁹ Senior R, Becher H, Monaghan M et al. Contrast echocardiography evidence-based recommendations by European Association of Echocardiography. *Eur J Echocardiogr* 2009; 10: 194-212.
- ¹⁴⁰ Hurwitz H Saini S. bevacizumab in the treatment of metastatic colorectal cancer: safety profile and management of adverse events. *Semin Oncol* 2006; 33 (5 Suppl. 10): 26-34.
- ¹⁴¹ Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:2184–2191.
- ¹⁴² Grothey A, Sugrue MM, Purdie DM et al. Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: Result from a large observational cohort study (BRiTE). *J Clin Oncol* 2008; 26: 5326-5334.
- ¹⁴³ C. Vaklavas Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapies and Cardiovascular Toxicity: What Are the Important Clinical Markers to Target?. *The Oncologist* 2010;15:130–141
- ¹⁴⁴ Felmeden DC, Spencer CG, Belgore FM et al. Endothelial damage and angiogenesis in hypertensive patients: Relationship to cardiovascular risk factors and risk factor management. *Am J Hypertens* 2003;16:11–20.
- ¹⁴⁵ Scartozzi M, Galizia E, Chiorrini S et al. Arterial hypertension correlates with clinical outcome in colorectal cancer patients treated with first-line bevacizumab. *Ann Oncol* 2009;20:227–230.
- ¹⁴⁶ Miller KD, Chap LI, Holmes FA, et al: Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 23:792-799, 2005
- ¹⁴⁷ Schmidinger M et al . Cardiac toxicity of sunitinib and sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma . *J Clin Oncol* . 2008 ; 26 (32) : 5204 – 5212
- ¹⁴⁸ Choueiri TK, Mayer EL, Je Y, et al: Congestive heart failure risk in patients with breast cancer treated with bevacizumab. *J Clin Oncol* 29:632-638, 2011

-
- ¹⁴⁹ Schmidinger M et al . Cardiac toxicity of sunitinib and sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma . *J Clin Oncol* . 2008 ; 26 (32): 5204 – 5212
- ¹⁵⁰ Douglas PS. The left atrium a biomarker of chronic diastolic dysfunction and cardiovascular disease risk. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1206-7
- ¹⁵¹ Lipshultz SE, Lipsitz SR, Sallan SE, Simbre VC 2nd, Shaikh SL, Mone SM, et al. Long-term enalapril therapy for left ventricular dysfunction in doxorubicin-treated survivors of childhood cancer. *J Clin Oncol* 2002; 45: 17-22
- ¹⁵² Swain SM. Adult multicenter trials using dexrazoxane to protect against cardiac toxicity. *Semin Oncol*. 1998; 25(4 Suppl 10):43-7.
- ¹⁵³ Kalay N, Basar E, Ozdogru I, Er O et al. Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(11):2258-62.
- ¹⁵⁴ A. Zambelli, M Della Porta, E. Aleuteri, L. Dee Giuli, O. Catalano, C. Tondini, A. Riccardi. Predicting and preventing cardiotoxicity in the era of breast cancer target therapies. Novel molecular tools for clinical issues. *The breast* 20 (2011)176-183.
- ¹⁵⁵ Cho GY, Marwick TH, Kim HS, Kim MK, Hong KS, Oh DJ. Global 2-dimensional strain as a new prognosticator in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Aug 11;54(7):618-24
- ¹⁵⁶ Marwick TH, Leano RL, Brown J, Sun JP, Hoffmann R, Lysyansky P, et al. Myocardial strain measurement with 2-dimensional speckle-tracking echocardiography: Definition of normal range. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2009;2:80–4
- ¹⁵⁷ Cardinale D et al . Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratifi cation of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy . *Circulation* . 2004 ; 109 (22): 2749 – 2754
- ¹⁵⁸ Siegel AB, Cohen EI, Ocean A et al. Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2008;26:2992–2998.
- ¹⁵⁹ Burger RA, Sill MW, Monk BJ, Greer BE, Sorosky JI. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer:A Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2007;25:5165–5171
- ¹⁶⁰ Cannistra SA, Matulonis UA, Penson RT et al. Phase II study of bevacizumabin patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5180 –518

¹⁶¹ Mattace-Raso, Van der Cammen, Hofman, Van Popele, Bos, et al, Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam study . *Circulation* 2006, 113: 657-63