



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

Facoltà di Ingegneria  
Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica  
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Tesi di Laurea

## **ELETTROCHEMIOTERAPIA: ANALISI DEI TRIALS CLINICI**

*Relatore: Ch.mo Prof. Dughiero Fabrizio*

*Correlatore: Ing. Sieni Elisabetta*

*Laureanda: Minotto Alessia*

Anno Accademico 2011 – 2012



## Sommario

1	Introduzione .....	5
2	L'elettroporazione e le sue applicazioni .....	7
2.1	Elettroporazione .....	7
2.1.1	La membrana della cellula .....	8
2.1.2	Elettroporazione reversibile .....	9
2.1.3	Elettroporazione irreversibile .....	10
2.2	Elettrochemioterapia .....	10
2.3	Principali testi citati nel capitolo .....	13
3	Farmaci antitumorali .....	15
3.1	Farmaci sperimentati per l'elettrochemioterapia .....	15
3.1.1	Classi di farmaci .....	15
3.1.2	Meccanismo d'azione e tipo di assorbimento .....	17
3.1.3	Esperimenti <i>in vitro</i> .....	19
3.1.4	Esperimenti <i>in vivo</i> .....	21
3.2	I due farmaci utilizzati in ECT: Bleomicina e Cisplatino .....	24
3.2.1	Bleomicina .....	24
3.2.2	Bleomicina in elettrochemioterapia .....	25
3.2.3	Cisplatino .....	28
3.2.4	Cisplatino in elettrochemioterapia .....	28
3.2.5	Differenze e analogie del trattamento di ECT con Bleomicina e con Cisplatino .....	31
3.3	Principali testi citati nel capitolo .....	33
4	Trials clinici effettuati in elettrochemioterapia .....	35
4.1	Definizione di trial clinico .....	35
4.2	Studi clinici effettuati prima dell'ESOPE .....	36
4.3	Il trial ESOPE .....	41
4.3.1	Procedura di trattamento .....	42
4.3.2	Risultati ottenuti con il trial ESOPE .....	47
4.4	Studi effettuati dopo il progetto ESOPE .....	48
4.5	Principali testi citati nel capitolo .....	52
5	Tumori trattati con Elettrochemioterapia .....	55

5.1	Carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC) .....	55
5.1.1	Risultati del trattamento con ECT.....	55
5.2	Carcinoma a cellule basali (BCC) .....	57
5.2.1	Risultati del trattamento con ECT.....	57
5.3	Melanoma .....	59
5.3.1	Risultati del trattamento con ECT.....	59
5.4	Altri tipi di tumore .....	60
5.4.1	Sarcoma di Kaposi .....	61
5.4.2	Adenocarcinoma .....	61
5.5	Principali testi citati nel capitolo .....	62
6	Conclusioni e sviluppi futuri .....	63
	Appendice – Cronologia Degli Eventi .....	65
	Bibliografia .....	67

# 1 Introduzione

La ricerca di nuove terapie in grado di curare o di contrastare la crescita dei tumori è stata negli ultimi anni oggetto di studio in molteplici ambiti accademici. L'idea di combinare tecnologie ingegneristiche a conoscenze mediche e biologiche è alla base dello sviluppo di un nuovo trattamento antitumorale detto elettrochemioterapia.

Grazie al fenomeno dell'elettroporazione, che permette la formazione di pori sulla membrana delle cellule mediante l'applicazione di impulsi di campo elettrico, è stato possibile studiare l'inserimento di molecole di farmaci antitumorali all'interno della cellula stessa. Il trattamento di tumori mediante l'associazione di elettroporazione e somministrazione di farmaci chemioterapici è detto elettrochemioterapia.

Questo lavoro di tesi propone un'analisi degli studi effettuati prima in laboratorio e successivamente in clinica sull'applicazione di questa nuova terapia su alcuni tipi di tumore.

Verranno analizzati, in particolare, nel secondo capitolo il fenomeno dell'elettroporazione e la sua associazione con farmaci chemioterapici. Nel capitolo 3 saranno invece approfonditi i profili farmacologici delle molecole considerate più adatte per il trattamento con elettrochemioterapia. Il quarto capitolo si concentrerà invece sui trials clinici svolti nei diversi istituti di ricerca al fine di pubblicare una vasta letteratura riguardante le modalità di trattamento mediante elettrochemioterapia. Le tipologie di cancro sottoposte ad elettrochemioterapia nel corso dei vari studi clinici verranno invece analizzate nel quinto capitolo.



## 2 L'elettroporazione e le sue applicazioni

In questo capitolo verrà descritto il fenomeno dell'elettroporazione e le diverse applicazioni che questa tecnica ha trovato in vari ambiti. Verrà posta una particolare attenzione all'elettrochemioterapia, uno degli utilizzi in campo medico dell'elettroporazione reversibile.

### 2.1 Elettroporazione

L'applicazione di un campo elettrico pulsato di intensità adeguata ai tessuti biologici permette di indurre una tensione transmembranale tale da causare l'apertura di pori temporanei o permanenti nella membrana delle cellule. Questo fenomeno è chiamato elettroporazione.

In Figura 1 è rappresentato l'effetto dell'elettroporazione sulla membrana di una cellula. La figura a sinistra mostra la membrana cellulare prima dell'applicazione del treno di impulsi, mentre la figura a destra mostra la stessa membrana elettroporata. Si può notare come, dopo l'applicazione del campo elettrico, si siano formati dei pori che attraversano il doppio strato lipidico e che permettono il passaggio di molecole (palline rosse) all'interno della cellula.

In base all'intensità e alla durata degli impulsi applicati, si può ottenere l'elettroporazione reversibile o irreversibile della membrana della cellula, fenomeni che verranno in seguito descritti più in dettaglio.

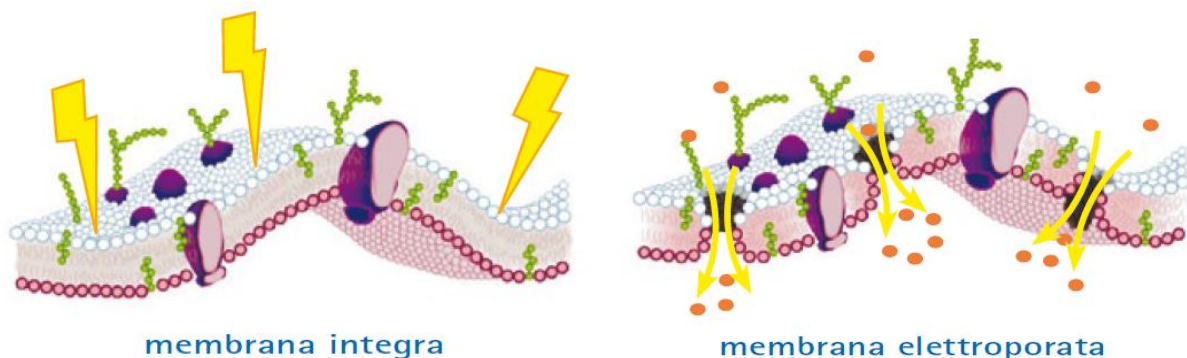


Figura 1. Membrana cellulare prima e dopo l'elettroporazione. [1]

La permeabilizzazione della membrana tramite l'applicazione di campi elettrici e il suo comportamento quale dielettrico, dovuto alla polarità degli ioni presenti sulla membrana stessa, è nota già da diversi anni [2], ma dalla fine degli anni '90 si è iniziato a studiare questo fenomeno pensando ad una sua eventuale applicazione in ambito medico e terapeutico.

Gli studi si incentrarono principalmente su:

- Elettrofusione cellulare, che consiste nella fusione di due cellule sufficientemente vicine tramite elettroporazione. I risultati sono stati pubblicati per la prima volta da Senda et Al. nel 1979 [3].
- Elettroporazione per trasferimento genico: di cui si parla per la prima volta nella pubblicazione firmata da Neumann et Al. nel 1982 [4] sul trasferimento di DNA in cellule murine elettroporate.
- Elettrochemioterapia, ovvero l'associazione di elettroporazione e infusione di farmaci chemioterapici al fine di contrastare la crescita dei tumori. I primi studi sono stati pubblicati nel 1993 da Belehradec e colleghi [5].
- Ablazione: questa tecnica consiste nell'elettroporazione di cellule al fine di indurne la morte per necrosi, e quindi la loro rimozione, ed è applicata nella chirurgia oncologica. Questi studi sono stati condotti da Davalos et Al. e pubblicati nel 2005 [6].
- Veicolazione transdermica di molecole: consiste nell'elettroporazione dello strato corneo della cute associata all'iniezione di farmaci analgici o sostanze utili al ringiovanimento della pelle [7].

### 2.1.1 La membrana della cellula

La membrana cellulare, detta anche membrana plasmatica, è composta da un doppio strato lipidico nel quale si trovano proteine e glucidi, che collaborano al trasporto di molecole da e verso l'interno della cellula.

In Figura 2 è rappresentata schematicamente la membrana di una cellula. Si può notare la presenza del doppio strato di molecole fosfolipidiche disposte in modo da avere le teste, rappresentate come palline di colore grigio, molto vicine tra loro così da formare una barriera. Nella figura sono presenti anche le proteine di membrana disposte all'interno del doppio strato lipidico.

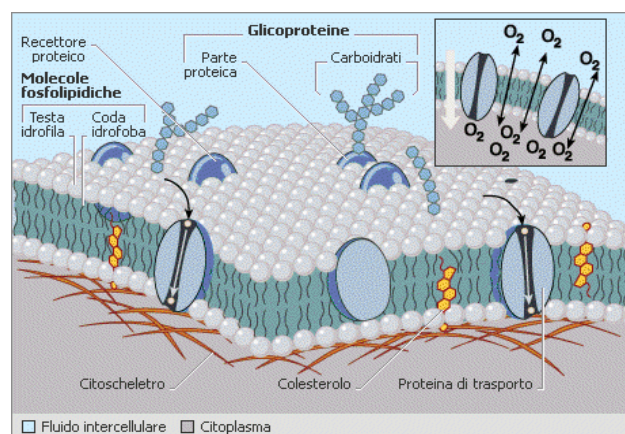


Figura 2. Rappresentazione schematica di una membrana cellulare. [8]



Molecole apolari e piccole molecole polari riescono ad oltrepassare la membrana cellulare sia sfruttando il gradiente di concentrazione sia per osmosi, mentre molecole polari di medie dimensioni, ioni e protoni vengono trasportati grazie alla presenza di quelli che sono chiamati trasportatori di membrana, tra i quali figurano i canali ionici e le pompe come quella sodio-potassio [9]. È proprio la presenza di ioni e la loro diversa concentrazione tra l'interno e l'esterno della cellula che determina un potenziale di membrana, il quale, in condizioni fisiologiche normali, si trova nel range di -90 mV e -40 mV [10]. L'applicazione di impulsi elettrici ad elevata tensione modifica il potenziale di membrana e induce il riarrangiamento delle molecole che formano il doppio strato lipidico.

### **2.1.2 Elettroporazione reversibile**

Alcuni esperimenti hanno mostrato che applicando impulsi ad onda quadra di elevata intensità (ad es.: 1000 V/cm) e breve durata (ad es.: 100  $\mu$ s) ad una cellula, si ottiene una permeabilizzazione della membrana, dovuta alla formazione di canali, detti anche pori (da cui il termine elettroporazione), che permettono il passaggio di molecole di dimensioni elevate. Il diametro di tali canali è perciò tale da permettere a molecole e ioni, che in condizioni fisiologiche standard non potrebbero passare, di entrare nella cellula [2]. È importante sottolineare che la permeabilizzazione della membrana non è omogenea su tutta la superficie della cellula, ma i pori si concentrano maggiormente nelle zone adiacenti gli elettrodi poiché il campo elettrico applicato non si distribuisce in maniera uniforme.

Il fenomeno dell'elettroporazione reversibile consente quindi la formazione di canali di durata temporanea che attraversano lo strato lipidico della membrana cellulare. Mediante infatti l'applicazione di impulsi di poche centinaia di Volt e di durata dell'ordine di qualche millisecondo [11], è possibile controllare l'effetto prodotto dal campo elettrico sul doppio strato lipidico, facendo in modo che il raggio dei pori che si vanno a formare sia sufficientemente grande da permettere il passaggio delle molecole da iniettare, ma sia altresì inferiore al valore critico oltre il quale la cellula non è più in grado di ritornare al suo stato iniziale. Quando, invece, i pori non si richiudono si va incontro al fenomeno dell'elettroporazione irreversibile [2].

La scoperta dell'elettroporazione reversibile ha permesso di studiare come migliorare il trasporto di farmaci chemioterapici non permeanti o poco permeanti all'interno di cellule tumorali ponendo le basi dell'elettrochemioterapia. Utilizzando impulsi di campo elettrico adeguati è inoltre possibile far penetrare frammenti di DNA all'interno di una cellula

(elettrotrasfusione genica) o indurre la fusione di due cellule sufficientemente vicine (elettrofusione cellulare).

### **2.1.3 Elettroporazione irreversibile**

Nel caso in cui l'impulso elettrico sia di durata ed intensità superiori ad una determinata soglia o che la durata dell'impulso sia troppo breve, si può verificare la situazione in cui la cellula non è in grado di tornare allo stato iniziale (chiusura dei pori). Ciò comporta la condizione di irreversibilità che caratterizza il tipo di fenomeno detto elettroporazione irreversibile.

L'elettroporazione irreversibile veniva usata durante gli anni '60 come metodo di sterilizzazione per cibi e liquidi ma ha recentemente trovato applicazione anche in campo medico. La scoperta che la distruzione della cellula è dovuta alla formazione di un numero elevato di canali sul doppio strato lipidico della membrana cellulare e non al danno termico subito, ha portato infatti l'elettroporazione irreversibile a diventare un valido metodo di ablazione in campo clinico [12]. Questa tecnica viene impiegata principalmente nella chirurgia oncologica per l'asportazione di piccoli noduli cancerosi solidi sia cutanei sia interni e per eliminare in modo selettivo le cellule tumorali senza danneggiare il tessuto circostante.

## **2.2 Electrochemioterapia**

L'elettrochemioterapia (ECT) è una tecnica clinica che sfrutta il principio dell'elettroporazione reversibile abbinata alla somministrazione di farmaci chemioterapici per il trattamento di alcuni tipi di tumore.

La scoperta degli effetti che l'elettroporazione reversibile ha sulla membrana cellulare permise, fin dagli anni '80, di studiare una sua eventuale applicazione in campo medico e più in particolare in campo oncologico. Si vide, infatti, che era possibile far passare, attraverso i pori che si formano sulla membrana della cellula elettroporata, delle macromolecole di farmaci chemioterapici riducendone l'effetto sistemico e aumentandone la citotossicità intrinseca [13] [14]. Questa tecnica permette quindi di utilizzare una dose minima di farmaco per avere una buona efficacia antitumorale. L'efficacia del farmaco è infatti legata al numero di molecole che riescono ad entrare nella cellula, mentre la tossicità è correlata alla quantità di farmaco che si disperde per via sistemica. Per far sì, quindi, che l'accumulo delle molecole all'interno della cellula tumorale sia tale da inibire la mitosi, si ha la necessità di iniettare una quantità molto più elevata di farmaco in chemioterapia classica rispetto all'ECT. Di

conseguenza, le molecole che non sono riuscite a legarsi alle proteine di membrana e quindi ad essere trasportate all'interno della cellula, si propagano in tutto il corpo per via sistemica facendo aumentare il rischio di effetti collaterali.

Ad oggi l'ECT è usata in ambito clinico per la cura di melanomi, sarcomi e altri tipi di tumori cutanei e subcutanei. Questo veloce sviluppo è dovuto proprio alla scoperta che alcuni antibiotici ed antitumorali, come la Bleomicina e il Cisplatino, attraverso l'elettroporazione aumentano notevolmente la loro citotossicità e quindi la capacità di agire sulla proliferazione delle cellule tumorali. Inoltre, la possibilità di operare direttamente in loco mediante l'applicazione di elettrodi di dimensioni adeguate, permette di avere un'azione mirata che limita le reazioni collaterali legate alla tossicità sistemica del farmaco [15]. L'ECT è quindi diventata una valida alternativa alle cure tumorali farmacologiche, in quanto migliora la qualità della vita dei pazienti sottoposti alla terapia.

Il trattamento con elettrochemioterapia ha una durata di circa 30 minuti e si sviluppa in tre fasi, durante le quali avviene l'ingresso del farmaco nelle cellule (Figura 3). Dopo aver somministrato il farmaco per via intratumorale o per via endovenosa, si applica un treno di impulsi di tensione di ampiezza e durata adeguate (ad es.: 8 impulsi con periodo di 200  $\mu$ s a 1000 V/cm). Sono proprio questi impulsi che creano il campo elettrico in grado di elettroporare la membrana della cellula. Durante la prima fase di applicazione dell'impulso elettrico si verifica l'apertura di pori nella membrana delle cellule nella zona sottoposta al trattamento. Durante la seconda fase avviene l'ingresso del farmaco per diffusione grazie all'aumento della permeabilizzazione della membrana. Al termine dei 30 minuti, si verifica la terza fase durante la quale la membrana cellulare richiude i pori intrappolando il farmaco all'interno della cellula [13].

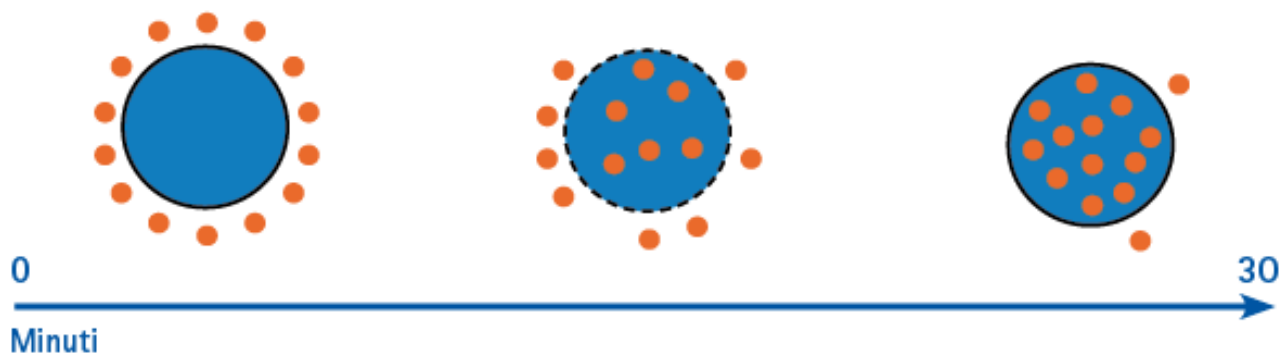


Figura 3. Procedura dell'elettrochemioterapia [1].

L'ECT offre notevoli vantaggi anche dal punto di vista dell'ospedalizzazione del paziente, in quanto il trattamento si completa nell'arco di 30 minuti, e si

può quindi fare in regime di Day Hospital senza ricorrere al ricovero. E' inoltre possibile ripetere più cicli senza precludere altri tipi di trattamenti.

Il limite di questa tecnica deriva dal fatto che non è possibile trattare tutti i tipi di tumori, infatti gli elettrodi finora prodotti raggiungono lo strato sub-cutaneo [14] o al massimo, mediante gli aghi lunghi, il tessuto connettivo e muscolare [16].

## 2.3 Principali testi citati nel capitolo

Titolo	Autori	Anno	Contenuti principali
Theory of electroporation: a review [2]	Weaver, Chizmadzhev	1996	L'articolo descrive le principali teorie riguardanti l'elettroporazione. Viene data particolare attenzione agli effetti sui tessuti biologici descrivendo la formazione di pori sulle membrane delle cellule elettroporate. Viene anche fornita una descrizione dettagliata della differenza tra elettroporazione reversibile e elettroporazione irreversibile.
Electrochemotherapy in treatment of tumors [14]	Sersa, Miklavcic, Cemazar, Rudolf, Pucihar, Snoj	2007	Basandosi sugli studi sia in vitro sia in vivo, gli autori offrono una panoramica sui principali trattamenti effettuati con ECT. L'articolo descrive anche le procedure della terapia e discute i risultati ottenuti durante i principali trials clinici.
Bases and rationale of the electrochemotherapy [15]	Mir	2006	L'autore offre una descrizione dei principi fondamentali che sono alla base dell'elettrochemioterapia, soffermandosi in particolare sul meccanismo d'azione dei farmaci associati ad elettroporazione delle membrane cellulari. Inoltre viene descritto il fenomeno di emostasi che si verifica nei vasi sanguigni che irrorano il tumore quando viene applicato il treno di impulsi elettrici per elettroporare le cellule.



### 3 Farmaci antitumorali

Nel secondo capitolo si sono brevemente descritti il fenomeno dell'elettroporazione e la tecnica dell'elettrochemioterapia. Si analizzano ora in particolare alcuni dei farmaci sperimentati per l'applicazione clinica dell'ECT focalizzando l'attenzione su diversi aspetti del trattamento:

- Scelta del farmaco;
- Infusione;
- Cambiamento della cinetica del farmaco somministrato;
- Efficacia del trattamento.

#### 3.1 Farmaci sperimentati per l'elettrochemioterapia

Nel corso di numerose sperimentazioni, si è scelto di testare *in vitro* diversi farmaci già noti per la loro efficacia nel contrastare la crescita tumorale ma anche per la loro elevata tossicità. Solamente la Bleomicina e il Cisplatino hanno poi trovato reale applicazione nella pratica clinica grazie alla risposta positiva avuta durante i test preliminari.

I test effettuati miravano all'ottenimento di una migliore efficacia per quanto riguardava il farmaco e quindi ad avere i seguenti effetti:

- Permettere una maggiore capacità della molecola infusa di oltrepassare la membrana plasmatica;
- Aumentare la citotossicità, ovvero la capacità del farmaco di recare danno alla cellula;
- Ridurre o addirittura annullare gli effetti collaterali;

Il terzo punto è stato ovviamente oggetto solo delle prove effettuate *in vivo*, mentre gli altri due sono stati prima verificati *in vitro* e successivamente *in vivo* mediante test su animali (topi, maiali, gatti e conigli) [17].

##### 3.1.1 Classi di farmaci

Le principali classi di farmaci chemioterapici testati per un loro eventuale utilizzo in ECT sono:

- Antibiotici antitumorali, derivati da vari ceppi di un fungo del sottosuolo, lo *Streptomyces*, tra i quali sono presenti:
  - Bleomicina;
  - Actinomicina D;
  - Mitomicina C;
  - Mitramicina.

- Agenti alchilanti o chemioterapici con possibile attività alchilante. Tra questi si annoverano:
  - Cisplatino;
  - Carboplatino;
  - Ciclofosfamide;
  - Melfalano.
- Alcaloidi vegetali derivati dalla pervinca come:
  - Vinblastina;
  - Vincristina.
- Taxani, esteri alcaloidi derivati da varie specie di alberi di tasso, tra i quali vi sono:
  - Paclitaxel;
  - Taxotere.
- Antimetaboliti come il Metotrexato;
- Antagonisti pirimidinici come il 5-fluorouracile.

**Tabella 1. Schema della durata dell'emivita e della classe di appartenenza dei farmaci testati *in vitro*. [18][19]**

Farmaco	Emivita	Classe di appartenenza
Bleomicina	2,5 ore	Antibiotici antitumorali
Cisplatino e carboplatino	30-100 ore	Agente chemioterapico neoplastico con possibile attività alchilante
Melfalano	1,5 ore	Agente alchilante polifunzionale
Metotrexato	3-15 ore	Antimetaboliti
Mitramicina	10 ore	Antibiotico impiegato nella terapia delle affezioni del metabolismo minerale osseo
Actinomicina D	36 ore	Antibiotico antitumorale
Adriamicina o doxorubicina	12-18 ore	Antibiotici tumorali antraciclinici
Ciclofosfamide	3-12 ore	Agente alchilante
Mitomicina C	8-48 minuti	Antibiotico antitumorale
5-fluorouracile	10-20 minuti	Antagonista pirimidinico
Vinblastina	24 ore	Alcaloide vegetale
Vincristina	19-155 ore	Alcaloide vegetale
Paclitaxel	5-6 ore	Tassano
Taxotere	86 ore	Tassano



In Tabella 1 vengono riportati i farmaci che furono sottoposti *in vitro* ad esperimenti con l'elettroporazione e la classe di antitumorali alla quale appartengono. Viene inoltre riportata la durata della loro emivita, ovvero il tempo richiesto per ridurre del 50% la quantità di farmaco presente nell'organismo.

### **3.1.2 Meccanismo d'azione e tipo di assorbimento**

Le classi di farmaci descritte nel paragrafo precedente mostrano un'azione simile dal punto di vista terapeutico in quanto bloccano la crescita tumorale inducendo la morte delle cellule nelle quali penetrano. Sono però molto diversi i meccanismi attraverso i quali giungono a questo risultato.

I principali meccanismi d'azione dei farmaci antitumorali sono:

- Rottura dei filamenti di DNA mediante la capacità di intercalarsi tra le basi azotate tipica degli antibiotici antitumorali;
- Trasferimento dei gruppi alchilici in posizioni occupate dalla guanina con conseguente scissione del filamento di DNA. Questo meccanismo d'azione è caratteristico degli agenti alchilanti;
- Capacità degli alcaloidi vegetali e dei tassani di agire sulla dinamica dei microtubuli e sulla struttura del fuso mitotico arrestando la mitosi cellulare;
- Inibizione di enzimi coinvolti nella replicazione cellulare con conseguente arresto della proliferazione, meccanismo d'azione tipico degli antimetaboliti;
- Formazione di complessi chimici da parte degli antagonisti pirimidinici che vengono incorporati nel DNA provocandone l'inibizione della sintesi.

Gli effetti collaterali, sistemici e cutanei, che si presentano nei pazienti sottoposti a chemioterapia sono principalmente dovuti all'elevata tossicità dei farmaci antitumorali. La quasi totalità delle molecole sperimentate per un'eventuale applicazione in ECT danno luogo a:

- Nausea e vomito;
- Depressione del midollo osseo;
- Carezza piastrinica;
- Perdita di capelli;
- Infiammazione delle mucose.

In casi meno frequenti si può andare incontro anche a tossicità a livello renale e a neuropatie.

In Tabella 2 vengono riportati il meccanismo d'azione e gli effetti collaterali propri dei farmaci antitumorali elencati precedentemente in Tabella 1.

**Tabella 2. Riassunto schematico del meccanismo d'azione e degli effetti collaterali dei farmaci testati in vitro [18].**

Farmaco	Meccanismo d'azione	Effetti collaterali
Bleomicina	Agisce legandosi al DNA di cui causa la frammentazione	Reazioni allergiche, febbre, ipotensione, edema della cute, fibrosi polmonare, mucosite, alopecia
Cisplatino e carboplatino	Non ancora ben definito, ma si ritiene che agiscano inibendo la sintesi del DNA e che siano in grado di interferire con tutte le fasi del ciclo cellulare	Nausea, vomito, mielosoppressione, tossicità renale, disfunzione epatica
Melfalano	Agisce trasferendo il gruppo alchilico al DNA della cellula causandone la morte	Mielosoppressione, nausea, vomito, alopecia, mucosite
Metotrexato	Inibisce l'azione dell'acido folico e della sua forma ridotta. Ciò comporta un'interruzione della sintesi del DNA, RNA e proteine	Inflammation delle mucose, depressione del midollo osseo, carenza di leucociti, carenza di piastrine
Mitramicina	Non noto, ma si ritiene blocchi la sintesi di RNA DNA-dipendente legandosi al magnesio	Carenza di piastrine, sanguinamento
Actinomicina D	Si lega alla doppia elica del DNA intercalandosi tra coppie adiacenti di citosina-guanina e ne inibisce la sintesi	Nausea, vomito, stomatite, alopecia, depressione del midollo osseo
Adriamicina o doxorubicina	Agisce inibendo la sintesi del DNA inserendosi tra le basi e bloccando l'attività dell'enzima topoisomerasi II, che comporta l'arresto della trascrizione e della replicazione del DNA stesso	Nausea, urine colorate di rosso, cardiotoxicità, depressione del midollo osseo, alopecia
Ciclofosfamide	Agisce come il melfalano	Nausea, vomito, mielodepressione, alopecia
Mitomicina C	Agisce alchilando il DNA e inibendone la sintesi	Nausea, piastrinopenia, leucopenia
5-fluorouracile	Inibisce la sintesi e la funzione del DNA formando un composto che viene incorporato nel DNA stesso e che lo danneggia in maniera permanente	Nausea, mucosite, diarrea, nefrotossicità, mielosoppressione
Vinblastina	Provoca arresto mitotico in metafase, disgregazione del fuso mitotico e interferenza nei processi di segregazione dei cromosomi	Nausea, vomito, mielodepressione, alopecia
Vincristina	Provoca l'arresto delle cellule nella metafase del ciclo mitotico	Neuropatia sensoriale periferica, incontinenza dello sfintere, ileo paralitico, convulsioni
Paclitaxel	Provoca un'inibizione della mitosi e della divisione cellulare	Nausea, vomito, ipotensione, aritmie, mielodepressione, neuropatie
Taxotere	Simile a paclitaxel	Ipersensibilità, rash cutanei, neurotossicità, ritenzione di liquidi

Ogni farmaco è caratterizzato anche da una particolare modalità di assorbimento all'interno delle cellule. I principali modi di assorbimento dei chemioterapici sono:

- Diffusione passiva, possibile per la presenza di una differente concentrazione tra l'interno e l'esterno della cellula;
- Diffusione passiva facilitata grazie al diverso gradiente di concentrazione tra l'interno e l'esterno della cellula e alla collaborazione di proteine carrier e canali ionici. La maggior parte delle molecole riesce a penetrare in questo modo all'interno della cellula;
- Trasporto attivo, che avviene grazie al legame che si forma tra le molecole di farmaco e le proteine di membrana.
- Endocitosi, ovvero l'internalizzazione di piccole molecole tramite la formazione di vescicole che inglobano le molecole stesse e le convogliano nel citoplasma.

### **3.1.3 Esperimenti *in vitro***

Già dall'inizio degli anni '90, Mir e Orlowski, pubblicarono i primi studi effettuati *in vitro* utilizzando i farmaci chemioterapici descritti in precedenza [20][21].

Questi studi hanno mostrato che molecole come il 5-fluorouracile e il Metotrexato non presentano alcuna differenza se somministrate in cellule elettroporate o meno, in quanto la loro ridotta dimensione permette un facile attraversamento della membrana plasmatica mediante diffusione passiva [15]. Ciò permette loro di agire sul DNA e di recare danno alla cellula inibendo la mitosi e la divisione cellulare.

Farmaci come il Paclitaxel, la Doxorubicina e l'Adriamicina agiscono in maniera simile [19] e non hanno avuto particolare successo associati ad elettroporazione nelle prove *in vitro*. L'elettroporazione, infatti, non modifica la modalità di assorbimento di queste molecole attraverso la membrana.

Per quanto riguarda la citotossicità dei farmaci testati, invece, solo per l'Actinomicina D risulta aumentare di 2-4 volte rispetto alla normale somministrazione (in condizioni ottimali e per un tempo limitato di esposizione delle cellule al farmaco). Questo è probabilmente dovuto al maggior numero di molecole che, mediante l'elettroporazione della membrana, riescono ad accumularsi all'interno della cellula. Sebbene però la citotossicità aumenti, l'efficacia del farmaco non risulta migliorata rispetto alla somministrazione standard, in quanto la cellula, a causa di un suo meccanismo di difesa, tende ad espellere le molecole di Actinomicina. Per questo motivo lo studio di una possibile combinazione di elettroporazione con infusione di Actinomicina D fu abbandonato [19].

La Bleomicina, nota in letteratura per essere una molecola non permeante, ovvero per non essere in grado di oltrepassare la membrana plasmatica senza l'ausilio di proteine carrier disposte sulla superficie cellulare, risultò in alcuni esperimenti essere il farmaco di maggior interesse se associato ad elettroporazione.

Orlowski e colleghi pubblicarono nel 1988 uno studio che dimostra un aumento di circa 5000 volte della citotossicità della Bleomicina quando associata ad elettroporazione [19]. Ciò è dovuto all'elevato numero di molecole che riescono ad oltrepassare la membrana plasmatica e alla loro capacità di diffondere più liberamente senza l'ausilio di proteine carrier, grazie ai pori formati dopo aver elettroporato la cellula [15]. Questo meccanismo, che verrà in seguito illustrato più dettagliatamente, destò grande interesse, tanto che se ne proseguì lo studio anche *in vivo*.

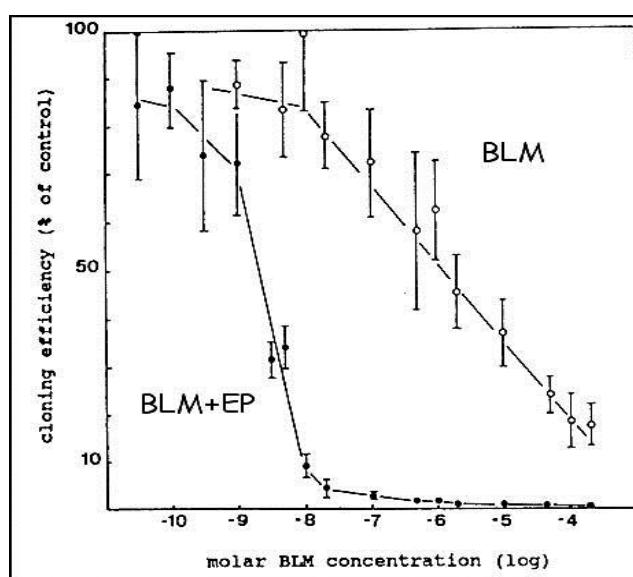


Figura 4. Grafico di Orlowski e Al. [22].

In Figura 4 viene proposto un grafico che riporta la capacità di duplicazione (clonaggio) del DNA da parte di cellule alle quali è stata somministrata solamente della Bleomicina e di altre sottoposte anche ad elettroporazione. E' di grande rilevanza notare come l'andamento della curva che rappresenta l'associazione di Bleomicina ed elettroporazione tenda a zero con maggiore velocità e quindi come si riduca drasticamente la percentuale di clonaggio del DNA rispetto al controllo. Il grafico in questione e gli andamenti riportati sono stati studiati da Orlowski et Al. [22]

Molecole poco permeanti, ossia con limitata capacità di entrare nella cellule dovuta alle loro caratteristiche fisico-chimiche, come il Cisplatino e il Carboplatino, furono studiate da Sersa et Al. [23][24]. Gli studi *in vitro* dimostrarono che l'elettroporazione favoriva l'ingresso delle molecole nella

cellula con un meccanismo simile a quello della Bleomicina ottenendo così un aumento della citotossicità di circa 80 volte, per il Cisplatino, e di circa 13 volte per il Carboplatino. Questa differenza comportò un accantonamento del Carboplatino a discapito del Cisplatino. Quest'ultimo venne infatti successivamente utilizzato anche negli studi *in vivo* e nella pratica clinica.

In Tabella 3 vengono riportati i valori di aumento della citotossicità dei farmaci studiati *in vitro* in associazione ad elettroporazione delle membrane cellulari.

Tabella 3. Aumento della citotossicità di farmaci dovuto all'elettroporazione [19].

Farmaci testati	Aumento
Bleomicina (molecola non permeante)	100-5000 volte
Cisplatino (molecola poco permeante)	3-80 volte
Carboplatino (molecola poco permeante)	10-13 volte
Metrotrexato, Melfalano, Mitramicina, Actinomomicina D, Adriamicina, Ciclofosfamide, Mitomicina C, Doxorubicina, 5-fluorouracile, Vinblastina, Vincristina, Paclitaxel, Taxotere	Nessuno

### 3.1.4 Esperimenti *in vivo*

I risultati ottenuti negli esperimenti di elettrochemioterapia con Bleomicina e Cisplatino hanno permesso di osservare che la maggior capacità di diffusione all'interno delle cellule tumorali da parte dei farmaci, osservata *in vitro*, era reale e che, quindi, l'aumento di citotossicità si verificava anche *in vivo*. Gli studi effettuati da Orłowski e Mir su tumori spontanei nei topi [17], dimostrarono che la citotossicità della Bleomicina dopo elettroporazione era maggiore di circa 300 volte e che gli effetti collaterali si riducevano fino quasi a scomparire.

Ci sono però delle sostanziali differenze tra gli studi effettuati *in vivo* rispetto a quelli *in vitro*, dovuti alla disomogeneità dei tessuti reali. Il tessuto reale infatti possiede molteplici caratteristiche, qui di seguito elencate, che contribuiscono a modificare la risposta del tessuto stesso al trattamento con elettrochemioterapia:

- i. Presenza di vasi sanguigni che irrorano le cellule. In particolare, nel tessuto tumorale, i vasi sanguigni permettono al tumore di crescere attraverso l'apporto di ossigeno e sostanze nutritive. Grazie all'elettroporazione questi vasi subiscono un momentaneo restringimento del diametro. Ciò comporta un minor afflusso di sangue nel tessuto e quindi sia un rallentamento della crescita del tumore sia

una minor probabilità che il farmaco somministrato venga disperso per via sistemica;

- ii. Diversa conformazione geometrica delle cellule all'interno del tessuto reale, che comporta una trasmissione degli effetti dell'elettroporazione tra una cellula e l'altra a causa della maggiore vicinanza;
- iii. Differente distribuzione delle cellule, che risultano essere maggiormente concentrate *in vivo* a parità di volume di tessuto trattato. Questa differenza porta una diversa distribuzione del farmaco nel tessuto *in vivo* e quindi una maggiore difficoltà delle molecole di disporsi in prossimità delle membrane cellulari. Nella situazione *in vitro* la diffusione di farmaco è facilitata dalla presenza di soluzione fisiologica liquida, iniettata per occupare lo spazio libero tra una cellula e l'altra, che permette un passaggio più semplice delle molecole.
- iv. Presenza della risposta immunitaria del sistema. Il sistema immunitario dell'organismo sede del tumore cerca di combattere le cellule cancerogene che riconosce come estranee e collabora così con la terapia farmacologica somministrata al paziente.

i. Presenza dei vasi sanguigni

E' noto in letteratura medica che la presenza di vasi sanguigni che irrorano le cellule tumorali comporta una dislocazione del farmaco rispetto al sito di iniezione, in quanto la circolazione sanguigna tende a distribuirlo in tutto il tessuto circostante con una conseguente diminuzione dell'efficacia [19]. Le molecole si diffondono, infatti, per via sistemica portando ad un accumulo del farmaco nel sangue che lo distribuisce in tutto il corpo, con conseguenti effetti collaterali anche in siti diversi da quello di iniezione. Questo porta, a parità di dose, ad una diminuzione dell'efficacia antitumorale del farmaco somministrato, in quanto una minor quantità di molecole riesce a disporsi in prossimità delle membrane cellulari e ad essere trasportata all'interno delle cellule malate.

Elettroporando il tumore, inoltre, diminuisce temporaneamente (la circolazione ritorna normale nell'arco di 24 ore) la fuoriuscita di sangue nel sito trattato di circa l'80%, inducendo così una morte per apoptosi alle cellule cancerogene private del loro nutrimento [19]. Questo fenomeno di emostasi è dovuto ad una contrazione del tessuto muscolare che riveste i vasi sanguigni che si verifica per lo stimolo dato dagli impulsi elettrici rilasciati durante l'elettroporazione.

ii. Conformazione geometrica del tessuto reale

Anche la conformazione geometrica del tessuto e la distribuzione delle cellule risulta notevolmente differente se studiata su un tessuto *in vivo* invece che *in vitro* [19]. Negli studi *in vitro*, infatti, la concentrazione di cellule nel

volume in esame risulta essere molto minore rispetto ai tessuti reali. Per questo motivo, l'applicazione del treno di impulsi di campo elettrico permeabilizza ogni cellula singolarmente, senza che questa subisca l'influenza delle cellule vicine.

Al contrario, la maggior vicinanza tra le cellule che si riscontra *in vivo* implica una diversa distribuzione del campo elettrico. La permeabilizzazione cellulare nei tessuti reali risulta quindi essere un fenomeno legato sia agli impulsi elettrici ma anche alla distanza tra le cellule stesse [11][25].

### iii. Distribuzione delle cellule nel tessuto

La concentrazione e la dislocazione delle cellule nel tessuto reale, differenti da quelle *in vitro*, comportano una diversa distribuzione delle molecole di farmaco sulla superficie cellulare. Questo implica una difficoltà maggiore nel quantificare l'effettivo numero di molecole assorbite da una cellula rispetto ad un'altra a lei prossima [19]. La vicinanza tra le cellule *in vivo*, infatti, non permette al farmaco di distribuirsi uniformemente in prossimità delle membrane cellulari e non garantisce un assorbimento di un numero simile di molecole in tutte le cellule. *In vitro* invece la diffusione del farmaco è garantita dalla distanza tra le cellule, che, avendo una concentrazione minore rispetto al caso *in vivo*, non ostacolano la distribuzione delle molecole in tutto il volume in esame ma anzi la rendono più omogenea [19].

### iv. Risposta immunitaria del sistema

Nello studio *in vivo* dei farmaci chemioterapici si deve tener conto della risposta immunitaria degli animali sottoposti ai test. Le cellule, infatti, tendono ad espellere il farmaco mediante un meccanismo di difesa che sfrutta le pompe e i canali ionici. Per ovviare a questo, Mir e colleghi, studiarono la possibilità di combinare ECT e terapia immunologica, somministrando agenti capaci di modificare la risposta immunitaria biologica degli animali trattati [26].

Gli effetti ottenuti somministrando citochine e linfochine<sup>1</sup> sono principalmente due:

- Un aumento dell'effetto locale del farmaco antitumorale;
- L'ottenimento di un effetto antitumorale a livello sistemico.

Studi *in vivo* effettuati sui topi dimostrano che un'immunostimolazione di Interleuchina-12 (IL-12), un ormone antitumorale, abbinata all'infusione di Bleomicina, permette un maggiore effetto curativo [15]. L'IL-12 è infatti in grado di attivare i linfociti di tipo T deputati alla distruzione delle cellule tumorali e di renderli parte attiva nell'azione di riduzione del tumore.

---

<sup>1</sup> Citochine: proteine di piccole dimensioni prodotte da diversi tipi di cellule, in grado di attivare la funzionalità di altre cellule. Le citochine prodotte dalle cellule del sistema immunitario (macrofagi, linfociti) sono dette linfochine e trasmettono messaggi in grado di attivare funzioni specializzate come la riproduzione e la differenziazione cellulare. Mediante la secrezione di queste molecole un leucocita può controllare l'attività di altri leucociti. Le linfochine più importanti sono le interleuchine, in grado di avere un'azione immuno-modulante [18].

## 3.2 I due farmaci utilizzati in ECT: Bleomicina e Cisplatino

Come anticipato in precedenza, solo Bleomicina e Cisplatino furono utilizzati per l'elettrochemioterapia. In questo paragrafo verrà analizzato in dettaglio il trattamento con questi due farmaci.

### 3.2.1 Bleomicina

La Bleomicina fa parte della classe degli antibiotici antitumorali e si è rivelata di grande utilità nella chemioterapia per il trattamento di neoplasie maligne. Agisce legandosi al DNA, di cui causa, mediante la formazione di radicali liberi, la rottura di uno o entrambi i filamenti, e del quale inibisce la sintesi.

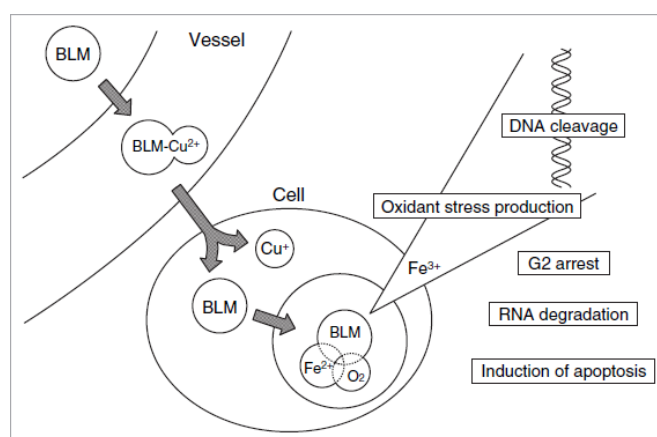


Figura 5. La figura mostra il meccanismo di ingresso di una molecola di Bleomicina all'interno di una cellula [27].

In Figura 5 è rappresentato il meccanismo d'azione della Bleomicina. Si può notare come la molecola di Bleomicina attraversi la membrana cellulare legandosi ad uno ione di rame dal quale si divide appena penetrata all'interno della cellula. Successivamente, oltrepassata la membrana nucleare, la Bleomicina si lega ad uno ione di ferro e ad un atomo di ossigeno formando un complesso metallico che provoca un effetto ossidante nella cellula. Questo meccanismo di ossidazione induce la formazione di radicali liberi che agiscono legandosi al DNA e causandone la rottura dei filamenti [27]. Ciò comporta, mediante una reazione a cascata, l'arresto della fase mitotica e la degradazione dell'RNA che portano la cellula a morte per apoptosi.

La Bleomicina può essere somministrata in modi diversi:

- Via intramuscolare;
- Via sottocutanea;
- Via endovenosa.

Questo comporta un notevole vantaggio dal punto di vista clinico in quanto permette la scelta di una modalità di somministrazione differenziata in base al tipo tumore e alla sensibilità del paziente.



Il farmaco presenta tossicità a livello polmonare che può arrivare ad essere fatale nel caso di pazienti anziani o con pregresse patologie dei polmoni [18].

A causa delle sue caratteristiche fisico-chimiche, la Bleomicina risulta essere una molecola non-permeante, il cui assorbimento all'interno della cellula è limitato dalla più o meno numerosa presenza di proteine di membrana addette al trasporto cellulare. E' proprio mediante le proteine presenti sulla superficie cellulare, infatti, che il farmaco viene trasportato all'interno della cellula. A causa però della dimensione delle molecole e delle sue caratteristiche fisico-chimiche, solo una minima parte del farmaco iniettato riesce a legarsi con le proteine carrier e ad oltrepassare il doppio strato lipidico che funge da barriera. Le rimanenti molecole si diffondono per via sistemica, essendo trasportate dai vasi sanguigni in tutto il corpo, causando nei pazienti effetti collaterali sia cutanei sia sistemici.

La Bleomicina ha un'emivita di circa 2,5 ore e viene successivamente eliminata per via renale [18]; ciò comporta cautela nella somministrazione in pazienti con nefropatie.

E' indicata nel trattamento dei linfomi di Hodgkin e non Hodgkin, nei tumori della testa e del collo, nei carcinomi della cute, della vulva e della cervice.

Negli ultimi anni, la Bleomicina era stata quasi del tutto abbandonata nell'uso chemioterapico a causa proprio dell'elevata tossicità e dei noti effetti collaterali, quali eritema flagellato, iperpigmentazione, fibrosi, fenomeno di Raynaud e alopecia, che si manifestano a causa della dispersione del farmaco per via sistemica [27].

### **3.2.2 Bleomicina in elettrochemioterapia**

La Bleomicina ha trovato nuova applicazione in medicina con la scoperta dell'elettroporazione e della sua applicazione clinica; infatti, la capacità di essere poco permeante, ma al contempo altamente citotossica, ha portato questo antibiotico ad essere rivalutato nell'utilizzo come chemioterapico.

I principali vantaggi ottenuti dall'utilizzo di questo farmaco in ECT sono stati:

- Un aumento della citotossicità intrinseca di circa 300 volte [19];
- Un miglioramento nella capacità delle molecole di Bleomicina di oltrepassare la membrana plasmatica delle cellule tumorali elettroporate. La formazione dei pori nella membrana plasmatica permette infatti una libera diffusione del farmaco nella cellula;
- La necessità di sottoporre i pazienti a meno sedute di terapia per garantire l'efficacia della cura (in molti casi è sufficiente una sola seduta di ECT per raggiungere la completa regressione del tumore);

- Una scomparsa quasi totale della tossicità del farmaco a livello sistemico e una consistente riduzione degli effetti collaterali cutanei.

Tutti questi vantaggi sono dovuti all'effetto dell'elettroporazione sulle cellule tumorali. Questo fenomeno infatti permette il passaggio delle molecole all'interno della cellula grazie alla formazione di pori sulla membrana con conseguente aumento della citotossicità. Inoltre, mediante l'induzione dell'effetto di vasocostrizione, impedisce al farmaco di essere disperso per via sistemica.

Tuttavia, l'utilizzo della Bleomicina in ECT rispetto a quello in chemioterapia classica ha anche degli svantaggi:

- Manifestazioni cutanee nel sito di applicazione degli elettrodi, dovute oltre che al farmaco anche agli impulsi elettrici;
- Possibilità di intervento solo su alcuni tipi di tumore;
- Nel caso di trattamenti ripetuti, possibilità di incorrere in un accumulo eccessivo di farmaco nel paziente con conseguente reazione dell'organismo alla tossicità;
- Esclusione dalla terapia dei pazienti portatori di pacemaker a causa della pericolosità del campo elettrico applicato.

In Tabella 4 vengono descritte le principali differenze nella somministrazione di Bleomicina nelle due diverse terapie: ECT e chemioterapia. È importante notare come nella somministrazione per via endovenosa la quantità di farmaco iniettata sia la stessa per entrambe le terapie, la sostanziale differenza sta quindi nella dose di accumulo del farmaco dovuta alla ripetizione delle applicazioni del trattamento.

L'elettrochemioterapia con somministrazione di Bleomicina viene anche associata, in vivo e in applicazioni cliniche, ad immunoterapia, così da controllare la risposta immunitaria del soggetto e permettere una migliore efficacia del farmaco. Mediante il controllo di proteine che hanno la capacità di modulare la partecipazione dei linfociti, si è visto che è possibile indurre l'attacco del sistema immunitario nei confronti del tumore coadiuvando l'effetto dell'ECT. Inoltre è possibile attraverso le stesse proteine controllare il rigetto del farmaco da parte della cellula, evitando così l'inevitabile riduzione di efficacia [26].

**Tabella 4. Confronto tra Bleomicina in chemioterapia classica ed in elettrochemioterapia [18][28][29].**

Bleomicina	Chemioterapia classica	Elettrochemioterapia
Somministrazione	<ul style="list-style-type: none"> <li>• via endovenosa</li> <li>• via sottocutanea</li> <li>• via intramuscolare</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• via endovenosa</li> <li>• via intratumorale</li> </ul>
Posologia <sup>2</sup>	Da 10000 a 15000 UI/m <sup>2</sup> in base al tipo di tumore da trattare	Via endovenosa: 15000 UI/m <sup>2</sup> Via intratumorale: da 250 UI/cm <sup>3</sup> a 1000 UI/cm <sup>3</sup> (in base al volume del tumore) disciolta in acqua sterile
Tossicità	Reazioni allergiche, febbre, ipotensione, edema della cute, fibrosi polmonare, mucosite, alopecia	Reazioni allergiche, edema della cute, fibrosi polmonare
Controindicazioni	Pazienti in gravidanza, pazienti affetti da morbo di Raynaud o da altre patologie che coinvolgono il sistema circolatorio periferico, pazienti affetti da patologie polmonari, nota reazione allergica a bleomicina, livello di creatinina >150µmol/l	Pazienti con pacemaker (solo se il tumore è presente a livello della parte anteriore del torace), pazienti in terapia anticoagulante, pazienti con patologie polmonari, nota reazione allergica a bleomicina, livello di creatinina >150µmol/l (non sono noti casi di pazienti in gravidanza)
Indicazioni terapeutiche	Linfomi di Hodgkin e non Hodgkin, tumore delle cellule germinali, neoplasie della testa e del collo, carcinomi squamosi della cute, della cervice e della vulva.	Metastasi cutanee e sottocutanee, melanomi e sarcomi di testa e collo, recidive cutanee di tumori al seno, epitelomi, basaliomi, recidive di melanoma del canale anale, metastasi cutanee da tumori profondi

<sup>2</sup> Nelle varie indicazioni terapeutiche presenti in letteratura è possibile trovare la posologia della Bleomicina espressa in unità di misura diverse, quali mg, UI o U. L'unità internazionale UI è l'unità di misura più utilizzata ed indica la quantità di sostanza necessaria a produrre un determinato effetto riconosciuto a livello internazionale. Le UI sono state introdotte per unificare i valori di unità U a livello mondiale. Il valore in mg si riferisce all'attività in mg e non al peso del principio attivo del farmaco (Bleomicina solfato). Nel caso della Bleomicina, 1 mg di sostanza secca equivale a 1500-2000 UI. Si noti che la conversione è strettamente legata all'attività del principio attivo e quindi non uniformabile anche ad altre sostanze [30].

### **3.2.3 Cisplatino**

Il cisplatino è un complesso metallico inorganico derivato dal platino; è in grado di uccidere le cellule in tutte le fasi del ciclo mitotico, inibisce la sintesi del DNA e si unisce ad esso attraverso legami crociati tra i filamenti complementari. Il meccanismo d'azione del cisplatino non è ancora stato del tutto definito, ma si ritiene che riesca a formare legami covalenti principalmente con la guanina ed in secondo luogo anche con adenina e citosina [18].

Il cisplatino è una molecola poco permeante che riesce ad entrare nelle cellule per diffusione dove viene poi convertita nella sua forma attiva. Può essere somministrato per via endovenosa o per via intratumorale [13] e risulta efficace nel trattamento di un ampio spettro di neoplasie, quali i tumori polmonari, tumori dell'esofago e dello stomaco, del capo e del collo, del tratto genitourinario. In associazione a Bleomicina e Vinblastina, offre alte percentuali di guarigione del carcinoma del testicolo [18].

Tra gli effetti collaterali dovuti alla somministrazione di Cisplatino si riscontrano nausea, vomito e mielosoppressione, oltre a rari episodi di disfunzione epatica e tossicità renale, quest'ultima diminuibile mediante una massiccia idratazione del paziente attraverso infusione di soluzione salina eventualmente associata a diuretici [18].

Sono noti in letteratura casi di perdita d'udito in pazienti sottoposti a chemioterapia con Cisplatino [30].

### **3.2.4 Cisplatino in elettrochemioterapia**

Già noto ed utilizzato come antitumorale in chemioterapia classica, il Cisplatino ha trovato applicazione anche in elettrochemioterapia per il trattamento di melanomi. Uno studio clinico condotto da Sersa et Al. nel 2000, ha evidenziato come la percentuale di guarigione di melanomi del corpo umano passi da un 19% (trattamento con somministrazione classica di Cisplatino) a un 82% quando trattati in ECT con Cisplatino [15].

I vantaggi principali dell'utilizzo di questo farmaco in ECT sono simili a quelli visti nel caso di trattamento con Bleomicina:

- Maggiore citotossicità del Cisplatino se associato ad elettroporazione;
- Aumento del numero di molecole che riescono ad entrare nelle cellule tumorali;
- Diminuzione degli effetti collaterali;
- Possibilità di alternare Bleomicina e Cisplatino in ECT al fine di evitare un accumulo di farmaco in caso di trattamenti ripetuti [15].

Studi in vitro [23], condotti da Sersa e colleghi nel 1995, dimostrarono che, associando questo farmaco ad elettroporazione delle cellule, la citotossicità

intrinseca del farmaco stesso risultava maggiore di circa 80 volte rispetto a condizioni fisiologiche normali. Ciò avviene perché un numero più elevato di molecole riesce ad entrare nelle cellule tumorali e ad inibirne la duplicazione.

L'elettroporazione delle cellule tumorali, infatti, aumenta la permeabilità delle membrane permettendo così il passaggio di molecole di Cisplatino, oltre che per diffusione, anche attraverso i pori che si formano nella parete cellulare [15].

Come visto nel caso della Bleomicina, il maggiore accumulo di farmaco all'interno delle cellule tumorali, oltre che ad aumentarne la citotossicità, comporta anche una minor dispersione per via sistemica. La ridotta probabilità che molecole di farmaco si possano accumulare in siti diversi da quello trattato, comporta una notevole diminuzione degli effetti collaterali a livello sistemico.

Un aspetto molto importante dell'utilizzo del Cisplatino in elettrochemioterapia è la possibilità di sostituirlo alla Bleomicina nel caso in cui si registrino manifestazioni allergiche a quest'ultima (anche dopo diverse somministrazioni) o per ridurre l'accumulo nei pazienti sottoposti a trattamenti ripetuti [15][29].

L'elettrochemioterapia con Cisplatino può essere somministrata in due diversi modi:

- Per via endovenosa;
- Per via intratumorale.

L'infusione endovenosa del farmaco viene utilizzata raramente in ECT, in quanto prevede un dosaggio simile a quello usato in chemioterapia classica, con una differenza non sostanziale di citotossicità (rispetto a quella della Bleomicina) con effetti collaterali maggiori rispetto alla somministrazione intratumorale.

La somministrazione per via intratumorale, invece, è più comune nel trattamento con elettrochemioterapia e necessita di dosi differenti in base alle dimensioni del tumore da trattare ( $0,5 \text{ mg/cm}^3$ ). L'applicazione del treno di impulsi elettrici per elettroporare le cellule e favorire l'ingresso del farmaco inizia circa 10 minuti dopo l'infusione di Cisplatino [29] seguendo una procedura uguale a quella dell'ECT con Bleomicina.

Anche nel caso di elettrochemioterapia con somministrazione di Cisplatino, si riscontra l'effetto di vasocostrizione temporanea dovuta all'applicazione degli impulsi elettrici. I benefici che ne conseguono sono infatti dovuti all'elettroporazione e non al farmaco iniettato [19].

Per quanto riguarda la partecipazione della risposta immunitaria dell'organismo con tumore da trattare, si trovano in letteratura studi simili a quelli effettuati per la Bleomicina, anche per l'ECT con Cisplatino. Teissè ha dimostrato, compiendo test sui cavalli, come l'immunostimolazione del gene Intereuchina-12 permetta di controllare la risposta del sistema immunitario al

momento dell'infusione di Cisplatino e, quindi, di modulare l'espulsione del farmaco dalla cellula per mezzo delle pompe ioniche [15].

Recenti studi hanno dimostrato un notevole aumento dell'efficacia antitumorale nell'utilizzo dell'elettrochemioterapia con Cisplatino associata a radioterapia [13].

In Tabella 5 vengono riportate le principali differenze e similitudini nella somministrazione di Cisplatino in elettrochemioterapia e in chemioterapia classica.

**Tabella 5. Confronto Cisplatino in chemioterapia classica ed elettrochemioterapia [30][18][29].**

Cisplatino <sup>3</sup>	Chemioterapia classica	Elettrochemioterapia
Somministrazione	<ul style="list-style-type: none"> <li>via endovenosa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>via endovenosa</li> <li>via intratumorale</li> </ul>
Posologia <sup>4</sup>	15-20 mg/m <sup>2</sup> al giorno per 5 giorni o 50-70 mg/m <sup>2</sup> come dose singola ogni 3 settimane	Via endovenosa: come chemioterapia classica. Via intratumorale: da 0,25 mg/cm <sup>3</sup> a 1 mg/cm <sup>3</sup> in base al volume del tumore
Tossicità	Nausea, vomito, mielosoppressione, tossicità renale, neuropatia periferica, disfunzione epatica	Non nota, ma si ritiene essere simile a quella in chemioterapia classica
Controindicazioni	Pazienti in gravidanza o allattamento, pazienti con compromessa funzionalità renale, pazienti con depressione midollare, pazienti con menomazioni dell'udito, pazienti con nota ipersensibilità al farmaco e ai derivati del platino	Pazienti con pacemaker (solo se il tumore è presente a livello della parte anteriore del torace), pazienti in terapia anticoagulante, pazienti con patologie renali, nota reazione allergica a cisplatino, pazienti con depressione midollare, pazienti con menomazioni dell'udito, pazienti in gravidanza o allattamento
Indicazioni terapeutiche	Tumori polmonari, tumori dell'esofago e dello stomaco, neoplasie del capo e del collo, del tratto genito-urinario (in particolare del testicolo, dell'ovaio e della vescica), carcinoma non seminomatoso del testicolo (in associazione a Bleomicina e Vinblastina)	Metastasi cutanee e sottocutanee, melanomi e sarcomi di testa e collo, recidive cutanee di tumori al seno, epiteliomi, basaliomi, recidive di melanoma del canale anale, metastasi cutanee da tumori profondi

<sup>3</sup> Considerando Cisplatino Teva® ev 50mg/100ml.

<sup>4</sup> La posologia del Cisplatino viene espressa in mg di principio attivo in quanto in chemioterapia si utilizza questa sostanza pura disciolta in soluzione fisiologica.

### 3.2.5 Differenze e analogie del trattamento di ECT con Bleomicina e con Cisplatino

Il trattamento in ambito clinico di tumori e di metastasi tumorali si avvale dell'utilizzo di due farmaci chemioterapici: la Bleomicina e il Cisplatino.

Anche se la scelta di utilizzare un farmaco piuttosto che l'altro è determinata da diversi fattori, che verranno in seguito descritti, è d'obbligo premettere che la Bleomicina ha assunto un ruolo da protagonista in questo tipo di trattamento. Ciò è dovuto principalmente agli incoraggianti risultati ottenuti *in vitro* e *in vivo*, che si sono poi dimostrati tali anche nelle successive applicazioni cliniche. In particolare, la preferenza di utilizzo della Bleomicina rispetto al Cisplatino è dovuta a:

- Elevata efficacia della Bleomicina sia se somministrata per via endovenosa sia intratumorale, mentre il Cisplatino somministrato per via endovenosa non ha ottenuto risultati soddisfacenti [14];
- Dimostrato aumento della citotossicità intrinseca maggiore per la Bleomicina che per il Cisplatino [19];
- Favorevole profilo di tossicità del farmaco sulle patologie trattabili con ECT [31];
- Maggiore efficacia rispetto al Cisplatino nell'utilizzo in pazienti che presentano un numero elevato di noduli cancerosi [32].

Studi clinici pubblicati nel 1991 da Mir et Al., hanno dimostrato che entrambi i modi di somministrazione della Bleomicina, endovenosa e intratumorale, sono efficaci nella terapia di melanomi, mentre per quanto riguarda il Cisplatino l'infusione intratumorale è risultata essere decisamente più efficace di quella endovenosa [33].

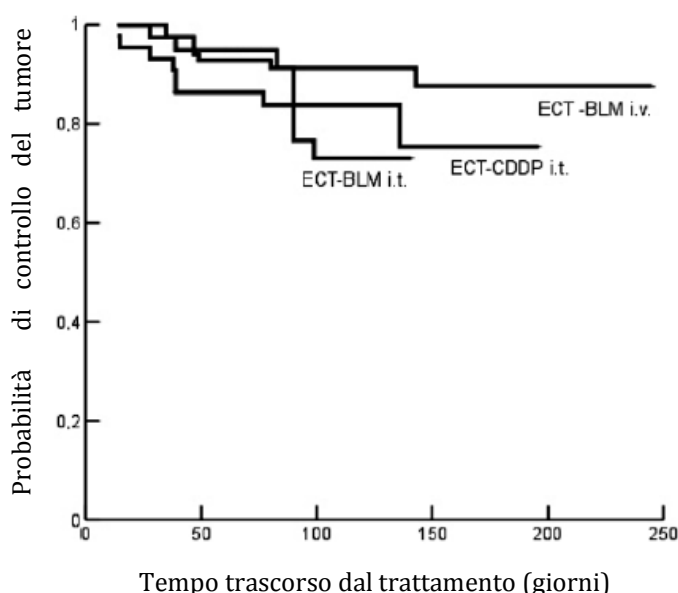


Figura 6. Grafico sull'andamento del controllo dei tumori locali mediante trattamento con elettrochemioterapia con infusione endovenosa di Bleomicina (ECT-BLM i.v.; 86 noduli) o intratumorale (ECT-BLM i.t.; 41 noduli) e con somministrazione intratumorale di Cisplatino (ECT-CDDP i.t.; 44 noduli) [32].

Il grafico in Figura 6 mostra l'andamento del controllo dei tumori locali sottoposti ad ECT con diverse somministrazioni di Bleomicina e di Cisplatino. Si può notare come l'ECT con infusione di Bleomicina sia intratumorale (i.t.) sia endovenosa (i.v.) (curve ECT-BLM i.t. e ECT-BLM i.v.) risulti avere un'elevata probabilità di successo già nei primi giorni successivi al trattamento. Dopo 150 giorni dal trattamento una completa regressione dei noduli si è osservata ancora nei pazienti sottoposti ad ECT con somministrazione di Bleomicina per endovena. Una buona risposta si è avuta anche nell'ECT con Cisplatino intratumorale (curva ECT-CDDP i.t.); infatti, anche se la probabilità di controllo del tumore è meno elevata nei giorni subito successivi al trattamento, si può notare come si mantenga costante anche dopo 4 mesi dalla terapia [32].

L'efficacia del trattamento con Bleomicina, in particolar modo se somministrata per via endovenosa, è dovuta principalmente all'effetto della citotossicità intrinseca, che aumenta considerevolmente se l'infusione del farmaco è seguita da elettroporazione. Studi effettuati da Sersa e colleghi, hanno mostrato che *in vivo* questo aumento era di circa 300 volte per la Bleomicina e di 2-4 volte per il Cisplatino [19], confermando così le aspettative date dagli studi *in vitro*. Il notevole aumento della tossicità cellulare della Bleomicina dovuto all'effetto dell'elettroporazione, ha permesso di osservare che una singola molecola di farmaco è in grado di causare dalle 10 alle 15 rotture lungo i filamenti del DNA [19]. E' proprio la capacità di indurre la morte delle cellule tumorali mediante l'iniezione di un numero considerevolmente contenuto di molecole che ha permesso a questo farmaco di diventare il principale antineoplastico nel trattamento con elettrochemioterapia.

Essendo maggiore l'efficacia di elettrochemioterapia con Bleomicina, è raccomandato l'utilizzo di questa tecnica nel trattamento di pazienti con un numero elevato di noduli o con tumori locali di grandi dimensioni, mentre l'ECT con Cisplatino è preferita per la cura di un numero ridotto di piccoli noduli [15].

La scelta di utilizzare l'elettrochemioterapia con Cisplatino, anche se lievemente meno efficace di quella con Bleomicina, risulta essere conveniente come alternativa nei trattamenti ripetuti [15]. La ripetizione di più trattamenti di ECT con somministrazione di Bleomicina potrebbe causare, infatti, un accumulo eccessivo di farmaco nel paziente, che potrebbe a sua volta comportare la manifestazione di effetti collaterali sistemici dose-dipendenti.



### 3.3 Principali testi citati nel capitolo

Titolo	Autori	Anno	Contenuti principali
Bleomycin and the skin [27]	Yamamoto	2006	L'articolo descrive i vari utilizzi della Bleomicina come farmaco chemioterapico e la sua azione citotossica all'interno delle cellule tumorali. Viene poi fatta una dettagliata descrizione degli effetti collaterali indotti dalla somministrazione del farmaco nei pazienti.
Clinical aspects of electroporation (cap. 6) [19]	Silve, Mir	2011	Il capitolo 6 del testo citato descrive il concetto di elettrochemioterapia a partire dalla possibilità che molecole di dimensioni elevate permeino all'interno delle cellule elettroporate. Vengono inoltre descritti i farmaci sottoposti a test <i>in vitro</i> per verificare la possibilità di un loro eventuale utilizzo in ECT. Alla fine del capitolo sono elencate le differenze che si riscontrano tra tessuto <i>in vitro</i> e tessuto reale e l'influenza che queste hanno sulla cinetica delle molecole del farmaco associato ad elettroporazione.



## 4 Trials clinici effettuati in elettrochemioterapia

Dopo i numerosi studi *in vitro* ed *in vivo* effettuati, al fine di avere una più completa conoscenza degli effetti dell'elettrochemioterapia, si è passati alla sperimentazione clinica su pazienti oncologici. Le prime pubblicazioni riguardanti gli studi clinici dell'elettrochemioterapia si trovano già nel 1991 [34], seguiti da numerosi altri. Furono studiate le risposte ai trattamenti sia con Bleomicina sia con Cisplatino su differenti tipi di tumori in condizioni cliniche a volte completamente diverse tra loro. Fu per questa non omogeneità di studi e di risultati che, nel 2006, si decise di pubblicare un protocollo di utilizzo dell'elettrochemioterapia in ambito clinico, denominato European Standard Operating Procedures of electrochemotherapy (ESOPE).

In questo capitolo, verranno analizzati i trials clinici effettuati suddividendo quelli pre-ESOPE da quelli post-ESOPE.

### 4.1 Definizione di trial clinico

Si definisce trial clinico, o studio clinico, una ricerca condotta su nuovi farmaci, dispositivi medici o strategie terapeutiche al fine di fare una valutazione preliminare sulla sicurezza e di fornire un profilo della risposta ottenuta su pazienti umani, spesso volontari.

Nella storia della medicina, i trials clinici furono introdotti per la prima volta da Avicenna ne "Il Canone della Medicina" del 1025, che pose le basi dei protocolli moderni scrivendo una serie di regole da seguire durante la sperimentazione di nuovi farmaci e principi attivi. Avicenna credeva infatti che fosse necessario raccogliere gli esiti ottenuti nell'applicazione di una determinata terapia su più pazienti per poterli confrontare e avere un quadro d'insieme dell'efficacia e degli effetti collaterali.

Con l'evoluzione della medicina si è sentita la necessità di avere norme più complete per poter catalogare la notevole varietà di ricerche effettuate in campo medico. Gli studi clinici sono stati perciò suddivisi in categorie a seconda dell'ambito medico e terapeutico.

Il National Institutes of Health<sup>5</sup> fornisce una classificazione in base a 7 differenti tipi di trials [35]:

- Trials preventivi: che raccolgono gli studi effettuati sulla popolazione al fine di prevenire l'insorgenza di malattie e di creare nuovi vaccini;
- Trials di Screening: ricerche di nuove metodiche di prevenzione secondaria (diagnosi precoce di patologie);
- Trials diagnostici: studi su nuove tecniche di diagnosi;

---

<sup>5</sup> Il National Institutes of Health è un'agenzia del Dipartimento Sanitario del governo statunitense che si occupa di regolamentare le ricerche in campo biomedico e sanitario.

- Trials terapeutici: hanno il compito di testare nuove tecniche terapeutiche e nuovi farmaci;
- Trials sulla qualità della vita: studi sui possibili miglioramenti della qualità della vita in pazienti affetti da patologie croniche anche invalidanti;
- Trials genetici: studi effettuati sulla correlazione tra i profili genetici e alcune patologie;
- Trials epidemiologici: ricerche effettuate sulle cause e gli effetti dovuti a patologie che si manifestano in gruppi di persone.

I trials clinici prima di essere completi devono superare 4 diverse fasi di sperimentazione:

- Fase I che testa su un gruppo ristretto di volontari (circa 50 persone) la tossicità del farmaco e i rischi sui pazienti dovuti alla somministrazione.
- Fase II che avviene solo dopo il superamento della prima fase e che valuta la quantità di farmaco necessaria per l'efficacia della terapia e i risultati ottenuti. In questa fase si procede ad una sperimentazione su un gruppo di volontari più numeroso (circa 200-300 persone);
- Fase III durante la quale viene effettuata una valutazione generale della terapia, in quanto viene sottoposto al trattamento un numero elevato di pazienti;
- Fase IV in cui vengono effettuati trials di sorveglianza sulla sicurezza e di supporto tecnico per farmaci già immessi sul mercato.

L'elettrochemioterapia è stata sottoposta a numerosi trials di fase II e di fase III che hanno dimostrato la sua efficacia antitumorale nell'80% dei casi trattati.

## **4.2 Studi clinici effettuati prima dell'ESOPE**

Prima della stesura del protocollo ESOPE, che racchiude tutte le norme cliniche ed i parametri necessari a verificare la riuscita o meno dell'elettrochemioterapia, furono pubblicati numerosi studi.

Il primo trial clinico riguardante il trattamento di ECT su esseri umani fu effettuato all'Istituto Gustave-Roussy in Francia e pubblicato nel 1991 [34]. Questo studio riguardava in particolare l'analisi dei risultati ottenuti dopo aver sottoposto ad elettrochemioterapia con Bleomicina otto pazienti affetti da ricorrenti o progressivi carcinomi a cellule squamose della testa e del collo [19][36]. Gli incoraggianti risultati ottenuti permisero di svolgere ulteriori ricerche testando su altri tipi di neoplasie maligne il trattamento con ECT. Non essendo stata all'epoca ancora prevista una procedura standard, però, i risultati trovati sono difficilmente confrontabili, in quanto utilizzano diversi

dosaggi del farmaco iniettato, differenti parametri elettrici per la generazione degli impulsi e diversi tipi di elettrodi [19].

Nel 1993, Belehradec e colleghi trattarono 8 pazienti con 40 noduli in un totale di 11 diverse sedute di terapia. Questi pazienti furono sottoposti ad ECT con una somministrazione endovenosa di Bleomicina ed elettroporazione dei noduli dopo 3,5 minuti dall'iniezione del farmaco. Dei 40 noduli trattati, 23 regredirono completamente e 6 solo parzialmente [36].

Successivamente, furono pubblicati numerosi altri studi che coinvolsero circa 247 pazienti con un totale di 1009 noduli trattati. Principalmente si trattava di melanomi cutanei e subcutanei sia singoli che multipli, che diedero risposte favorevoli se sottoposti ad ECT con Bleomicina somministrata per via intratumorale. Nel 77% di questi si vide, infatti, un'oggettiva risposta alla terapia, percentuale che si riduceva al 45% per melanomi simili trattati con infusione endovenosa di Bleomicina. Per quanto riguardava il trattamento con Cisplatino, invece, la percentuale di risposta oggettiva era del 67%, nei pazienti a cui il farmaco fu somministrato per via intratumorale, e del 48% quando iniettato per via endovenosa [14].

Già dall'inizio gli studi per valutare la possibilità di applicazione del trattamento di ECT coinvolsero anche tumori definiti non-melanoma come:

- il carcinoma a cellule squamose,
- l'adenocarcinoma del seno e delle ghiandole salivari,
- il carcinoma delle cellule basali (o basalioma),
- l'ipernefroma (o adenocarcinoma renale).

I risultati ottenuti nei trials clinici effettuati sulle neoplasie appena elencate furono simili a quelli visti per i melanomi. La percentuale maggiore di risposta completa al trattamento si ebbe, anche in questo caso, quando il trattamento era stato effettuato con infusione intratumorale di Bleomicina (63%). Una risposta completa nel 53% dei casi fu invece riscontrata con Bleomicina somministrata per via endovenosa, mentre per l'infusione intratumorale del Cisplatino la risposta completa alla terapia fu nel 58% dei casi [14]. In Tabella 6 vengono riportate le percentuali di risposta ottenute nei tumori trattati con ECT durante i trials pre-ESOPE in base alla terapia somministrata [37].

**Tabella 6. Confronto tra i risultati ottenuti nei vari trattamenti con ECT durante i trials pre-ESOPE [37]. (Risposta oggettiva = regressione completa o parziale).**

Trattamento	Regressione completa nei melanomi	Risposta oggettiva nei tumori non-melanoma
ECT con Bleomicina endovena	45%	53%
ECT con Bleomicina intratumorale	77%	63%
ECT con Cisplatino intratumorale	67%	58%

In Tabella 7 invece vengono elencati i vari studi, il protocollo utilizzato e i tumori trattati [36][37].

**Tabella 7a. Elenco degli studi effettuati prima della stesura del protocollo ESOPE e dei tumori trattati.**

ID	Autori dello studio	Tumori trattati	Anno
#1	Belehradek et Al. [5]	Carcinoma a cellule squamose	1993
#2	Domenge et Al. [38]	1. Carcinoma a cellule squamose 2. Carcinoma della mammella	1996
#3	Glass et Al. [39]	Melanoma	1996
#4	Heller e colleghi [40]	1. Carcinoma delle cellule basali 2. Carcinoma della mammella 3. Melanoma maligno	1996
#5	Heller et Al. [41]	1. Melanoma 2. Carcinoma a cellule squamose 3. Sarcoma di Karposi	1998
#6	Kubota et Al. [42]	Metastasi cutanee di tumore alla vescica	1998
#7	Gehl et Al. [43]	Melanoma	2000
#8	Sersa et Al. [44]	Ipernefroma	2000
#9	Rols et Al. [45]	Melanoma	2000
#10	Rodriguez-Cueva e colleghi [46]	1. Melanoma 2. Carcinoma delle cellule basali 3. Carcinoma a cellule squamose 4. Metastasi cutanee del tumore al seno	2001
#11	Allegretti et Al. [47]	Tumori della testa e del collo	2001

Tabella 7b. Protocollo applicato e risultati ottenuti nel trattamento dei tumori precedentemente elencati. CR = completa regressione, PR = regressione parziale, NC = nessun cambiamento [36][48].

ID	Tumori trattati	Tipologia di protocollo	Risultati dello studio
#1	Carcinoma a cellule squamose	<p><u>Pazienti</u>: 8 con 40 tumori</p> <p><u>Trattamento</u>: Electrochemioterapia con BLM per endovena (18000 UI/m<sup>2</sup> o 27000 UI/m<sup>2</sup>)</p> <p><u>Anestesia</u>: per via orale (lorazepam) o per via endovenosa (midazolam, anfentanyl, fentanyl)</p> <p><u>Applicazione impulsi</u>: 11 sessioni di ECT con applicazione del treno di impulsi dopo 3,5 minuti dall'infusione di BLM; durata impulsi: 100 µs; frequenza: 1 Hz; intensità campo elettrico: 1300 V/cm e in due applicazioni successive 1000 V/cm</p> <p><u>Elettrodi</u>: esterni a piastre di 10 mm di larghezza e distanti 6 mm tra loro.</p>	<p>Dei 40 noduli trattati:</p> <p>Completa regressione (CR): 57% (23 noduli);</p> <p>regressione parziale (PR): 15% (6 noduli)</p>
#2	Carcinoma a cellule squamose Carcinoma della mammella	<p><u>Pazienti</u>: 7 pazienti con 53 noduli</p> <p><u>Trattamento</u>: ECT con BLM endovena</p> <p><u>Anestesia</u>: generale o neuroleptanalgesia</p> <p><u>Applicazione impulsi</u>: 10 sessioni di ECT con applicazione del treno di impulsi tra 8 e 28 min dopo la somministrazione di BLM; durata impulsi: 100 µs; numero di impulsi: 4 o 8; intensità campo elettrico: 1000 V/cm o 1300 V/cm</p> <p><u>Elettrodi</u>: non noto</p>	<p>Si riscontrò un miglioramento nei noduli di piccole dimensioni. Nei noduli grandi si registrò un'estesa necrosi del tumore.</p>
#3	Melanoma	<p><u>Pazienti</u>: 5 con 23 noduli</p> <p><u>Trattamento</u>: ECT con BLM per via intratumorale</p> <p><u>Anestesia</u>: Non specificata</p> <p><u>Applicazione impulsi</u>: applicazione del treno di impulsi 10 minuti dopo l'infusione di BLM</p> <p><u>Elettrodi</u>: esterni, 10 mm di larghezza e distanti 6 mm tra loro.</p>	<p>CR: 78% (18 noduli)</p> <p>PR: 17% (4 noduli)</p> <p>NC: 4% (1 nodulo)</p>
#4.1	Carcinoma delle cellule basali	<p><u>Pazienti</u>: 2 con 6 tumori</p> <p><u>Trattamento</u>: ECT con BLM per endovena (10 U/m<sup>2</sup> con infusione lenta)</p> <p><u>Anestesia</u>: iniezione locale di soluzione di lidocaina all'1%</p> <p><u>Applicazione impulsi</u>: applicazione del treno di impulsi da 1 a 15 minuti dopo l'infusione di BLM; durata impulsi: 100 µs; frequenza: 1 Hz; intensità campo elettrico: 1300V/cm</p> <p><u>Elettrodi</u>: esterni, 10 mm di larghezza e distanti 6 mm tra loro.</p>	<p>Si ebbe una risposta oggettiva in entrambi i pazienti trattati:</p> <p>1 CR e 5 PR.</p>

(continua)

#4.2	Carcinoma della mammella	<u>Pazienti</u> : 1 con 2 noduli Stesso protocollo descritto in precedenza	CR in entrambi i 2 noduli
#4.3	Melanoma maligno	<u>Pazienti</u> : 3 Stesso protocollo descritto precedentemente	In 2 pazienti si osservò un'oggettiva risposta: 5 di 6 noduli trattati diminuirono di dimensione e 3 mostrarono CR.
#5	Melanoma Carcinoma a cellule squamose Sarcoma di Karposi	<u>Pazienti</u> : 34 con 143 noduli <u>Trattamento</u> : ECT con BLM per via intralesionale (dose basata sulla dimensione del nodulo) <u>Anestesia</u> : iniezione locale di soluzione all'1% di lidocaina e epinefrina <u>Applicazione impulsi</u> : applicazione di 6 o 8 impulsi dopo 10 min dalla somministrazione del farmaco; durata impulsi: 99 µs; intensità campo elettrico: 1300 V/cm <u>Elettrodi</u> : esterni, 10 mm di larghezza e distanti 6 mm tra loro.	CR: 90,9% (130 noduli) PR: 8,4% (12 noduli) NC: 14% (2 noduli)
#6	Metastasi cutanee di tumore alla vescica	<u>Pazienti</u> : 1 con 17 lesioni <u>Trattamento</u> : non noto. <u>Anestesia</u> : non noto <u>Applicazione impulsi</u> : non noto <u>Elettrodi</u> : non noto	Tutte e 17 (100%) i noduli mostrarono CR.
#7	Melanoma	<u>Pazienti</u> : 1 con 9 noduli <u>Trattamento</u> : ECT con BLM intratumorale <u>Anestesia</u> : locale <u>Applicazione impulsi</u> : applicazione di un treno di 8 impulsi elettrici; durata impulsi: 99 µs; intensità campo elettrico: 1200 V/cm <u>Elettrodi</u> : ad aghi a 4 mm di distanza tra loro	CR su 9 di 9 noduli trattati  NOTE: il trattamento è stato associato a terapia immunologica con infusione di interleuchina-2
#8	Ipernefroma	<u>Pazienti</u> : 1 con 1 tumore esteso <u>Trattamento</u> : 3 sessioni di ECT con BLM endovena <u>Anestesia</u> : non noto <u>Applicazione impulsi</u> : applicazione di un treno di 8 impulsi elettrici 10 minuti dopo l'infusione di BLM <u>Elettrodi</u> : non noto	In 12 mesi la dimensione del tumore si stabilizzò e quindi non ci fu alcun cambiamento (100% NC).
#9	Melanoma	<u>Pazienti</u> : 4 con 55 noduli <u>Trattamento</u> : ECT con BLM endovena (dose di 10 UI/m <sup>2</sup> ) <u>Anestesia</u> : non noto <u>Applicazione impulsi</u> : non noto <u>Elettrodi</u> : non noto	Dei 55 noduli trattati: 5 mostrarono CR (9%), 46 PR (84%) e 4 NC (7%)

(continua)



#10	Melanoma Carcinoma delle cellule basali Carcinoma a cellule squamose Metastasi cutanee del tumore al seno	<u>Pazienti</u> : 15 con 38 lesioni (9 carcinomi a cellule basali, 13 melanomi, 2 carcinomi a cellule squamose e 14 metastasi cutanee del tumore al seno) <u>Trattamento</u> : ECT con BLM intratumorale <u>Anestesia</u> : non noto <u>Applicazione impulsi</u> : applicazione degli impulsi 10 min dopo la somministrazione di BLM; durata impulsi: 100 µs; intensità del campo elettrico: 1300 V/cm; frequenza: 1 Hz <u>Elettrodi</u> : non noto	CR: 47,4% (18 noduli) PR: 47,4% (18 noduli) NC: 5,3% (2 noduli)
#11	Tumori della testa e del collo	<u>Pazienti</u> : 14 con 14 noduli <u>Trattamento</u> : ECT con BLM per via intratumorale <u>Anestesia</u> : Non specificata <u>Applicazione impulsi</u> : applicazione del treno di impulsi 10 minuti dopo l'infusione di BLM <u>Elettrodi</u> : esterni, 10 mm di larghezza e distanti 6 mm tra loro.	CR: 50% (7 noduli) PR: 36% (5 noduli) NC: 14% (2 noduli)

### 4.3 Il trial ESOPE

A causa della varietà e della diversità di parametri utilizzati negli studi condotti dal 1991 al 2006, anno di pubblicazione dei risultati del progetto ESOPE, si sentì la necessità di uniformare il protocollo e di rendere standard le procedure da utilizzare. Fu per questo motivo che i quattro principali centri europei per la ricerca contro il cancro (l'Istituto Gustave-Roussy di Villejuif, Francia; l'Istituto di Oncologia di Lubiana, Slovenia; il Cork Cancer Research Center di Cork, Irlanda e l'Herlev Hospital di Copenhagen, Danimarca), si riunirono in un consorzio e diedero inizio al progetto ESOPE, fondato e promosso dall'Unione Europea [19].

Lo studio si basò sull'esperienza dei quattro centri riguardo l'elettrochemioterapia nel trattamento di tumori e di metastasi cutanee, con il preciso intento di preparare un protocollo SOP (Standard Operating Procedures). Tale protocollo prese in considerazione in particolare i seguenti punti [32]:

- Percentuale di risposta oggettiva e di risposta completa di noduli sottoposti ad un unico trattamento;
  - Differente efficacia nell'uso clinico dei due farmaci utilizzati in ECT:
    - Bleomicina
    - Cisplatino
- e delle due diverse modalità di somministrazione:
- Locale

- Endovenosa;
- Risposta del trattamento in base a:
  - tipo, dimensione e posizione del tumore trattato
  - tipo di elettrodi utilizzati e parametri elettrici
  - centro di ricerca in cui viene effettuata la sperimentazione;
- Valutazione della tossicità e della sicurezza del trattamento.

Il trial ESOPE si avvale inoltre dell'utilizzo del generatore di impulsi elettrici Cliniporator™, prodotto da IGEA s.r.l (Carpi, Modena), sviluppato anch'esso nell'ambito di un precedente progetto europeo [19].

Lo studio per la messa a punto del trial ESOPE durò due anni e nel 2006 fu pubblicato in un supplemento dell'European Journal of Cancer l'articolo che riassumeva tutte le SOP emerse durante il progetto [29].

#### **4.3.1 Procedura di trattamento**

Le procedure di trattamento (SOP) descritte nell'articolo pubblicato nel 2006 da Mir, Sersa et Al. e utilizzate nel trial ESOPE, riguardano principalmente i seguenti punti [19][29]:

- i. Selezione dei pazienti che possono essere trattati con ECT in base alla loro storia clinica e alle patologie di cui sono affetti;
- ii. Scelta del farmaco;
- iii. Dosaggio del farmaco;
- iv. Scelta della via di somministrazione;
- v. Scelta del tipo di anestesia da somministrare;
- vi. Scelta degli elettrodi da utilizzare;
- vii. Scelta degli impulsi elettrici più adatti (in base ad ampiezza, numero, durata ed intensità);
- viii. Verifica della risposta del paziente al trattamento.

##### *i. Selezione dei pazienti*

La procedura standard (SOP) prevede di dare grande importanza alla scelta dei pazienti da sottoporre ad elettrochemioterapia al fine di non compromettere la riuscita del trattamento o addirittura la vita del paziente stesso. I candidati migliori sono le persone affette da melanomi e da metastasi cutanee, con la presenza di noduli di dimensioni non troppo grandi (di diametro inferiore a 3 cm). La presenza di pacemaker impiantati sul paziente preclude il trattamento di tumori situati sulla parte anteriore del tronco, a causa della pericolosità di una possibile interazione degli impulsi elettrici usati per elettroporare le cellule tumorali con il funzionamento del dispositivo.

I pazienti in terapia anticoagulante devono essere attentamente valutati. In base infatti al valore dell'indice di coagulazione del sangue si può precludere in alcuni casi l'utilizzo di ECT mediante inserimento di aghi.

Da tenere in considerazione sono anche eventuali sensibilità del paziente a Bleomicina o a Cisplatino per poter scegliere la terapia con il farmaco adeguato. La storia clinica del paziente risulta in ogni caso importante anche per individuare l'anestesia migliore per ogni singolo caso [29].

La selezione dei pazienti viene effettuata in base alle seguenti indicazioni [32]:

- Aspettativa di vita superiore a 3 mesi;
- Presenza di noduli cutanei e subcutanei di dimensioni adatte all'applicazione degli impulsi di campo elettrico;
- Diametro dei noduli superiore a 3 cm;
- Intervallo di almeno 2 settimane da precedenti terapie;
- Una buona qualità della vita del paziente (indice di Karnofsky superiore al 70%);
- Adeguate funzioni renali ed ematiche.

Criteri di esclusione dal trattamento:

- Presenza di patologie viscerali progressive;
- Nota allergia o sensibilità a Bleomicina o Cisplatino;
- Raggiungimento della dose cumulativa di Bleomicina nel paziente dovuto a precedenti terapie;
- Presenza di neuropatie periferiche gravi;
- Profilo ematico non nella norma;
- Presenza di pregresse patologie renali;
- Presenza di aritmie o di pacemaker;
- Pazienti epilettici;
- Pazienti in gravidanza o allattamento.

#### *ii. Scelta del farmaco*

La scelta di utilizzare un farmaco piuttosto che l'altro è dovuta principalmente alla sensibilità del paziente ad una delle due molecole. Una nota allergia del paziente a Bleomicina o a Cisplatino infatti preclude la scelta di uno dei due farmaci. Inoltre la presenza di pregresse patologie polmonari precludono l'utilizzo di Bleomicina per endovena.

#### *iii. Dosaggio del farmaco*

Per il trattamento con Bleomicina somministrata per endovena la dose di farmaco iniettato è di 15000 UI/m<sup>2</sup>.

Il dosaggio per il trattamento con somministrazione intratumorale di uno dei farmaci cambia a seconda del volume del tumore da trattare, secondo i parametri descritti nella Tabelle 8 e 9.

In Tabella 8 si può notare come il dosaggio di Bleomicina in UI/cm<sup>3</sup> si dimezzi in base alle dimensioni del tumore.

**Tabella 8. Dosaggio di Bleomicina per infusione endovenosa [29].**

Dimensioni del tumore	<0,5cm <sup>3</sup>	Tra 0,5cm <sup>3</sup> e 1 cm <sup>3</sup>	>1cm <sup>3</sup>
Dose di Bleomicina (concentrazione 1000 UI/ml)	1000 UI/cm <sup>3</sup> di tumore	500 UI/cm <sup>3</sup> di tumore	250 UI/cm <sup>3</sup> di tumore

In Tabella 9 viene descritto il dosaggio di Cisplatino in mg/cm<sup>3</sup>: si può vedere come la concentrazione di farmaco nel tumore sia dipendente dal volume del nodulo trattato.

**Tabella 9. Dosaggio di cisplatino per infusione endovenosa [29].**

Dimensioni del tumore	<0,5cm <sup>3</sup>	Tra 0,5cm <sup>3</sup> e 1 cm <sup>3</sup>	>1cm <sup>3</sup>
Dose di Cisplatino (concentrazione 2 mg/ml)	2 mg/cm <sup>3</sup> di tumore	1 mg/cm <sup>3</sup> di tumore	0,5 mg/cm <sup>3</sup> di tumore

#### *iv. Scelta della via di somministrazione*

La scelta della via di somministrazione del farmaco avviene valutando prima di tutto il numero e la dimensione dei noduli da trattare [29]:

- Numero di noduli ≤5 e diametro <2cm: utilizzo di Bleomicina o di Cisplatino con iniezione intralesionale;
- Numero di noduli ≤5 e diametro >2cm: trattamento con Bleomicina somministrata per endovena;
- Numero di noduli >5: infusione di Bleomicina per via endovenosa.

#### *v. Scelta del tipo di anestesia da somministrare*

La scelta del tipo di anestesia, locale o generale, è anch'essa determinata dal numero e dalla dimensione dei noduli da trattare oltre che dalla zona in cui il tumore è situato [29]. Data la tossicità dei sedativi e la pericolosità dell'operazione di sedazione per il paziente, si tende a preferire l'anestesia locale nel caso di tumori di piccole dimensioni o di noduli più grandi posti in zone non particolarmente sensibili del corpo (ad esempio sul torace). La scelta di somministrare un'anestesia generale deriva invece dalla presenza di noduli tumorali di dimensioni elevate posti in zone sensibili del corpo (ad esempio sul viso). In Tabella 10 sono riportati i due tipi di anestesia e il tipo di tumore che presenta il paziente sottoposto a sedazione [32].

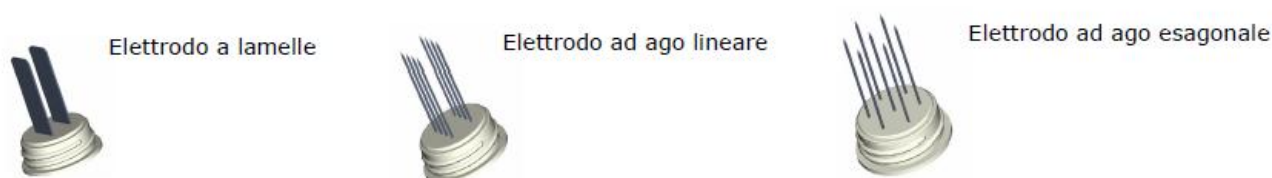
**Tabella 10. Schema dei tipi di anestesia somministrati in ECT [32].**

Tipo di anestesia	Anestetico somministrato	Tumori trattati
Anestesia locale	Lidocaina associata ad epinefrina	Piccoli noduli come melanomi o adenocarcinomi del seno
Anestesia generale	Propofol associato ad analgesici come il remifentanil	Grandi noduli in zone sensibili del corpo

*vi. Selezione del tipo di elettrodi*

Per quanto riguarda la scelta degli elettrodi da utilizzare, bisogna specificare che nello studio ESOPE furono utilizzati tre tipi di elettrodi:

- Tipo I: elettrodi formati da due piatti che possono essere posti a distanze diverse (4, 6 o 8 mm);
- Tipo II: elettrodo ad aghi lineari posti a 4 mm di distanza tra loro;
- Tipo III: elettrodo ad aghi disposti a forma esagonale distanti circa 7 mm tra loro.



**Figura 7. Tipi di elettrodi utilizzati durante lo studio ESOPE [1].**

Gli elettrodi in Figura 7 vengono utilizzati nel trattamento di tumori diversi, in base alla tabella che segue (Tabella 11):

**Tabella 11. Tipi di elettrodi del Cliniporator™ e tumori rispettivamente trattati [19].**

Tipi di elettrodi	Tumori trattati
Tipo I	Piccoli tumori superficiali
Tipo II	Piccoli noduli sottocutanei (generalmente in anestesia locale)
Tipo III	Noduli con diametro superiore a 1cm

In particolare gli elettrodi di tipo I vengono utilizzati nel trattamento di tumori superficiali di piccole dimensioni. Ciò è dovuto alla particolare forma dell'elettrodo che consente una terapia cutanea locale grazie alla presenza delle due piastrine, ma non permette un trattamento invasivo a livello sottocutaneo possibile invece con elettrodi ad aghi. Gli elettrodi di tipo II, caratterizzati dalla presenza di due file parallele di 4 aghi ciascuna, permettono il trattamento di noduli subcutanei di ridotte dimensioni e vengono generalmente preferiti quando al paziente è somministrata un'anestesia locale. Gli elettrodi di tipo III, infine, sono maggiormente indicati per l'ECT su tumori di dimensioni superiori ad 1 cm di diametro. E' da preferirsi la somministrazione di anestesia generale nel caso di utilizzo di questi elettrodi [19].

*vii. Scelta degli impulsi elettrici più adatti*

La durata e l'intensità degli impulsi elettrici applicati sono da differenziarsi sia in base al tipo di trattamento effettuato e al tipo di farmaco utilizzato sia all'elettrodo scelto. La conformazione dell'elettrodo, infatti, permette una determinata distribuzione del campo elettrico che condiziona la formazione di pori nelle cellule e il conseguente ingresso del farmaco. L'elettrochemioterapia con infusione di Bleomicina per endovena prevede il rilascio del treno di impulsi elettrici tra gli 8 e i 28 minuti successivi all'iniezione, momento in cui si verifica la massima concentrazione del farmaco nel sangue. Per l'infusione intralesionale, invece, il rilascio avviene tra 1 e 10 minuti dopo la somministrazione di uno dei due farmaci [19].

Ognuno dei tre diversi elettrodi è caratterizzato da parametri elettrici differenti, che vengono descritti in Tabella 12.

Tabella 12. Parametri elettrici tipici dei diversi elettrodi [32].

Elettrodi	Numero di impulsi	Ampiezza degli impulsi	Durata degli impulsi	Frequenza di ripetizione
Tipo I	8	1300 V/cm	100 $\mu$ s	1 o 5000 Hz
Tipo II	8	1000 V/cm	100 $\mu$ s	1 o 5000 Hz
Tipo III	96 (8 ogni coppia di aghi)	1000 V/cm	100 $\mu$ s	5000 Hz

Si può notare come i parametri elettrici degli elettrodi di Tipo I e di Tipo II siano simili, in quanto entrambi utilizzati nel trattamento di noduli di piccole dimensioni per i quali è sufficiente l'applicazione di un treno di otto impulsi elettrici ad una frequenza di ripetizione o di 1 Hz o di 5000 Hz. La scelta di utilizzare una frequenza di 5 kHz è dovuta alla necessità di ridurre ad una sola, ma più intensa, le contrazioni muscolari stimulate dagli impulsi elettrici [29]. Per gli elettrodi di Tipo III non è invece possibile operare una scelta sulla frequenza di ripetizione, in quanto solo a 5 kHz si verifica la distribuzione di un campo elettrico sufficientemente elevato da indurre l'effetto elettroporativo in tutto il tumore [32].

*viii. Verifica della risposta del paziente al trattamento:*

Dopo circa 4 settimane dal trattamento si effettua una visita di controllo sul paziente così da verificarne la guarigione. Nel caso di ECT applicata su tumori di grandi dimensioni potrebbe essere necessario un tempo più lungo, di circa 10 settimane, per determinare la riuscita o meno della terapia.

In base alla risposta ottenuta e ad una eventuale regressione parziale del nodulo è possibile suggerire al paziente la ripetizione del trattamento [29].

### 4.3.2 Risultati ottenuti con il trial ESOPE

Durante i due anni di sperimentazione del progetto ESOPE, furono sottoposti al trattamento con elettrochemioterapia 62 candidati che corrispondevano ai criteri di selezione. Di questi solo 41 rientrano nelle percentuali che forniscono i risultati ottenuti dal trial, in quanto 10 decedettero entro 60 giorni (tempo durante il quale si è svolta la terapia completa), 2 non parteciparono ai test di valutazione dopo il trattamento e 1 non diede il consenso alla divulgazione dei dati [32]. Tralasciando il paziente che non acconsentì al trattamento dei suoi dati, i pazienti scelti e sottoposti alla terapia furono in totale 61 con 171 noduli cancerosi, di cui il 57% melanomi maligni e il 43% non-melanomi. Il tempo di osservazione fu tra i 60 e i 380 giorni [32].

La risposta alla terapia fu valutata nei pazienti seguendo differenti applicazioni del trattamento, con una diversificazione nel tipo di farmaco (Bleomicina o Cisplatino) e di somministrazione (locale o per via endovenosa) adottati e negli elettrodi utilizzati.

In Tabella 13 vengono riportati i vari tipi di tumore trattati durante lo studio ESOPE. Viene fatta inoltre una distinzione tra pazienti e noduli trattati e quelli ritenuti infine idonei a partecipare alla valutazione finale dei risultati del trial.

Tabella 13. Suddivisione dei pazienti e dei noduli trattati e poi valutati suddivisi per tipo di tumore [32].

Tipo di tumore	Pazienti trattati	Noduli trattati	Pazienti valutati	Noduli valutati
Melanoma maligno	32	190	20	98
Carcinoma	27	91	19	64
Sarcoma	2	9	2	9

Dopo un singolo trattamento di ECT, si ebbe una risposta alla terapia somministrata su 145 dei noduli trattati, corrispondenti all'84,8% del totale. Di questi, l'11,1% presentarono una guarigione solo parziale, mentre il 73,7% completa.

In alcuni pazienti (4,7%) si manifestò un progressivo peggioramento della patologia, mentre sul 10,5% dei casi trattati non si ebbe alcuna risposta alla terapia [19][32].

Dopo 150 giorni dal trattamento la percentuale di risposta non subì alcuna variazione e si mantenne stabile sui valori osservati subito dopo il trattamento con elettrochemioterapia.

Dei pazienti sottoposti ad ECT con somministrazione di Bleomicina per via endovenosa, l'88% mostrò una risposta al trattamento. La percentuale fu del 73% nel caso di Bleomicina infusa per via intratumorale e del 75% nel caso di Cisplatino per via intralesionale. I risultati ottenuti dal trial, suddivisi per tipo di somministrazione e di farmaco associati ad ECT, vengono riportati in Tabella 14.

**Tabella 14. Risultati dello studio ESOPE suddivisi per tipo di terapia somministrata [32]. CR = regressione completa, PR = regressione parziale.**

Terapia somministrata	CR	PR
ECT con Bleomicina endovena	88,2%	1,3%
ECT con Bleomicina intratumorale	73,1%	6,9%
ECT con Cisplatino intratumorale	75,4%	4,6%

Una differenza si può notare nella risposta alla terapia delle due classi di tumori trattati, melanoma e non-melanoma. Durante lo studio si riscontrò, infatti, il 90% di risposta nei non-melanomi contro l'80% nei melanomi; inoltre si ebbe una completa regressione nell'83,6% dei non-melanomi trattati contro il 66,3% dei melanomi [19]. I risultati vengono riportati in Tabella 15.

**Tabella 15. Percentuali di riuscita del trattamento suddivise per tipo di tumore [32]. CR = regressione completa, PR = regressione parziale.**

Tipo di tumore	CR	PR
Melanoma	66,3%	14,3%
Non-melanoma	83,6%	6,8%

L'importanza dello studio ESOPE non si limitò ai risultati ottenuti nel valutare il trattamento di elettrochemioterapia per la cura dei noduli trattati, ma pose anche le basi a successivi studi [31] riguardanti la qualità della vita dei pazienti oncologici. Si osservò, infatti, durante il trial ESOPE, che gli effetti collaterali del trattamento con elettrochemioterapia erano notevolmente inferiori a quelli che si registrano nella chemioterapia classica. Il 93% dei partecipanti al trial si dichiararono disposti a ripetere il trattamento qualora fosse stato necessario [19].

In conclusione, lo studio ESOPE dimostrò che, seguendo un adeguato protocollo di trattamento, più dell'80% delle metastasi cutanee di differenti tipi di tumore davano una risposta considerevolmente favorevole in termini di remissione della massa tumorale se sottoposte ad elettrochemioterapia [19].

#### **4.4 Studi effettuati dopo il progetto ESOPE**

In seguito al trial ESOPE, dal 2006 ad oggi, si svilupparono principalmente due studi, uno condotto da Marty et Al. (2006) con l'intento di analizzare i risultati ottenuti proprio nel progetto ESOPE [32] e uno pubblicato da Campana e colleghi (2008) che riguarda, invece, una nuova valutazione su volontari [31].



In quest'ultimo studio, in particolare, furono valutate la risposta al trattamento di 52 pazienti sottoposti ad elettrochemioterapia con infusione di Bleomicina, per via sia endovenosa sia intratumorale. 24 pazienti furono infatti trattati con Bleomicina per via endovenosa, 6 con Bleomicina per via intratumorale e 22 con entrambe le somministrazioni contemporaneamente.

Fu esclusa la terapia con Cisplatino, in quanto i candidati presentavano numerosi noduli che, come noto dallo studio ESOPE, hanno una maggiore percentuale di successo in termini di guarigione se trattati con Bleomicina.

La selezione dei pazienti fu effettuata in base ai criteri descritti nelle SOP del trial europeo e fu valutata, oltre alla risposta alla terapia, anche la qualità della vita dei candidati sottoposti al trattamento. Questa valutazione fu possibile grazie ad un questionario fatto compilare ai pazienti prima del trattamento e dopo 1 e 2 mesi dalla terapia. I quesiti posti richiedevano di fornire un punteggio, da 0 a 10 (0=peggior risultato, 10=miglior risultato) o una risposta tra sì e no, riguardo i seguenti aspetti:

- Guarigione delle ferite (0=ulcere sanguinanti, 10=perfettamente guarite);
- Sanguinamento delle ferite (0=abbondante; 10=nessun sanguinamento);
- Presenza di inestetismi (0=molto negativa; 10=nessuna);
- Limitazione delle attività giornaliere (0=impossibilità di svolgere le attività quotidiane; 10=nessuna);
- Limitazione nelle relazioni sociali (0=serie limitazioni; 10=nessuna);
- Controllo del dolore (0=nessun dolore; 10=molto dolore);
- Generale soddisfazione del trattamento ricevuto (0=insoddisfazione; 10=completa soddisfazione)
- Consenso ad una eventuale ripetizione del trattamento (sì o no).

Riguardo invece la risposta al trattamento furono adottati i criteri dello studio ESOPE e quindi valutate le condizioni generali del paziente subito dopo l'elettrochemioterapia e dopo 4 settimane dal trattamento.

La percentuale di risposta al trattamento fu simile a quella già vista nel trial ESOPE. Una completa regressione del tumore fu osservata su 17 di 34 pazienti affetti da melanoma e su 9 di 18 affetti da altri tipi di tumore.

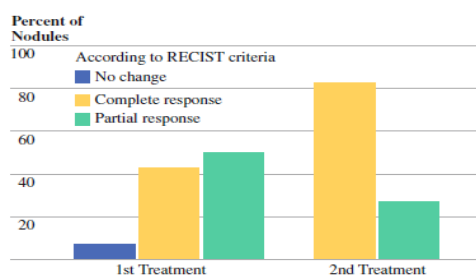
Un mese dopo il trattamento, 125 noduli trattati su 267 mostrarono una regressione completa, 126 una regressione parziale, mentre 16 nessun miglioramento.

In Tabella 16 vengono riportate le percentuali di risposta al trattamento ottenute nei pazienti in base alle tre diverse modalità di somministrazione della Bleomicina.

**Tabella 16. Percentuali di risposta al trattamento distinte per modalità di somministrazione. CR = risposta completa, PR = risposta parziale, NC = nessun cambiamento, PD = avanzamento della malattia [31].**

Modalità di somministrazione	Numero di pazienti	CR	PR	NC	PD
Via endovenosa	24	58% (14 pazienti)	34% (8 pazienti)	8% (2 pazienti)	-
Via intratumorale	6	50% (3 pazienti)	50% (3 pazienti)	-	-
Via endovenosa + via intratumorale	22	41% (9 pazienti)	59% (13 pazienti)	-	-

Come si può notare in Tabella 15, la miglior percentuale di risposta al trattamento si ebbe con la somministrazione endovenosa di Bleomicina, in quanto il 58% dei pazienti mostrò una completa regressione del tumore dopo il primo trattamento.



**Figura 8. Istogramma della risposta dei noduli dopo uno o due sessioni di trattamento [31].**

In Figura 8 è riportato un istogramma che mostra le percentuali di risposta al trattamento ottenute nelle due diverse applicazioni della terapia. Furono inizialmente sottoposti alla terapia con ECT 608 noduli, tra i quali 257 dovettero ricorrere ad un secondo trattamento in quanto la risposta al primo non era stata completa. Dei 608 noduli trattati infatti il 43% ottenne una risposta completa e il 50% una risposta parziale mentre il 7% (40 noduli) non riscontrò alcun cambiamento.

Dopo il secondo trattamento tutti i 257 noduli diedero una risposta alla terapia sia essa parziale o totale. In questo caso infatti non furono riscontrati noduli che non risposero al trattamento, inoltre la percentuale di risposta completa fu superiore all'80% [31].

Per quanto riguarda la valutazione della qualità della vita dei pazienti sottoposti al trattamento con elettrochemioterapia lo studio condotto dal team del dottor Campana segnò un'importante svolta nella considerazione dell'ECT come terapia antitumorale alternativa alla chemioterapia classica. La risposta dei volontari al questionario riguardante i principali aspetti della loro vita quotidiana e l'eventuale peggioramento di essi durante il trattamento, offrì una visione più completa degli effetti dell'ECT sul paziente.

In Figura 9 sono riportati i punteggi medi assegnati dai pazienti ai vari aspetti della loro vita dopo il trattamento con ECT. Si può notare come la qualità della loro vita da malati oncologici abbia subito un miglioramento già un mese dopo il trattamento. I pazienti percepirono soprattutto una migliore capacità nello svolgere le attività quotidiane, mentre per quanto riguarda le relazioni sociali fu riscontrato solo una lieve differenza. Il grafico mostra anche la soddisfazione generale dei pazienti al trattamento che risulta molto buona [31].

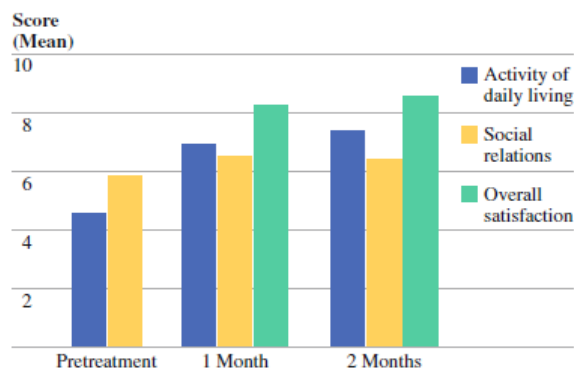


Figura 9. Il grafico mostra la valutazione dei pazienti riguardo alle attività quotidiane e alle relazioni sociali e mostra la soddisfazione al trattamento ricevuto. (0=gravi limitazioni nelle attività giornaliere e nelle relazioni sociali, nessuna soddisfazione del trattamento; 10=nessuna limitazione nelle attività quotidiane e nelle relazioni sociali, massima soddisfazione del trattamento) [31].

In Figura 10 vengono invece riportati i valori medi delle risposte dei pazienti riguardo al dolore ed al sanguinamento dovuti ai trattamenti subiti e alle ulcerazioni provocate dai tumori. La condizione di sanguinamento già buona prima del trattamento registrò un lieve miglioramento nei due mesi successivi alla terapia. I pazienti osservarono però un notevole progresso nella guarigione delle ulcere e una diminuzione degli inestetismi [31].

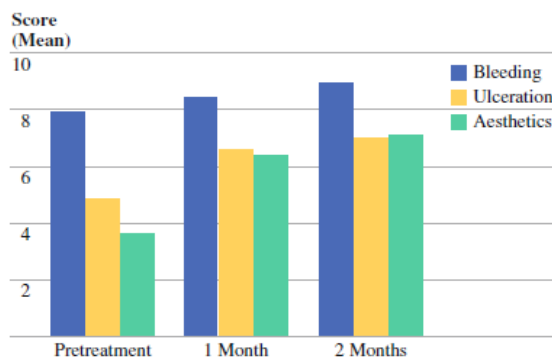


Figura 10. Il grafico mostra il grado di sanguinamento, di ulcerazione e di inestetismi presenti prima e dopo il trattamento. (0=molto sanguinamento, numerose ulcere e alto livello di inestetismo; 10=nessun sanguinamento o ulcerazione e nessuna presenza di inestetismo) [31].

## 4.5 Principali testi citati nel capitolo

Titolo	Autori	Anno	Contenuti principali
Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of Bleomycin by electroporation [36]	Goethelf, Mir, Gehl	2003	L'articolo raccoglie i risultati di 11 studi sull'utilizzo di ECT nel trattamento di lesioni tumorali cutanee e subcutanee.
Electrochemotherapy – an easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study [32]	Marty, Mir, Gehl, Sersa, Collins, Garbay, Billard, Geertsen, Rudolf, O'Sullivan, Snoj, Larkin, Miklavcic, Pavlovic, Paulin-Kosir, Cemazar, Morsli, Soden, Robert	2006	In questo articolo vengono discussi i risultati ottenuti nei trials coinvolti nel progetto ESOPE. Viene inoltre fatta una distinzione degli esiti ottenuti in base al tipo di tumore trattato e alla sua dimensione, agli elettrodi utilizzati, al farmaco somministrato, al centro di ricerca dove è stata effettuata la terapia e al paziente sottoposto al trattamento.
Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes [29]	Mir, Gehl, Sersa, Collins, Garbay, Billard, Geertsen, Rudolf, O'Sullivan, Marty	2006	L'articolo descrive dettagliatamente il protocollo di procedura del trattamento con ECT utilizzato durante i trials svolti nell'ambito del progetto ESOPE. Viene inoltre fornita uno schema per la scelta degli elettrodi e del farmaco da somministrare in funzione della dimensione del tumore da trattare.

(continua)

Clinical aspects of electroporation (cap. 8) [19]	Silve, Mir	2011	Il capitolo descrive in dettaglio lo studio ESOPE dando particolare attenzione al protocollo utilizzato negli istituti di ricerca coinvolti e ai risultati ottenuti. Viene inoltre fornita una breve discussione degli esiti di trials svoltisi prima del progetto ESOPE e del successivo studio diretto da Campana.
Bleomycin-Based electrochemotherapy: Clinical outcome from a single institution's experience with 52 patients	Campana, Mocellin, Basso, Puccetti, De Salvo, Chiarion-Sileni, Vecchiato, Corti, Rossi, Nitti	2008	L'articolo riporta i risultati ottenuti durante uno studio sull'ECT con somministrazione di Bleomicina per il trattamento di tumori cutanei e subcutanei su 52 pazienti. Oltre alla risposta dei tumori alla terapia, vengono discusse le valutazioni fornite dai pazienti in base al cambiamento della qualità della loro vita dopo il trattamento.



## 5 Tumori trattati con Elettrochemioterapia

Nel corso delle sperimentazioni cliniche dell'elettrochemioterapia, sono stati trattati molteplici tipologie di tumore per testarne la risposta al trattamento. Alcuni tipi di neoplasie maligne si sono dimostrate essere particolarmente sensibili alla terapia con risultati incoraggianti dal punto di vista della regressione del tumore.

In questo capitolo verranno esaminati in dettaglio i vari tipi di noduli tumorali trattati e la loro risposta alla terapia con ECT.

### 5.1 Carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC)

Il carcinoma squamocellulare è un forma di cancro particolarmente diffusa che ha origine dalla moltiplicazione di cellule epiteliali maligne. Compare generalmente nelle zone maggiormente fotoesposte della cute superficiale, sviluppandosi successivamente anche negli strati sottocutanei. La luce solare è infatti la causa principale della comparsa del tumore, che risulta avere maggiore incidenza negli individui di carnagione chiara e quindi con bassa concentrazione di melanina. Il 90% dei tumori che compaiono nella zona della testa e del collo sono carcinomi a cellule squamose.

Esso si presenta con la comparsa di un piccolo nodulo che progredisce ulcerandosi. Se il carcinoma non viene riconosciuto e quindi curato in breve tempo, l'ulcerazione aumenta di dimensioni portando sanguinamento e dolore.

A differenza di altri tumori della pelle, come ad esempio il carcinoma a cellule basali, il carcinoma squamocellulare può portare metastasi nel paziente fino a causarne anche la morte.

#### 5.1.1 Risultati del trattamento con ECT

Nel corso delle sperimentazioni cliniche furono trattati con elettrochemioterapia diversi pazienti affetti da carcinoma squamocellulare della testa e del collo.

In base al tipo di terapia somministrata, furono osservati diversi risultati.

**Tabella 17. Risultati ottenuti dai vari trials nella terapia di HNSCC (sono indicati solo i noduli considerati idonei alla valutazione, non il numero totale di noduli presenti nei pazienti). CR = risposta completa; OR = risposta oggettiva.**

Terapia	Numero di pazienti e di noduli valutati	CR	OR
ECT con Bleomicina per endovena	19 pazienti con 80 noduli	45%	63,75%
ECT con Bleomicina intratumorale	8 pazienti con 8 noduli	50%	75%
ECT con Cisplatino intratumorale	1 paziente con 2 noduli	100%	100%

In Tabella 17 vengono confrontati i risultati ottenuti nei vari trials suddivisi per tipo di farmaco e modalità di somministrazione.

Si può notare come l'utilizzo di Bleomicina per via endovenosa sia stata largamente preferita e si sia impiegata nella terapia di un numero consistente di noduli, a differenza delle altre somministrazioni. I 19 pazienti trattati con questo metodo furono inseriti in trials francesi (Villejuif 13 pazienti, Reims 3 pazienti, Tolosa 1 paziente) e in un trial italiano (Pavia 2 pazienti).

Gli studi effettuati nelle cliniche francesi [17] utilizzarono un protocollo di trattamento simile che prevedeva l'iniezione di un bolo di 18000 UI/m<sup>2</sup> di Bleomicina nel paziente e l'applicazione del treno di impulsi elettrici 3,5 minuti dopo la somministrazione del farmaco. Furono utilizzati elettrodi a piastre rettangolari di acciaio inossidabile distanti 6 mm tra loro e generati 8 impulsi ad onda quadra della durata di 99 µs. Tutti i pazienti furono sottoposti ad anestesia o locale o generale in base al numero di noduli presenti sul paziente stesso.

Lo studio effettuato dall'Università di Pavia [49], invece, si svolse mediante l'infusione di 15000 UI/m<sup>2</sup> di Bleomicina nel paziente sottoposto ad anestesia generale. Il campo elettrico fu applicato 8 minuti dopo la somministrazione del farmaco mediante l'utilizzo di elettrodi esagonali con aghi ad infissione. Sia i pazienti coinvolti negli studi francesi che quelli reclutati per il trial italiano avevano ricevuto altri tipi di terapie (chemioterapia o radioterapia) prima di essere sottoposti ad ECT.

In Tabella 18 vengono riportati i risultati ottenuti nei trials francesi e quelli ottenuti nel trial italiano.

**Tabella 18. Risultati ottenuti nel trattamento con ECT ed infusione endovenosa di Bleomicina suddivisi per centro di ricerca [17][49]. CR = risposta completa, PR = risposta parziale.**

Nazionalità dello studio	Numero di pazienti	Numero di noduli valutati	Noduli che mostrarono CR	Noduli che mostrarono PR
Francese (Villejuif-Reims-Tolosa)	17	77 (su 87 totali)	33	15
Italiana (Pavia)	2	3	3	-

Per quanto riguarda il trattamento del carcinoma a cellule squamose mediante la somministrazione di Bleomicina per via intratumorale il trial si svolse in una clinica di Chicago [17] nel 1998 prima della pubblicazione dello studio ESOP. Il protocollo utilizzato prevedeva la somministrazione di una dose di Bleomicina di 1000 UI/cm<sup>3</sup> tra i 30 secondi e 10 minuti precedenti l'applicazione degli impulsi elettrici. Furono utilizzati elettrodi circolari con aghi posti a diverse distanze tra loro in base alla dimensione del nodulo da trattare.



Degli 8 pazienti coinvolti nello studio, sette erano stati precedentemente sottoposti a terapie antitumorali classiche.

L'unico paziente sottoposto ad ECT associata ad infusione intratumorale di Cisplatino partecipava ad uno studio svolto dall'Istituto Oncologico di Lubiana [17]. La dose di farmaco somministrata variava tra 0,25 mg a 2 mg in base al volume del tumore da trattare. Furono applicati negli 1-2 minuti successivi alla somministrazione di Cisplatino 8 impulsi di campo elettrico della durata di 100  $\mu$ s mediante l'ausilio di elettrodi a piastre parallele.

Anche lo studio effettuato da Campana presso l'Università di Padova [31] comprendeva un paziente affetto da HNSCC, ma non sono noti i risultati ottenuti nello specifico del trattamento di questo tumore.

## **5.2 Carcinoma a cellule basali (BCC)**

Il carcinoma basocellulare o basalioma rappresenta la forma più comune di tumore della pelle che insorge a partire dalle cellule basali presenti nell'epidermide. Similmente al carcinoma squamocellulare, anche il BCC si sviluppa maggiormente nelle zone più fotoesposte del corpo, soprattutto il viso, ed ha un'incidenza elevata nelle persone di carnagione chiara.

Si presenta generalmente con la comparsa di un'escoriazione della pelle che non guarisce o con la presenza di una cicatrice perlacea in zone non ferite precedentemente. Mostra una lenta crescita durante la quale può anche regredire spontaneamente.

Questo tipo di tumore si manifesta principalmente nella popolazione anziana e in qualche raro caso in età pediatrica. Pur essendo una neoplasia maligna, ha un bassissimo rischio di disseminazione metastatica.

### **5.2.1 Risultati del trattamento con ECT**

Pazienti affetti da basalioma sono stati inseriti in diversi trials sperimentali del trattamento con elettrochemioterapia, in quanto questo tipo di tumore si presenta come un ottimo candidato per essere sottoposto ad ECT grazie alle sue contenute dimensioni. I principali studi si svolsero negli USA, in Slovenia e in Italia e si differenziarono in base al tipo di trattamento farmacologico associato ad ECT a cui furono sottoposti i pazienti coinvolti.

In Tabella 19 sono raccolti i risultati dei vari trials, suddivisi per tipo di terapia, che verranno in seguito esaminati.

**Tabella 19. Risultati ottenuti dai vari trials nella terapia del BCC. CR = risposta completa; OR = risposta oggettiva.**

Terapia	Numero di pazienti e di noduli valutati	CR	OR
ECT con Bleomicina per endovena	3 pazienti con 8 noduli	37,5%	100%
ECT con Bleomicina intratumorale	20 pazienti con 54 noduli	94,4%	100%
ECT con Cisplatino intratumorale	1 paziente con 4 noduli	100%	100%

Dalla Tabella 19 si può subito osservare che nel trattamento del basalioma è stata preferita la terapia con infusione intratumorale di Bleomicina a differenza di quanto visto per il carcinoma squamocellulare.

I trials che studiarono la regressione del tumore sottoposto ad ECT con somministrazione di Bleomicina per via endovenosa si svolsero a Tampa, in Florida, e a Pavia. Il paziente coinvolto nella sperimentazione di Pavia [49] fu sottoposto allo stesso protocollo di trattamento visto per i due pazienti affetti da HNSCC che presero parte allo studio. Il risultato ottenuto fu incoraggiante in quanto si vide una completa remissione delle 2 lesioni trattate, situazione che si riscontrò anche 7 mesi dopo il trattamento.

Lo studio svoltosi a Tampa [17] coinvolse, invece, 2 pazienti che presentavano un totale di 6 noduli cancerosi e che erano stati precedentemente sottoposti a terapia chirurgica. Il protocollo utilizzato prevedeva l'applicazione di un treno di 8 impulsi di campo elettrico della durata di 99  $\mu$ s dopo l'infusione endovenosa di Bleomicina mediante l'utilizzo di elettrodi a pinza. Un'oggettiva risposta al trattamento fu riscontrata in tutti i noduli, mentre non si era visto alcun miglioramento quando le stesse lesioni erano state sottoposte alla sola terapia farmacologica con Bleomicina senza applicazione del campo elettrico.

In Tabella 20 sono riportati gli esiti del trattamento del BCC con ECT e somministrazione di Bleomicina per via endovenosa suddivisi in base alla nazionalità dello studio.

**Tabella 20. Risultati ottenuti nel trattamento con ECT ed infusione endovenosa di Bleomicina suddivisi per centro di ricerca [17][49]. CR = risposta completa, PR = risposta parziale.**

Nazionalità dello studio	Numero di pazienti	Numero di noduli valutati	Noduli che mostrarono CR	Noduli che mostrarono PR
Statunitense (Tampa)	2	6	1	5
Italiana (Pavia)	1	2	2	-

Il trattamento con ECT associata ad infusione intratumorale di Bleomicina fu invece somministrato ad un consistente numero di pazienti durante un altro trial effettuato all'Istituto di Ricerca di Tampa [17]. I 20 pazienti coinvolti nello studio presentavano un totale di 65 basaliomi, dei quali 54 furono trattati con

ECT, mentre gli altri 11 furono sottoposti alcuni solo a terapia farmacologica altri alla sola applicazione degli impulsi elettrici. L'ECT con infusione intratumorale di Bleomicina fu somministrata seguendo lo stesso protocollo di trattamento utilizzato per la terapia dell'HNSCC descritto nel paragrafo precedente. I risultati ottenuti dallo studio mostrarono una risposta oggettiva al trattamento in tutti i basaliomi sottoposti ad ECT, tra i quali 51 regredirono completamente nell'arco di un mese.

Lo studio svolto a Lubiana [17], che aveva coinvolto un paziente affetto da carcinoma squamocellulare, ne incluse anche uno che presentava 4 basaliomi. La terapia somministrata fu la stessa vista in precedenza per l'HNSCC: l'infusione intratumorale di Cisplatino seguita dopo 1-2 minuti dall'applicazione di un treno di impulsi di campo elettrico. I risultati ottenuti nella terapia del basalioma furono, come per il carcinoma squamocellulare, di completa regressione in tutti i noduli trattati.

### 5.3 Melanoma

Il melanoma è un tumore maligno che si origina dai melanociti, cellule della cute e della mucose preposte alla sintesi di melanina. Può insorgere in qualunque distretto corporeo, anche se è stata statisticamente dimostrata una maggiore incidenza nelle zone maggiormente esposte alla luce solare.

Il melanoma si può sviluppare dalla mutazione genetica dei melanociti presenti in un nevo preesistente o *de novo* nella zona di occhi e meningi. Si presenta generalmente come una formazione scura, dai bordi frastagliati e superficie piattata che cresce in modo più o meno rapido in direzione sia verticale che radiale. Il tumore ha un'alta probabilità di evolvere in metastasi se non viene curato entro breve tempo dalla comparsa.

#### 5.3.1 Risultati del trattamento con ECT

Diversi trials, alcuni già descritti in precedenza, coinvolsero pazienti affetti da melanoma.

Tabella 21. Risultati ottenuti dai vari trials nella terapia del melanoma. CR = risposta completa; OR = risposta oggettiva.

Terapia	Numero di pazienti e di noduli valutati	CR	OR
ECT con Bleomicina per endovena	14 pazienti con 94 noduli	34%	84%
ECT con Bleomicina intratumorale	12 pazienti con 84 noduli	89%	99%
ECT con Cisplatino intratumorale	2 pazienti con 13 noduli	100%	100%

I risultati ottenuti trattando questo tipo di tumore con ECT vengono riportati in Tabella 21 suddivisi nelle tre diverse terapie sperimentate.

Il melanoma fu trattato con elettrochemioterapia associata a somministrazione di Bleomicina per endovena in tre diversi trials svolti a Tampa (USA), a Lubiana (Slovenia) e a Tolosa (Francia). Tutti i pazienti coinvolti in questi studi erano stati precedentemente sottoposti a terapie antitumorali che non avevano dato risposte soddisfacenti. Dei 14 pazienti sottoposti al trattamento con ECT, 3 presero parte alla sperimentazione di Tampa [17], con un totale di 10 noduli trattati. La Bleomicina fu somministrata in dose di 10000 UI/m<sup>2</sup> con un'infusione di 1000-1500 UI al minuto. Il treno di impulsi elettrici fu rilasciato tra i 5 e i 25 minuti successivi alla somministrazione del farmaco e furono applicati utilizzando degli elettrodi rettangolari di acciaio con piastre distanti 20 mm tra loro.

Sia nel trial di Tolosa che in quello di Lubiana [17] furono somministrate 18000 UI/m<sup>2</sup> di Bleomicina. Inoltre, furono applicati in entrambi i casi 8 impulsi di campo elettrico della durata di 100  $\mu$ s. I due studi si differenziarono tra loro per la scelta degli elettrodi e per il numero di noduli trattati. Il trial di Tolosa infatti utilizzò degli elettrodi a piastre rettangolari poste ad una distanza di 6 mm tra loro e coinvolse 4 pazienti con 54 noduli tumorali. Il trial di Lubiana invece utilizzò elettrodi a piastre rettangolari distanti 7 mm tra loro e arruolò 7 pazienti affetti da un totale di 30 lesioni di melanoma.

I pazienti sottoposti al trattamento con ECT ed infusione intratumorale di Bleomicina presero parte tutti allo stesso studio svolto a Tampa [17]. Durante questo trial furono seguite le norme descritte dallo studio ESOPE che prevede la somministrazione di una dose di Bleomicina calcolata in base al volume del nodulo da trattare. Tutti i pazienti sottoposti al trattamento avevano ricevuto precedenti cure per il tumore.

Il trattamento con elettrochemioterapia associata ad infusione intratumorale di Cisplatino per la cura del melanoma fu studiato durante un trial svolto a Lubiana [17]. I due pazienti coinvolti erano già stati sottoposti sia a chemioterapia che a chirurgia per la rimozione del tumore. Il protocollo utilizzato prevedeva l'applicazione del treno di impulsi di campo elettrico 1-2 minuti in seguito alla somministrazione del farmaco. Fu osservata una completa risposta del tumore al trattamento in tutti i casi trattati e non vi fu alcuna comparsa di recidive nei mesi successivi alla terapia.

## 5.4 Altri tipi di tumore

Altri tipi di neoplasie maligne furono studiate prima *in vivo* e successivamente in clinica per testarne la risposta al trattamento con ECT. Non

tutte le tipologie di infusione e di farmaco furono però coinvolte nelle diverse sperimentazioni.

#### **5.4.1 Sarcoma di Kaposi**

Il sarcoma di Kaposi è una rara forma di tumore che prende origine dalle cellule epiteliali che ricoprono i vasi sanguigni o linfatici e può manifestarsi a livello della cute, delle mucose e degli organi interni. Si presenta generalmente con la comparsa di macchie rosso-violacee che possono mutare fino a diventare veri e propri noduli. L'insorgenza di questo tumore è causata dalla presenza di un tipo di Herpes Virus.

Un paziente affetto da Sarcomi di Kaposi con la presenza di 4 lesioni dovute al tumore fu coinvolto nella sperimentazione svolta a Tampa in Florida [17]. Le lesioni furono trattate con ECT e somministrazione intratumorale di Bleomicina e mostrarono tutte una completa risposta alla terapia [17].

#### **5.4.2 Adenocarcinoma**

Si definiscono adenocarcinomi tutte le neoplasie maligne che prendono origine dall'epitelio ghiandolare. Si tratta quindi di un carcinoma, ovvero un tumore maligno, derivante dalle cellule delle superfici interne del corpo umano che può interessare diversi organi come polmoni, stomaco, prostata ed utero.

Tre pazienti affetti da questo tipo di tumore furono arruolati nelle sperimentazioni di Tampa e di Villejuif e furono sottoposti ad elettrochemioterapia con somministrazione di Bleomicina per via endovenosa. I pazienti presentavano in totale 30 noduli, ma ne furono valutati solamente 22. Tutti mostrarono una completa regressione in seguito alla terapia [17].

Un paziente affetto da adenocarcinoma del seno etmoidale fu sottoposto ad ECT con infusione intratumorale di Bleomicina durante un trial svolto a Chicago [17]. Il tumore mostrò una parziale risposta a questo tipo di trattamento.

## 5.5 Principali testi citati nel capitolo

Titolo	Autori	Anno	Contenuti principali
Electrochemotherapy, electrogenetherapy and transdermal drug delivery (cap. 7) [17]	Heller, Gilbert, Jaroszeski	2010	Il capitolo descrive i risultati ottenuti in diversi trials suddividendoli in base al tipo di tumore trattato e alla terapia somministrata (sia per tipo di farmaco sia per modalità di somministrazione).
Elettrochemioterapia (ECT) nei tumori testa e collo: un'alternativa ai trattamenti convenzionali nelle forme avanzate [49]	Fumanti, Berardi, Bertino, Occhini, Mura, Tagliabue, Scelsi, Mevio, Benazzo	2011	In questo articolo vengono presentati gli esiti avuti su 3 pazienti sottoposti ad ECT con iniezione endovenosa di Bleomicina affetti da neoplasie maligne di testa e collo. Le lesioni erano state precedentemente sottoposte ad un trattamento con chirurgia e radioterapia con risultato negativo.

## **6 Conclusioni e sviluppi futuri**

I numerosi studi effettuati sull'elettrochemioterapia e la sua applicazione clinica nel trattamento di neoplasie maligne hanno dimostrato la validità del trattamento. Risultati favorevoli si sono infatti ottenuti sia sul piano terapeutico sia su quello del miglioramento della qualità della vita dei pazienti oncologici.

La presenza di effetti collaterali sistemici molto limitati colloca l'elettrochemioterapia tra i trattamenti antitumorali con minor impatto sulla vita quotidiana dei pazienti. Inoltre, il costo contenuto e la breve durata della seduta di terapia offrono grande vantaggio sia per i pazienti stessi che per il sistema sanitario. Ciò ha permesso all'ECT di entrare a far parte delle terapie antitumorali offerte dalle aziende ospedaliere.

Il limite maggiore posto allo sviluppo completo dell'elettrochemioterapia è dovuto alla possibilità di trattare solo alcuni tipi di tumori. Ad oggi infatti è stato sperimentato con successo il trattamento di neoplasie maligne superficiali o di metastasi cutanee dovute a tumori profondi.

E' attualmente oggetto di studio da parte di istituti di ricerca in tutto il mondo l'applicazione dell'elettrochemioterapia per il trattamento di altre neoplasie maligne. Sia in campo medico che in campo ingegneristico si stanno infatti sperimentando nuovi approcci a questa tecnica e nuove apparecchiature elettromedicali in grado di ampliare lo spettro dei tumori e dei soggetti trattabili.





## Appendice – Cronologia Degli Eventi

### Studio dei farmaci

- **1988**: pubblicazione dello studio sull'aumento della citotossicità di farmaci antitumorali associati ad elettroporazione delle membrane cellulari (Orlowski) [21].
- **1991**: Pubblicazione di uno studio sull'aumento dell'effetto della Bleomicina grazie all'ECT (Mir) [33].
- **1992**: pubblicazione del primo studio sull'ECT associata ad immunostimolazione di Interleuchina-2 (Mir)
- **1995**: pubblicazione del primo studio *in vivo* sull'ECT con Cisplatino (Sersa) [23].
- **1997**: Pubblicazione di uno studio sul cambiamento della cinetica dei farmaci utilizzati in ECT (Jaroszeski).
- **1996**: pubblicazione di un articolo che riassume gli utilizzi della Bleomicina in chemioterapia ed in ECT (Mir) [50].

### Studi pre-ESOPE

- **1993**: pubblicazione studio su ECT con Bleomicina per via endovenosa nel trattamento del carcinoma a cellule squamose (Belehradek) [5].
- **1996**: pubblicazione di tre diversi studi su ECT con Bleomicina
  - Studio sul trattamento del carcinoma a cellule squamose e del carcinoma della mammella con Bleomicina per via endovenosa (Domenge) [38].
  - Studio sul trattamento del melanoma con Bleomicina per via intratumorale (Glass) [39].
  - Studio sul trattamento del carcinoma a cellule basali, del carcinoma della mammella e del melanoma maligno con Bleomicina per via endovenosa (Heller) [40].
- **1998**: pubblicazione di due studi
  - Studio su ECT con Bleomicina per via intratumorale nel trattamento di melanoma, carcinoma a cellule squamose e sarcoma di Kaposi (Heller) [41].
  - Studio sul trattamento di metastasi cutanee di tumore alla vescica (Kubota) [42].
- **2000**: pubblicazione di tre studi
  - Studio su ECT con Bleomicina intratumorale nel trattamento del melanoma (Gehl) [43].

- Studio su ECT con Bleomicina per via endovenosa nel trattamento dell'ipernefroma (Sersa) [44].
- Studio su ECT con Bleomicina per via endovenosa nel trattamento del melanoma (Rols) [45].
- **2001**: pubblicazione di due studi
  - Studio sul trattamento del melanoma, del carcinoma a cellule basali, del carcinoma a cellule squamose e di metastasi cutanee del tumore al seno con Bleomicina per via intratumorale (Rodriguez-Cueva) [46].
  - Studio sul trattamento di tumori della testa e del collo con Bleomicina per via intratumorale (Allegretti) [47].

#### Fasi dello studio ESOPE

- **Dal 2003 al 2005**: reclutamento dei pazienti nei quattro centri di ricerca europei coinvolti nello studio.
- **2006**: pubblicazione dei risultati dello studio ESOPE (Marty) [32].
- **2006**: Pubblicazione del protocollo standard da utilizzare nell'applicazione del trattamento con ECT derivato dalle procedure utilizzate durante lo studio ESOPE (Mir) [29].

#### Studi post-ESOPE

- **2009**: pubblicazione di uno studio sulla qualità della vita dei pazienti sottoposti ad ECT (Campana) [31].
- **2011**: pubblicazione di uno studio sull'ECT nei tumori della testa e del collo (Fumanti) [49].

## Bibliografia

- [1] [«http://www.igea.it/interno.php?p=7&voce=77&id=265&t=1»](http://www.igea.it/interno.php?p=7&voce=77&id=265&t=1).
- [2] J. C. Weaver e Y. A. Chizmadzhev, «Theory of electroporation: A review», *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 41, n°. 2, pagg. 135-160, Dic 1996.
- [3] S. Abe e J. Takeda, «Possible Involvement of Calmodulin and the Cytoskeleton in Electrofusion of Plant Protoplasts», *Plant Physiology*, vol. 81, n°. 4, pagg. 1151-1155, Ago 1986.
- [4] Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider PH., «Gene Transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields», *EMBO J*, 1982.
- [5] Belehradec M., Domenge C., Luboinski B., Orlowski S., Belehradec Jr J., Mir LM, «Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial.», *Cancer*, 1993.
- [6] Davalos R. V., Mir L. M., Rubinsky B., «Tissue ablation with irreversible electroporation», *Annals of Biomedical Engineering*, 2005.
- [7] [«http://www.cesareavanzi.eu/veicolazione\\_transdermica.htm»](http://www.cesareavanzi.eu/veicolazione_transdermica.htm).
- [8] «Encarta 2000».
- [9] A. J. Bruce Alberts, «Molecular Biology of the Cell», 2002.
- [10] Tadej Kotnik, «Biological Cells in Electric Fields», presented at the Proceedings of the Electroporation based Technologies and Treatments, 2009.
- [11] C. Furie, M. Golzio, E. Phez, J. Teissié, M. P. Rols, «Electric field induced cell membrane permeabilization and gene transfer: Theory and Experiments», *Eng. Life Sci.*, 2005.
- [12] B. Rubinsky, *Irreversible Electroporation*. Springer, 2010.
- [13] L. M. Mir, «Therapeutic perspectives of in vivo cell electropermeabilization», *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 53, n°. 1, pagg. 1-10, Gen 2001.
- [14] G. Sersa, D. Miklavcic, M. Cemazar, Z. Rudolf, G. Pucihar, e M. Snoj, «Electrochemotherapy in treatment of tumours», *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, vol. 34, n°. 2, pagg. 232-240, Feb 2008.
- [15] M. L.M., «Bases and rationale of the electrochemotherapy», *European Journal of Cancer Supplements*, vol. 4, n°. 11, pagg. 38-44, Nov 2006.
- [16] Breton M., Mir LM., «Microsecond and Nanosecond Electric Pulses in Cancer Treatments», *BEMS*, 2011.
- [17] M. J. Jaroszeski, R. Heller, R. Gilbert, e R. G. (PhD.), *Electrochemotherapy, electrogenetherapy, and transdermal drug delivery: electrically mediated delivery of molecules to cells*. Humana Press, 2000.
- [18] Bertram G. Katzung, *Farmacologia generale e clinica*, VI edizione. Piccin.

- [19] S. Kee, *Clinical Aspects of Electroporation*. Springer, 2011.
- [20] S. Orłowski e L. M. Mir, «Cell electropermeabilization: a new tool for biochemical and pharmacological studies», *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1154, n°. 1, pagg. 51-63, Giu 1993.
- [21] S. Orłowski, J. Belehradek Jr., C. Paoletti, e L. M. Mir, «Transient electropermeabilization of cells in culture: Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs», *Biochemical Pharmacology*, vol. 37, n°. 24, pagg. 4727-4733, Dic 1988.
- [22] J. Jean Belehradek, S. Orłowski, L. H. Ramirez, G. Pron, B. Poddevin, e L. M. Mir, «Electropermeabilization of cells in tissues assessed by the qualitative and quantitative electroloading of bleomycin», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1190, n°. 1, pagg. 155-163, Feb 1994.
- [23] G. Sersa G., Cemazar M., Miklavcic D., «Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice.», *Cancer Res*, 1995.
- [24] Cemazar M., Milacic R., Miklavcic D., Dolzan V., Sersa G., «Intratumoral cisplatin administration in electrochemotherapy: antitumor effectiveness, sequence dependence and platinum content.», *Anti-Cancer Drugs*, 1998.
- [25] M. Pavlin, V. Leben, e D. Miklavčič, «Electroporation in dense cell suspension—Theoretical and experimental analysis of ion diffusion and cell permeabilization», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1770, n°. 1, pagg. 12-23, Gen 2007.
- [26] L. M. Mir, S. Orłowski, B. Poddevin, e J. Belehradek Jr, «Electrochemotherapy tumor treatment is improved by interleukin-2 stimulation of the host's defenses», *European Cytokine Network*, vol. 3, n°. 3, pagg. 331-334, Giu 1992.
- [27] T. Yamamoto, «Bleomycin and the skin», *British Journal of Dermatology*, 2006.
- [28] Peter Saitta, Ba, Karthik Krishnamurthy, Do,Y And Lance H. Brown, Mdz, «Bleomycin in Dermatology: A Review of IntralesionalApplications», *Wiley Periodicals, Inc*, 2008.
- [29] L. M. Mir et al., «Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes», *European Journal of Cancer Supplements*, vol. 4, n°. 11, pagg. 14-25, Nov 2006.
- [30] *Farma annuario 2011*. Punto Effe, 2011.
- [31] L. G. Campana et al., «Bleomycin-based electrochemotherapy: clinical outcome from a single institution's experience with 52 patients», *Annals of Surgical Oncology*, vol. 16, n°. 1, pagg. 191-199, Gen 2009.

[32] M. Marty et al., «Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study», *European Journal of Cancer Supplements*, vol. 4, n°. 11, pagg. 3-13, Nov 2006.

[33] L. M. Mir, S. Orlowski, J. Belehradek Jr, e C. Paoletti, «Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses», *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, vol. 27, n°. 1, pagg. 68-72, 1991.

[34] L. M. Mir et al., «[Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]», *Comptes Rendus De l'Académie Des Sciences. Série III, Sciences De La Vie*, vol. 313, n°. 13, pagg. 613-618, 1991.

[35] «<http://www.nimh.nih.gov/health/publications/a-participants-guide-to-mental-health-clinical-research/what-are-the-different-types-of-clinical-research.shtml>».

[36] A. Gothelf, L. M. Mir, e J. Gehl, «Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation», *Cancer Treatment Reviews*, vol. 29, n°. 5, pagg. 371-387, Ott 2003.

[37] S. Gregor, «The state-of-the-art of electrochemotherapy before the ESOPE study; advantages and clinical uses», *European Journal of Cancer Supplements*, vol. 4, n°. 11, pagg. 52-59, Nov 2006.

[38] C. Domenge et al., «Antitumor electrochemotherapy: new advances in the clinical protocol», *Cancer*, vol. 77, n°. 5, pagg. 956-963, Mar 1996.

[39] L. F. Glass, M. L. Pepine, N. A. Fenske, M. Jaroszeski, D. S. Reintgen, e R. Heller, «Bleomycin-mediated electrochemotherapy of metastatic melanoma», *Archives of Dermatology*, vol. 132, n°. 11, pagg. 1353-1357, Nov 1996.

[40] R. Heller et al., «Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy», *Cancer*, vol. 77, n°. 5, pagg. 964-971, Mar 1996.

[41] R. Heller et al., «Treatment of cutaneous and subcutaneous tumors with electrochemotherapy using intralesional bleomycin», *Cancer*, vol. 83, n°. 1, pagg. 148-157, Lug 1998.

[42] Y. Kubota, L. M. Mir, T. Nakada, I. Sasagawa, H. Suzuki, e N. Aoyama, «Successful treatment of metastatic skin lesions with electrochemotherapy», *The Journal of Urology*, vol. 160, n°. 4, pag. 1426, Ott 1998.

[43] J. Gehl e P. F. Geertsen, «Efficient palliation of haemorrhaging malignant melanoma skin metastases by electrochemotherapy», *Melanoma Research*, vol. 10, n°. 6, pagg. 585-589, Dic 2000.

[44] G. Sersa, T. Cufer, M. Cemazar, M. Rebersek, e R. Zvonimir, «Electrochemotherapy with bleomycin in the treatment of hypernephroma metastasis: case report and literature review», *Tumori*, vol. 86, n° 2, pagg. 163-165, Apr 2000.

[45] M. P. Rols, J. M. Bachaud, P. Giraud, C. Chevreau, H. Roché, e J. Teissié, «Electrochemotherapy of cutaneous metastases in malignant melanoma», *Melanoma Research*, vol. 10, n° 5, pagg. 468-474, Ott 2000.

[46] S. Rodríguez-Cuevas, S. Barroso-Bravo, J. Almanza-Estrada, L. Cristóbal-Martínez, e E. González-Rodríguez, «Electrochemotherapy in primary and metastatic skin tumors: phase II trial using intralesional bleomycin», *Archives of Medical Research*, vol. 32, n° 4, pagg. 273-276, Ago 2001.

[47] J. P. Allegretti e W. R. Panje, «Electroporation therapy for head and neck cancer including carotid artery involvement», *The Laryngoscope*, vol. 111, n° 1, pagg. 52-56, Gen 2001.

[48] L. M. Mir et al., «Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy.», *British Journal of Cancer*, vol. 77, n° 12, pagg. 2336-2342, Giu 1998.

[49] C. Fumanti et al., «Elettrochemioterapia (ECT) nei tumori testa e collo: un'alternativa ai trattamenti convenzionali nelle forme avanzate», *Bollettino della Società Medico Chirurgica di Pavia*, vol. 124, n° 2, pagg. 245-248, Mag 2011.

[50] L. M. Mir, O. Tounekti, e S. Orlowski, «Bleomycin: Revival of an old drug», *General Pharmacology: The Vascular System*, vol. 27, n° 5, pagg. 745-748, Lug 1996.