

RUOLO DELL'ANGIOGENESI NEL CARCINOMA RENALE

B. Bussolati¹, M.A. Satolli², G. Camussi¹

¹ Laboratorio di Fisiopatologia Renale e Vascolare, Dipartimento di Medicina Interna e Centro Interdipartimentale di Biotecnologie, Ospedale Molinette, Università degli Studi, Torino

² Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana, Ospedale Molinette, Università degli Studi, Torino

The role of angiogenesis in renal carcinoma

Renal cell carcinoma is characterized by intense angiogenesis associated with the inactivation of the von Hippel-Lindau oncosuppressor gene with consequent hyperexpression of proangiogenic factors. Functional and molecular characterization of renal tumor endothelial cells has demonstrated an increase in angiogenesis and cell survival. The proangiogenic phenotype was due to hyperactivation of the PI3K/Akt/mTor pathway, which downregulates the synthesis of the antiangiogenic factor thrombospondin-1. Moreover, renal tumor endothelial cells presented an immature and embryonic phenotype with expression of the embryonic kidney-specific gene PAX-2. It is conceivable that the endothelium present in renal carcinoma is heterogeneous, with a possible origin from adjacent vessels, resident or circulating stem cells, or from the tumor cells themselves. The relevance of the angiogenic process in renal carcinoma is underlined by the therapeutic effect of antiangiogenic drugs. Different drugs against VEGF, such as the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab, and small molecule tyrosine-kinase inhibitors, such as sunitinib and sorafenib, showed a clinical effect in patients with metastatic carcinoma. However, antiangiogenic therapy, although beneficial, is not sufficient per se. These studies suggest a role for the angiogenic program in the growth and dissemination of renal carcinoma and indicate the need for new therapeutic strategies. (G Ital Nefrol 2008; 25: 297-305)

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

Endothelial cells,
Therapy,
Renal Tumor,
VEGF

PAROLE CHIAVE:

Cellule
endoteliali,
Terapia,
Tumore renale,
VEGF

✉ Indirizzo dell'Autore:

Prof.ssa Benedetta Bussolati
Dipartimento di Medicina Interna
Ospedale Molinette
Corso Dogliotti, 14
10126 Torino
e-mail: benedetta.bussolati@unito.it
www.rvplab.unito.it

INTRODUZIONE

Il carcinoma renale (CR) è un tipo comune di tumore urologico e rappresenta circa il 3% di tutte le forme tumorali umane (1). Il rapporto annuale fra la mortalità e l'incidenza per il carcinoma renale è significativamente più alto rispetto agli altri tumori urologici. È stato stimato che il 25-30% di tutti i pazienti con carcinoma renale hanno metastasi già al momento dell'identificazione del tumore e, anche dopo la completa resezione del tumore primario tramite nefrectomia radicale, la recidiva compare nel 20-30% dei pazienti (1). Il carcinoma renale è resistente ai trattamenti chemioterapici e radioterapici (2). Poiché l'inattivazione del gene onco-

soppressore von Hippel-Lindau presente tipicamente nel CR convenzionale porta all'iperespressione di fattori angiogenici, il CR metastatico si qualifica come ottimo candidato per l'utilizzo di terapie antiangiogenetiche (3). In effetti, diversi farmaci diretti contro il VEGF, quali anticorpi monoclonali anti-VEGF (bevacizumab), e piccole molecole che inibiscono i recettori del VEGF, come il sunitinib ed il sorafenib, hanno dimostrato un'attività clinica in pazienti con CR metastatico. Lo studio delle caratteristiche funzionali e molecolari dell'endotelio nel carcinoma renale, così come l'identificazione dell'origine delle cellule endoteliali da vasi circostanti o da cellule staminali può contribuire all'identificazione di ulteriori bersagli terapeutici.

L'ANGIOGENESI

La genesi dei vasi sanguigni durante la vita embrionale è detta **vasculogenesi**. In questa fase cellule non differenziate, angioblasti, stimolati da VEGF, FGF basico, IGF-1 o GM-CSF differenziano in cellule endoteliali formando la rete vascolare (4).

Nell'individuo adulto, la formazione di nuovi vasi, detta **angiogenesi** è caratterizzata da un rimodellamento della rete vascolare, con lo sviluppo di vasi che gemmano a partire da altri preesistenti (4). Il VEGF è uno dei principali fattori pro-angiogenetici. L'importanza cruciale del VEGF nello sviluppo vascolare è evidenziata dal fatto che la delezione di 1 solo dei 2 alleli del VEGF non è compatibile con la vita in topi *knock-out* (5). Anche l'assenza del gene dei recettori del VEGF porta a gravi malformazioni funzionali dei vasi, ed a morte in età embrionale (5). Dopo il legame del VEGF, il suo recettore dimerizza ed è in grado di trasfosforilare alcuni specifici residui di tirosina nel versante intracitoplasmatico, generando segnali di motilità, proliferazione, sopravvivenza e organizzazione funzionale nell'endotelio.

Nell'adulto, il processo angiogenetico si attiva in condizioni fisiologiche, quali le modificazioni mensili dell'apparato riproduttivo femminile e la gravidanza, ed in processi riparativi delle ferite. In queste condizioni, l'angiogenesi si manifesta come un processo finemente regolato da fattori che ne determinano l'entità, l'inizio e la fine. Al contrario, in condizioni patologiche, quali lo sviluppo e la propagazione tumorale, l'angiogenesi si manifesta come un processo disregolato ed eccessivo (6).

ANGIOGENESI E TUMORI

I tumori per crescere più di 1 o 2 mm³ hanno bisogno di un afflusso sanguigno molto elevato (6). L'angiogenesi è richiesta per la crescita invasiva e la metastatizzazione dei tumori, ed è un fattore determinante nella progressione della malattia. Questo concetto è talmente associato nella pratica clinica che la valutazione della densità microvascolare è considerata un indice prognostico indipendente in diversi tumori, quali tumore della mammella e della prostata (7).

È stato proposto che il cambiamento fenotipico dei tumori da una forma quiescente ad una invasiva sia dovuto all'acquisizione di proprietà angiogeniche e di vascolarizzazione del tumore. Il concetto che i vasi neoformati siano differenti dai vasi quiescenti dell'individuo adulto è alla base dell'uso di inibitori specifici della neoangiogenesi nella terapia del cancro (8). Cellule endoteliali tumorali angiogenetiche esprimono i recettori per l'adesione alla matrice e per fattori

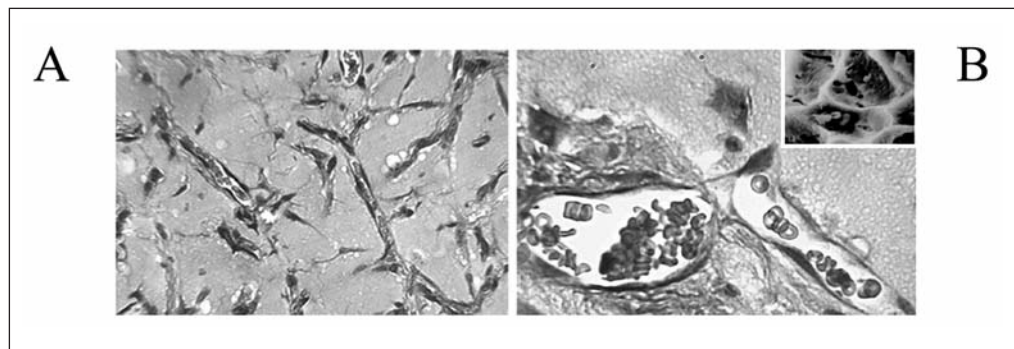
angiogenetici che sono assenti o poco espressi nei vasi normali (4). Queste caratteristiche sono comuni ai vasi neo-formati. Tuttavia, recenti evidenze indicano che le cellule endoteliali dei vasi tumorali possiedono proprie caratteristiche peculiari. Le cellule endoteliali tumorali presentano un profilo di espressione genica differente da quello dell'endotelio normale (9) e possono acquisire resistenza ai farmaci anti-angiogenetici (10).

L'espressione di marcatori specifici dell'endotelio tumorale permette di progettare terapie volte ad inibire l'angiogenesi tumorale. Idealmente, la terapia antiangiogenetica si propone come terapia ad ampio spettro, essendo l'angiogenesi un fenomeno comune a molti tipi di tumore; specifica, data la diversità con i vasi quiescenti dei tessuti normali, a bassa tossicità, dovuta alla relativa assenza in un organismo adulto di fenomeni di angiogenesi, ed ad elevata biodisponibilità del farmaco, che raggiunge direttamente il bersaglio per via ematica.

RUOLO DI HIF E VEGF NEL CARCINOMA RENALE

Diversi studi hanno mostrato che il processo angiogenetico ha un ruolo rilevante nel carcinoma renale. In particolare, nel CR svolge un aspetto patogenetico l'associazione del carcinoma renale con mutazioni del gene per von Hippel Lindau (VHL), un gene ad attività soppressore tumorale, posizionato sul braccio corto del cromosoma 3 (11). I pazienti con sindrome di VHL hanno ereditato un allele inattivo del gene VHL. Lo sviluppo tumorale in questi pazienti è dovuto all'inattivazione del rimanente allele in una cellula suscettibile, con perdita del prodotto del gene VHL. Più di 30 anni fa, Knudson (12) e Comings (13), hanno predetto che il gene responsabile per la forma ereditaria di tumore svolge un ruolo anche nella controparte non ereditaria. In effetti, nel CR sporadico, il gene VHL è spesso inattivato come risultante di mutazioni o ipermetilazioni. La proteina codificata dal gene VHL fa parte di un complesso di una ligasi E3 per l'ubiquitina. Tra i differenti substrati del complesso VHL ubiquitina ligasi, è stato identificato come fattore chiave l'HIF, fattore di trascrizione indotto da ipossia, che, una volta legato, viene poliubiquitinilato e degradato da parte di proteosomi (11). Maxwell et al. (14) hanno per primi mostrato che cellule difettive per VHL non sono in grado di degradare la subunità HIF α in condizioni di normossia. La mancanza o l'inattività di VHL, mimando condizioni di ipossia, favorisce l'accumulo di HIF, causando alterazioni nell'espressione genica di molti fattori indotti da ipossia. Tra i fattori principali, vi sono il VEGF ed il PDGF, come evidenziato da diversi lavori che mostrano un aumento di angiogenesi e di fattori angiogenetici nel tessuto tumorale (15-17).

Fig. 1 - Modello di angiogenesi tumorale in topo SCID. Pannello A e B: immagine rappresentativa delle strutture vascolari formate dalle cellule endoteliali derivanti da CR, inoculate sottocute in presenza di Matrigel (membrana basale ricostituita) in topi SCID per 6 giorni. Cellule endoteliali di vasi normali nelle stesse condizioni vanno incontro ad apoptosi. In B è evidente la presenza di eritrociti, che indicano la connessione dei vasi tumorali umani con le strutture vascolari del topo. Nell'inserto: l'immagine di microscopia elettronica a scansione mostra la presenza di larghe fenestrate nei vasi formati dalle cellule endoteliali di CR. (ingrandimenti: A x100, B x400, C x1500).



CARATTERIZZAZIONE DELL'ENDOTELIO NEL CARCINOMA RENALE

Recentemente abbiamo isolato e caratterizzato diverse linee di cellule endoteliali derivate da CR (18). La principale caratteristica di tali cellule endoteliali è l'espressione di un fenotipo pro-angiogenico rispetto a cellule del micro-endotelio normale. Studi *in vitro* mostrano che le cellule endoteliali derivate da CR sono resistenti all'apoptosi, proadesive nei confronti di cellule di carcinoma renale e, se coltivate in Matrigel, formano, pur in assenza di siero, strutture simil-capillari persistenti nel tempo. *In vivo* le cellule endoteliali derivate da carcinoma renale umano, impiantate sottocute in topi SCID immunodeficienti, formano un *network* funzionale che si connette ai vasi del topo (Fig. 1).

Alla base di queste caratteristiche funzionali, abbiamo identificato l'attivazione di "pathway" molecolari che determinano la produzione autocrina di fattori di crescita e la riduzione di inibitori dell'angiogenesi. L'attivazione costitutiva dell'asse PI3K/Akt/mTor determina una ridotta sintesi di trombospondina-1 che è un potente inibitore dell'angiogenesi (18, 19). L'attivazione di questa via di segnale si associa alla riduzione del gene oncosoppressore PTEN e ad un'aumentata sopravvivenza e capacità angiogenetica delle cellule endoteliali derivate da CR. Strategie che hanno lo scopo di inibire la "pathway" PI3K/Akt/mTor possono ristabilire un fenotipo endoteliale normale nelle cellule tumorali renali promuovendo la produzione di trombospondina-1 (19). Questi studi supportano un approccio terapeutico basato sull'inibizione di mTor nel CR (20).

Abbiamo inoltre dimostrato che le TEC presentano un fenotipo immaturo ed embrionale (21, 22), infatti, queste cellule endoteliali esprimono il gene embrionale PAX-2, fattore di trascrizione organo specifico espres-

so a livello embrionale dal rene e quindi represso nel tessuto adulto. L'espressione di PAX-2 regola negativamente il gene oncosoppressore PTEN determinando un'attivazione costitutiva di Akt e controlla diverse tappe coinvolte nell'angiogenesi, quali sopravvivenza, proliferazione, invasione e organizzazione cellulare (21). Inoltre, il PAX-2 controlla nelle cellule endoteliali derivate da CR l'espressione della *neural cell adhesion molecule* (NCAM), molecola che non è espressa dall'endotelio normale (22). L'espressione di NCAM modulata da PAX-2 è critica per la capacità dell'endotelio di organizzarsi formando vasi (22) (Fig. 2).

Questi dati sulle caratteristiche pro-angiogenetiche ed embrionali delle cellule endoteliali derivate da CR sono in accordo con diversi dati della letteratura, che dimostrano che l'endotelio dei tumori è alterato fenotipicamente e funzionalmente. Inoltre, è stato dimostrato che l'endotelio tumorale non è stabile geneticamente, supportando il concetto che l'endotelio del tumore possa acquisire resistenza alla terapia (23).

ORIGINI DELL'ENDOTELIO TUMORALE NEL CARCINOMA RENALE

Il microambiente svolge sicuramente un ruolo nella stimolazione pro-angiogenetica dell'endotelio tumorale. Tuttavia, per spiegare le caratteristiche pro-angiogenetiche ed embrionali dell'endotelio tumorale sono state proposte diverse ipotesi che si basano su di una possibile diversa origine dell'endotelio tumorale. Le cellule tumorali stesse potrebbero de-differenziare assumendo un fenotipo embrionale con caratteristiche simil-endoteliali (24), oppure le cellule staminali residenti nel tumore potrebbero contribuire *in vivo* alla crescita del tumore stesso (25); o ancora precursori endoteliali circolanti derivati dal midollo osseo e reclutati nei vasi

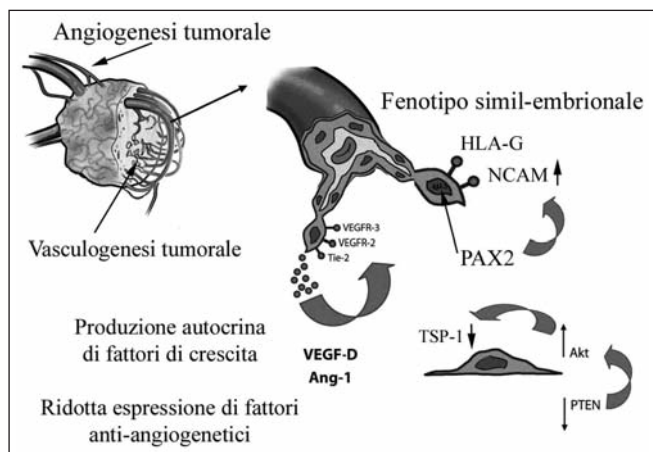


Fig. 2 - Caratteristiche delle cellule endoteliali nel CR. Le cellule endoteliali presentano caratteristiche pro-angiogenetiche, con produzione autocrina di fattori di crescita quali VEGF-D ed angiopoietina-1 (Ang-1) e riduzione del fattore anti-angiogenetico trombospondina (TSP)-1. Queste caratteristiche sono conseguenti all'aumento dell'asse PI3K/Akt conseguenti a ridotta espressione del suo regolatore negativo PTEN. Inoltre, le cellule endoteliali del CR presentano un fenotipo immaturo con iperespressione di geni embrionali quali PAX-2, NCAM ed HLA-G (vedi testo). Cellule endoteliali da vasi adiacenti al tumore possono contribuire alla vascolarizzazione del CR mediante un processo di angiogenesi. Inoltre, cellule staminali residenti o circolanti possono dare origine alla formazione intratumorale dei vasi con un processo di vasculogenesi simil embrionale.

tumoralmente potrebbero dare origine a cellule endoteliali con un fenotipo alterato (26). È molto probabile che le cellule endoteliali presenti nel carcinoma renale siano una popolazione eterogenea di varia origine.

Numerosi studi hanno indicato che progenitori endoteliali circolanti (EPC) sono presenti come componente del midollo osseo adulto e circolano nel sangue periferico, giocando un ruolo essenziale nella vascolarizzazione e nella crescita del tumore (27). Inoltre, un'aumentata frequenza di EPC è stata rilevata nel circolo di pazienti oncologici, ed è stata dimostrata una correlazione tra la produzione tumorale di VEGF e la mobilitazione delle EPC (28). La misura in cui le EPC contribuiscono alla generazione dell'endotelio tumorale è risultata estremamente variabile nei diversi studi, e questo fatto sembra dipendere dal tipo e dal grado del tumore. Recenti dati ottenuti da tumori umani mostrano un contributo minimo dei precursori endoteliali derivati da midollo osseo alla vascolarizzazione tumorale (29). In più è stato recentemente proposto che cellule derivate dal midollo osseo possano differenziarsi in periciti dei vasi tumorali e possano contribuire all'angiogenesi tumorale producendo fattori di crescita (28).

Oltre che dalle EPC, le cellule endoteliali nel CR potrebbero derivare da cellule staminali normali o tumorali residenti nel tessuto, o da endotelio normale redirezionato verso un fenotipo embrionale da fattori derivati dalle cellule tumorali o da cellule staminali. Abbiamo recentemente dimostrato la presenza in car-

cinomi renali di cellule staminali CD133+ derivate da cellule staminali residenti precedentemente identificate nel rene adulto normale e capaci di generare sia la componente epiteliale sia quella vascolare (30, 31). Cellule staminali residenti CD133+ contribuiscono in modelli sperimentali in topo SCID alla crescita e vascolarizzazione del carcinoma renale. Questi dati suggeriscono che cellule staminali residenti nel tessuto normale possano essere reclutate dal tumore e siano coinvolte nella formazione e progressione dei carcinomi renali differenziandosi in endotelio e contribuendo così ad una vasculogenesi "simil embrionale" locale.

TRATTAMENTO CON FARMACI ANTIANGIOGENETICI

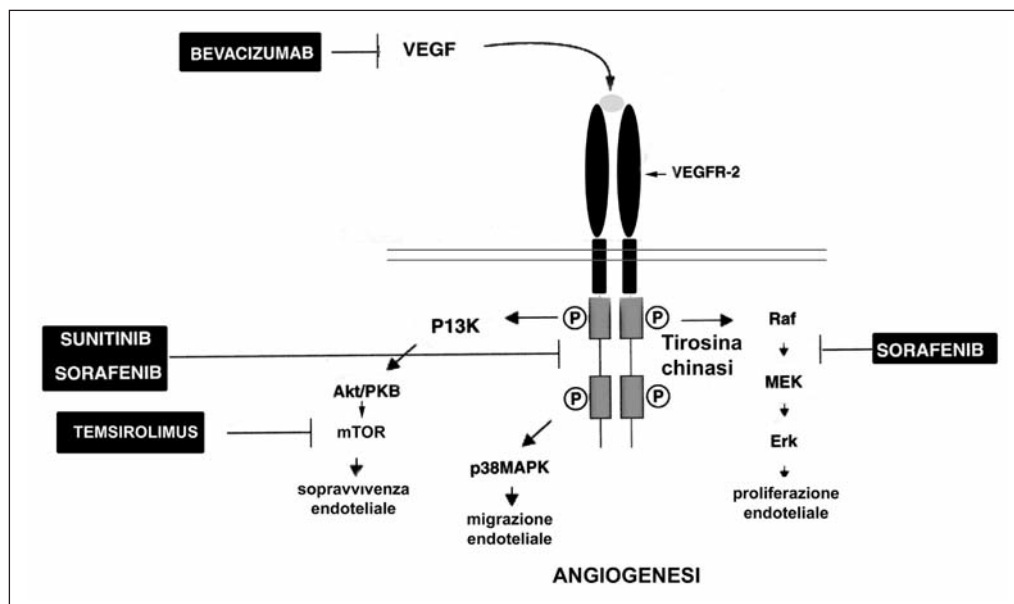
Il CR è resistente ai trattamenti chemioterapici e radioterapici: attualmente la chirurgia rappresenta il trattamento di elezione nella malattia localizzata mentre per la malattia metastatica in cui l'opzione chirurgica non sia attuabile, l'immunoterapia con l'interleuchina-2 (IL-2) e/o con l'interferone- α (INF- α) rappresentavano fino ad ora i protocolli di prima scelta (1, 2). Tuttavia, i tassi di risposta attesi sono risultati difficilmente superiori al 30%, lasciando di fatto la terapia farmacologica priva di protocolli di riconosciuta efficacia (32).

Il trattamento del CR ha subito un grande cambiamento con l'utilizzo di farmaci volti ad inibire l'angiogenesi. Tra questi, farmaci volti ad inibire il VEGF o la traduzione del segnale indotta da VEGF sono già stati approvati per uso clinico (33) (Fig. 3 e Tab. I).

L'attività clinica dell'anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato anti-VEGF (**Bevacizumab**) nel carcinoma renale a cellule chiare metastatico è stata valutata in uno studio di fase II che non ha portato ad un vantaggio sulla sopravvivenza globale. Le tossicità più frequenti sono state rappresentate dall'ipertensione e dalla proteinuria, mentre non sono stati descritti eventi tromboembolici (34). Il bevacizumab è anche in corso di valutazione in associazione con le citochine standard per il trattamento del CR: attualmente siamo in attesa dei risultati di due studi randomizzati di fase III che valutano l'associazione del bevacizumab all'INF- α vs l'INF- α da solo o INF- α + placebo (35). Inoltre, sono in corso studi di associazione del bevacizumab con l'IL-2 ad alte e basse dosi.

Il **Volociximab** (M200) è un anticorpo monoclonale umano chimerico diretto contro l'integrina $\alpha 5\beta 1$ (recettore principale per la fibronectina) che ha dimostrato *in vitro* una potente attività inibitoria sull'angiogenesi indotta sia da VEGF che da FGF basico. Attualmente siamo in attesa dei risultati clinici definitivi di due studi di fase II che valutavano l'efficacia di questo anticorpo (10 mg/kg e.v. ogni 2 settimane) in

Fig. 3 - Meccanismo d'azione di farmaci anti-angiogenetici utilizzati nel CR. I farmaci anti-angiogenetici inibiscono l'effetto del VEGF sulla cellula endoteliale su tre livelli distinti. L'anticorpo anti-VEGF bevacizumab blocca il legame del VEGF col suo recettore; inibendo direttamente l'azione del fattore. Gli inibitori delle chinasi recettoriali quali sunitinib e sorafenib inibiscono la fosforilazione di recettori per fattori di crescita endoteliali quali il recettore2 del VEGF, bloccando la traduzione del suo segnale. Il sorafenib blocca anche la Raf kinasi, coinvolta in una delle vie di traduzione del segnale. Il temsirolimus agisce su mTor, inibendo la via di segnale PI3K/Akt/mTor coinvolta in diversi effetti del VEGF come la sopravvivenza cellulare.



pazienti con RCC in fase metastatica (36).

Risultati più incoraggianti sono stati ottenuti con gli inibitori delle tirosin-chinasi. Il **Sorafenib** (BAY 43-9006; Nexavar) è una piccola molecola inibitore di diverse proteine serina/treonina chinasi citoplasmatiche e tirosin-kinasi, tra cui quelle dei recettori di VEGF e PDGF. Lo studio randomizzato di fase II con sorafenib vs placebo (37) ha mostrato risultati incoraggianti con il 71% di risposta minima o stabilizzazione di malattia nel gruppo trattato con sorafenib e con una mediana di sopravvivenza libera da progressione (PFS) di 24 settimane contro le 6 settimane del gruppo trattato con placebo. Il successivo studio di randomizzato di fase III, in doppio cieco, con sorafenib vs placebo (38) aveva evidenziato un raddoppio significativo della sopravvivenza libera da progressione nei pazienti trattati con sorafenib (5.5.mesi vs 2.8 mesi), costringendo l'FDA statunitense a richiedere il passaggio a sorafenib di tutti i pazienti ancora in trattamento con placebo. Tuttavia il beneficio sulla sopravvivenza globale non è risultato statisticamente significativo per l'insufficiente numero di eventi. Diarrea, rash, fatigue e sindrome mano-piede sono stati gli eventi avversi più frequenti. In Italia, il Sorafenib è registrato in Gazzetta Ufficiale dal novembre 2006 per il trattamento di pazienti con carcinoma renale avanzato dopo fallimento terapeutico ad una precedente terapia a base di INF- α o IL-2, o che sono considerati non idonei a ricevere tale terapia.

Il **Sunitinib** (SU11248; Sutent) è una piccola molecola somministrata per via orale in grado di inibire tirosin-kinasi appartenenti a diversi recettori (VEGFR, PDGFR, KIT) implicati nella proliferazione delle cellule tumorali,

nell'angiogenesi e nella progressione tumorale. Sunitinib è stato valutato nei pazienti con CR metastatico già pretrattati con citochine in due studi di fase II (39, 40), ottenendo una mediana di PFS di 8.3 mesi ed un tasso di risposta del 42%. Per entrambi gli studi la tossicità più comune è stata rappresentata da fatigue, diarrea, mucosite del cavo orale; frequenti anche neutropenia, anemia ed incremento delle lipasi. Recentemente uno studio randomizzato di fase III (41), ha mostrato miglioramento della sopravvivenza libera da progressione (11 mesi vs 5 mesi) rispetto all'INF- α . Questo *trial* ha portato il sunitinib ad essere uno dei farmaci di prima scelta in pazienti con CR metastatico. In Italia il Sunitinib è ancora registrato in Gazzetta Ufficiale per il trattamento di pazienti con carcinoma renale avanzato e/o metastatico dopo fallimento terapeutico ad una precedente terapia a base di INF- α o IL-2.

Diversi altri inibitori di tirosin chinasi multitarget (SU5416, PTK787/ZK222584, ABT510, AZD2171) sono ancora in fase di studio.

Il temsirolimus (CCI-779), è un inibitore del "mammalian target of rapamycin" (mTor), una chinasi serina/treonina coinvolta in molte vie di segnale rilevanti per angiogenesi, proliferazione e motilità cellulare (42). Inoltre, mTor agisce come effettore dell'asse PI3K/Akt, e la sua attivazione stimola la trascrizione e la stabilizzazione di HIF (43). In uno studio di fase I, il temsirolimus ha mostrato effetti collaterali reversibili quali acne, astenia e nausea (44). In uno studio di fase II, su pazienti con CR refrattario ad altre terapie, è stato osservata una risposta obiettiva nel 7% dei pazienti, e risposte minori nel 26% (45).

Un successivo studio di fase III effettuato comparan-

TABELLA I - TRIAL CLINICI CON FARMACI AD ATTIVITÀ ANTI-ANGIOGENETICA NEL CR AVANZATO

Molecola	Meccanismo	Disegno dello studio	Tasso di risposta	Via di somministrazione	Tossicità	Ref
Bevacizumab	Anticorpo monoclonale anti-VEGF	Fase II randomizzato vs placebo	10% vs 0%	e.v.	Iperensione, proteinuria, epistassi, ematuria	34
Volocixumab	Anticorpo monoclonale anti-integrina $\alpha 5\beta 1$	Fase I	-	e.v.	Fatigue, nausea, stipsi, anoressia	36
Sorafenib	Inibitore di Kinasi Recettoriali (VEGF, PDGF, c-kit)	Fase III randomizzato vs placebo	2% vs 0%	per os	Diarrea, fatigue, rash, sindrome mano-piede (HFS)	38
Sunitinib	Inibitore di Kinasi Recettoriali (VEGF, PDGF, c-kit)	Fase III randomizzato vs INF- α	31% vs 6%	per os	Fatigue, diarrea, mucosite, ipertensione, neutropenia, anemia, incremento lipasi	39
Temserolimus	Inibitore di mTor	Fase III randomizzato vs INF- α vs temserolimus plus INF- α	9% vs 7% vs 11%	e.v.	Acne, astenia, nausea	46

do terapia con INF- α o con temsirolimus in pazienti con CR metastatico e cattiva prognosi ha dimostrato nei pazienti trattati con temsirolimus un complessivo miglioramento della sopravvivenza rispetto a quelli trattati con INF- α (46).

CONCLUSIONI

Un notevole effetto terapeutico è stato attribuito nel CR ai farmaci inibitori dell'angiogenesi in termini di elevata percentuale di risposte (sunitinib) ed aumento significativo della sopravvivenza libera da malattia (sunitinib, sorafenib e bevacizumab). Questi farmaci mediano i loro effetti attraverso l'inibizione dell'asse HIF-VEGF-recettori del VEGF. Tuttavia, tutti questi farmaci descritti non sono in grado di indurre una risposta completa, ed attualmente tutti i pazienti presentano resistenza e, alla fine, progressione della malattia durante il trattamento. È quindi necessario identificare strategie che possano aumentare la risposta antitumorale. Dal momento che il meccanismo d'azione degli inibitori di mTor e dei farmaci diretti contro la via di segnale del VEGF non è sovrapponibile, la combinazione di queste due strategie terapeutiche potrebbe avere effetti benefici, riducendo la resistenza alle singole terapie. È inoltre importante identificare i possibi-

li *responders* sulla base di *biomarkers* che permettano una terapia più mirata. L'identificazione di bersagli molecolari espressi in modo selettivo dall'endotelio tumorale del RCC e coinvolti nelle loro caratteristiche pro-angiogenetiche ed embrionali, potrebbe rappresentare un valido approccio. In alternativa, approcci potrebbero essere identificati sulla base di alterazioni genetiche e sulla biologia del RCC, quali terapie volta a bloccare HIF o a ripristinare i livelli di VHL. Infine, l'identificazione dell'origine delle cellule endoteliali nel RCC può dare indicazioni su farmaci anti-angiogenetici rivolti a nuovi bersagli quali cellule staminali circolanti o residenti.

TEST DI VERIFICA

1) Quale di queste affermazioni sul VEGF è errata?

- Il VEGF è coinvolto nella genesi dei vasi sanguigni durante la vita embrionale
- Il VEGF è coinvolto nell'angiogenesi adulta
- La mancanza di un allele per VEGF è incompatibile con la vita
- La mancanza di un allele per VEGF determina ritardo nello sviluppo

e. La mancanza dei recettori per VEGF è incompatibile con la vita.

2) Quale di queste affermazioni è errata?

- a. I vasi tumorali presentano recettori assenti o presenti in bassi livelli nei vasi normali
- b. L'angiogenesi tumorale è un processo sregolato ed eccessivo
- c. L'angiogenesi tumorale è un processo comune a diversi tumori
- d. L'angiogenesi è necessaria per la crescita dei tumori al di sotto di 1-3 mm³
- e. L'angiogenesi è necessaria per la crescita dei tumori oltre 1-3 cm³.

3) Quale dei seguenti aspetti non è un vantaggio della terapia antiangiogenetica:

- a. Agisce su di un ampio spettro di tumori
- b. È specifica
- c. Riconosce antigeni assenti sui vasi normali
- d. Raggiunge facilmente il bersaglio
- e. È efficace su tutta la massa tumorale.

4) Le alterazioni del prodotto del gene von Hippel

Lindau:

- a. Determinano aumento dell'azione dell'HIF
- b. Determinano riduzione dell'HIF
- c. Determinano riduzione della degradazione dell'HIF
- d. Determinano aumento della degradazione del VEGF
- e. Determinano aumento dell'ubiquitina.

5) Cos'è il PAX2?

- a. Un fattore di trascrizione espresso nel rene embrionale e nelle cellule endoteliali tumorali
- b. Un fattore di trascrizione espresso nel rene adulto
- c. Un fattore di crescita dei macrofagi
- d. Un fattore di trascrizione espresso da cellule staminali ematopoietiche
- e. Un marcatore di fibroblasti.

6) Le cellule endoteliali estratte da tumore renale:

- a. Presentano attivazione della via PI3K/Akt/mTor
- b. Presentano inattivazione della via PI3K/Akt/mTor
- c. Hanno elevati livelli del fattore antiangiogenetico trombospondina
- d. Hanno elevati livelli del gene oncosoppressore PTEN
- e. Hanno un fenotipo maturo.

7) Le cellule staminali renali umane CD133+ presenti nei tumori:

- a. Contribuiscono alla formazione dei vasi tumorali

b. Contribuiscono in toto SCID alla crescita dei tumori

- c. Possono essere reclutate dal tessuto sano adiacente
- d. Tutte
- e. Nessuna.

8) Quali sono gli effetti collaterali maggiormente riscontrati utilizzando il bavacizumab:

- a. Nausea e vomito
- b. Ipotensione e proteinuria
- c. Edemi
- d. Iperensione e proteinuria
- e. Confusione ed astenia.

9) Il meccanismo d'azione del sorafenib è:

- a. Legame e sequestro del VEGF circolante
- b. Inibizione di serin e tirosin chinasi intracitoplasmatiche
- c. Blocco delle metallo-proteasi
- d. Blocco dell'integrina beta-5
- e. Inibizione del legame VEGF-recettore.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato supportato da finanziamenti del MIUR e dell'AIIRC e dal progetto della Regione Piemonte "Ricerca Scientifica applicata".

RIASSUNTO

Il carcinoma del rene è caratterizzato da un'importante angiogenesi associata all'inattivazione del gene oncosoppressore von Hippel-Lindau, con conseguente iper-espressione di fattori angiogenici. La caratterizzazione funzionale e molecolare dell'endotelio derivato da carcinoma renale ha mostrato un aumento dell'attività pro-angiogenica e di sopravvivenza, conseguente ad attivazione dell'asse PI3K/Akt/mTor, con inibizione della sintesi del fattore anti-angiogenetico TSP-1. Inoltre, l'endotelio del carcinoma renale presenta caratteristiche di immaturità simil-embriionali, con espressione del gene embrionale rene-specifico PAX-2. È verosimile che l'endotelio renale sia eterogeneo con possibile origine da vasi circostanti, da cellule staminali residenti o circolanti o dalle stesse cellule tumorali. Il ruolo importante dell'angiogenesi nel carcinoma renale è sottolineato dall'effetto terapeutico di far-

maci anti-angiogenetici. Farmaci diretti contro il VEGF, quali anticorpi monoclonali anti-VEGF (bevacizumab), e piccole molecole che inibiscono la trasduzione del segnale dei recettori del VEGF, come il sunitinib ed il sorafenib, hanno dimostrato un'attività clinica in pazienti con carcinoma renale metastatico. Tuttavia, l'approccio anti-angiogenetico, pur dimostrando un effetto benefico, non si è dimostrato risolutivo. Questi studi suggeriscono un ruolo

dell'angiogenesi nella crescita e metastatizzazione del carcinoma renale e stimolano la necessità di sviluppare nuove strategie terapeutiche.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

BIBLIOGRAFIA

- Rathmell WK, Martz CA, Rini BI. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2007; 19: 234-40.
- Mevorach RA, Segal AJ, Tersego ME, Frank IN. Renal cell carcinoma: incidental diagnosis and natural history: review of 235 cases. *Urology* 1992; 39: 519-22.
- Kim WY, Kaelin WG Jr. Molecular pathways in renal cell carcinoma: rationale for targeted treatment. *Semin Oncol* 2006; 33: 588-95.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 3: 389-95.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-76.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
- Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histopathologic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology* 2005; 46: 481-9.
- Ruoslahti E, Rajotte D. An address system in the vasculature of normal tissues and tumors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 813-27.
- St Croix B, Rago C, Velculescu V, et al. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 2000; 289: 1197-202.
- Jung YD, Ahmad SA, Akagi Y, et al. Role of the tumor microenvironment in mediating response to anti-angiogenic therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 147-57.
- Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau gene, kidney cancer, and oxygen sensing. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2703-11.
- Knudson AG Jr. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 820-3.
- Comings DE. A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973; 70: 3324-28.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The von Hippel-Lindau gene product is necessary for oxygen-dependent proteolysis of hypoxia-inducible factor- α subunits. *Nature* 1999; 399: 271-5.
- Wizigmann-Voos S, Breier G, Risau W, Plate KH. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res* 1995; 55: 1358-64.
- Brown L, Berse B, Jackman R, et al. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 143: 1255-62.
- Nicol D, Hii SI, Walsh M, et al. Vascular endothelial growth factor expression is increased in renal cell carcinoma. *J Urol* 1997; 157: 1482-6.
- Bussolati B, Deambrosio I, Russo S, Deregibus MC, Camussi G. Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells. *FASEB J* 2003; 17: 1159-61.
- Bussolati B, Assenzio B, Deregibus MC, Camussi G. The proangiogenic phenotype of human tumor-derived endothelial cells depends on thrombospondin-1 downregulation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Mol Med* 2006; 84: 852-63.
- Pantuck AJ, Seligson DB, Klatt T, et al. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer* 2007; 109: 2257-67.
- Fonsato V, Buttiglieri S, Deregibus MC, Puntorieri V, Bussolati B, Camussi G. Expression of Pax2 in human renal tumor-derived endothelial cells sustains apoptosis resistance and angiogenesis. *Am J Pathol* 2006; 168: 706-13.
- Bussolati B, Grange C, Bruno S, et al. Neural-cell adhesion molecule (NCAM) expression by immature and tumor-derived endothelial cells favors cell organization into capillary-like structures. *Exp Cell Res* 2006; 312: 913-24.
- Hida K, Hida Y, Amin DN, et al. Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res* 2004; 64: 8249-55.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739-52.
- Marx J. Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer. *Science* 2003; 301: 1308-10.
- Bagley RG, Walter-Yohrling J, Cao X, et al. Endothelial precursors cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells. *Cancer Res* 2003; 63: 5866-73.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of EPCs responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-8.
- Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, et al. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 2001; 97: 3658-61.
- Peters BA, Diaz LA, Polyak K, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 2005; 11: 261-2.
- Bussolati B, Bruno S, Grange C, et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* 2005; 166: 545-55.
- Bruno S, Bussolati B, Grange C, et al. CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2006; 169: 2223-35.
- Escudier B. Advanced renal cell carcinoma: current and emerging management strategies. *Drugs* 2007; 67: 1257-64.
- Rini BI. Vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma: current status and future directions. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1098-106.

34. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 427-34.
35. Yang JC. Bevacizumab for patients with metastatic renal cancer: an update. *Clin Cancer Res* 2004; 10: S6367-70.
36. Kuwada SK. Drug evaluation: Volociximab, an angiogenesis-inhibiting chimeric monoclonal antibody. *Curr Opin Mol Ther* 2007; 9: 92-8.
37. Ratain MJ, Eisen T, Stadler WM, et al. Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2505-12.
38. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 125-34.
39. Motzer RJ, Dror Michaelson M, Redman BG, et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 16-24.
40. Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM, et al. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA* 2006; 295: 2516-24.
41. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 15-24.
42. Chan S. Targeting the mammalian target of rapamycin (mTor): a new approach to treating cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 1420-4.
43. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 7004-14.
44. Raymond E, Alexandre J, Faivre S, et al. Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTor inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2336-47.
45. Atkins MB, Hidalgo M, Stadler WM, et al. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 909-18.
46. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 2271-81.