

# **Complete objective response of neuroblastoma to biological treatment**

## **Keywords:**

Neuroblastoma, remission induction, biological treatment, MDB, Melatonin, Somatostatin, Retinoid, Vitamin D<sub>3</sub>

## **Author**

Giuseppe Di Bella, M.D.

Biagio Colori, M.D., Bologna

## **Organisation or institution**

Fondazione Di Bella – Bologna – Italy

## **Address for correspondence**

e-mail: [posta@giuseppedibella.it](mailto:posta@giuseppedibella.it)

Phone 051 239662; 051 230369; - Fax 051 2961238

Postal address: Via Marconi N°51 - Post code 40122 - Bologna - Italy

## **Abbreviations**

All Trans Retinoic Acid [ATRA]

Brain Derived Neurotrophic Factor [BDNF]

Cholecystokinin [CCK]

Di Bella Method [MDB]

Epidermal Growth Factor [EGF]

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

Fibroblastic Growth Factor [FGF]

Gastrin [G]

Growth Hormone [GH]

Growth Hormone Receptor (GHR)

Hepatocyte Growth Factor [HGF]

Insulin-like Growth Factor 1-2 [IGF 1-2]

Insulin-like Growth Factor Receptor [IGFR]

International Neuroblastoma Staging System [INSS]

Magnetic Resonance Imaging [MRI]

Melatonin [MLT]

Neuroblastoma [NBL]  
Nerve Growth Factor [NGF]  
Neurotrophin [ NT3-4-5]  
Non-Hodgkin's Lymphoma [NHL]  
Platelet-Derived Growth Factor [PDGF]  
Positron Emission Tomography (PET)  
Somatostatin [SST]  
Somatostatin Receptor [SSTR]  
Tirosin-chinasi [TRK]  
Transforming Growth Factor [TGF]  
Vascular Endothelial Growth Factor [VEGF]  
Vasoactive Intestinal Peptide [VIP]

## ABSTRACT

L'impiego sinergico (MDB) di Somatostatina, Melatonina, Retinoidi, Vitamine E, C, D<sub>3</sub>, con Calcio, Condroitinsolfato, microdosi di Ciclofosfamide, in un bimbo di sette mesi affetto da un voluminoso neuroblastoma retroperitoneale di cm 4x8 ha prodotto, in sei mesi una risposta obiettiva del 50%, pressochè totale ad un anno, completa a circa 14 mesi, con guarigione e assenza di malattia da oltre dieci anni. Vengono discussi il razionale e i meccanismi d'azione molecolari della terapia, che esercita un effetto differenziante, apoptotico, antiproliferativo, preservando ed esaltando, sia il trofismo e la funzionalità di organi e tessuti, che l'omeostasi immunitaria e antiblastica. Questo risultato è conforme ai positivi risultati già pubblicati sull'uso del MDB nelle malattie linfoproliferative, nei carcinomi polmonari al 3° e 4° stadio, nel carcinoma della mammella, e nei carcinomi degli epiteli aerodigestivi superiori. Il MDB, senza necessità di ricovero, in assenza di tossicità, ha rapidamente ridotto, e poi eliminato, la voluminosa massa tumorale consentendo una normale qualità di vita. Il bimbo ha avuto uno sviluppo psicofisico perfettamente regolare. Riteniamo utile segnalare il caso per invitare ad un maggiore interesse sulle possibilità aperte in oncologia dalla terapia biologica e recettoriale MDB.

## INTRODUZIONE

Si presenta un caso di remissione completa (RC) con terapia biologica (MDB) di un voluminoso neuroblastoma retroperitoneale (NBL), inoperabile, in un bimbo di sette mesi. Il caso è stato monitorato dal 1998 ad oggi. Sono riportati i componenti della terapia biologica (MDB) effettuata, gli esami ematochimici e strumentali, prima e dopo il trattamento.

Si descrivono, in estrema sintesi, il razionale del MDB, le basi scientifiche, i meccanismi d'azione molecolari e la risposta clinica, con guarigione da oltre 10 anni.

### Cenni sintetici sul neuroblastoma

Il NBL origina dalle cellule della cresta neurale, colpisce le cellule nervose dei gangli simpatici ed è considerato di origine ereditaria.

E' il tumore solido extracranico più comune dell'età pediatrica rappresentando il 6-10% di tutti i tumori dei bambini con incidenza di 7-13 nuovi casi annui/1.000.000 (bambini < 15 anni).

Ha una presentazione clinica ed un comportamento biologico estremamente variabili. Il sistema di valutazione del rischio formulato dal *Children's Oncology Group*, oltre a dati istologici e istochimici, considera l'età dei pazienti, il volume della massa neoplastica e lo stadio secondo i criteri INSS (*International Neuroblastoma Staging System*):

Stadio 1	T unilaterale o della linea mediana confinato alla sede di origine, asportato in modo completo con linfonodi negativi o metastatici, ma asportati in blocco con la stessa.
Stadio 2A	T unilaterale o della linea mediana asportato in gran parte ma non radicalmente e con linfonodi negativi
Stadio 2B	T unilaterale o della linea mediana asportato radicalmente, ma con linfonodi positivi
Stadio 3	T che supera la linea mediana infiltrando i tessuti circostanti ± LN regionali T che non supera la linea mediana ma con LN contro laterali positivi T ad origine dalla linea mediana ma non asportabile in modo ampio per l'infiltrazione dei tessuti circostanti
Stadio 4	T con disseminazione di LN a distanza, scheletro, midollo, fegato, cute e/o altro
Stadio 4S	T localizzato come per Stadio 1 e 2, con disseminazione limitata a cute, fegato e/o midollo emopoietico (con infiltrazione minima <10%) valido solo 1 anno

Il NBL è un tumore altamente aggressivo [con qualche eccezione relativa ai casi che rientrano nello stadio 4S (classificazione INSS) in cui si può verificare una progressiva differenziazione fino alla remissione spontanea] che tende ad infiltrare le strutture e gli organi attigui con rapida diffusione e sviluppo delle metastasi, soprattutto nelle vicine stazioni linfonodali. Come nel caso in questione, alla diagnosi si trova spesso un unico agglomerato irregolare e dai confini non definiti, formato dalla massa primitiva e dai linfonodi metastatici.

Il NBL produce spesso catecolamine (per questo è detto secernente), determinandone alti livelli nelle urine e nel sangue, utili per la diagnosi e il monitoraggio.

In diversi casi si verificano ipertensione e tachicardia, anche se non sempre in coincidenza con l'incremento delle catecolamine e degli altri cataboliti del sistema simpatico.

Il NBL può colpire la ghiandola surrenale (presentandosi come una tumefazione addominale) o i gangli simpatici paraspinali, potendo comparire in qualsiasi tratto della colonna vertebrale (addominale e toracica). Segni frequenti di malattia sono: febbre, anemia, disappetenza, ecchimosi intorno alle orbite. Le metastasi, frequenti e precoci, colpiscono le ossa, la regione dell'orbita, i linfonodi, il fegato e il midollo osseo. La diagnosi precoce è fondamentale poiché se si interviene chirurgicamente nei primi stadi di malattia la sopravvivenza è più elevata; a tal fine devono essere ricercati i metaboliti urinari delle catecolamine (acido vanilmandelico, acido omovanillico) e marcatori neuroendocrini (come NSE). Anche Ferritina e LDH sono parametri da valutare per il monitoraggio del NBL.

L'estensione della malattia va valutata con indagini strumentali, TAC, MRI, PET, urografia. Nella maggior parte dei casi, al momento della diagnosi, il NBL può presentarsi già metastatizzato.

### **CASO CLINICO : stadio 3 INSS**

(classificazione: T<sub>4</sub>N<sub>2</sub>M<sub>x</sub>)

Profilo anagrafico del paziente: Anno di nascita : 1998 - Sesso : M

**ANAMNESI** — Il bambino, nato da parto eutocico nel maggio 1998, nel mese di novembre dello stesso anno cominciò ad accusare continui disturbi all'apparato digerente, per il progressivo aggravamento dei quali, fu ricoverato all'ospedale di Avola, in Sicilia, dove mediante ecografia e TAC, effettuate in data 17/12/98, fu evidenziata una voluminosa neoformazione solida occupante spazio in sede retroperitoneale medio-laterale SN (cm 4x8) classificata come NBL. Secondo i criteri di classificazione dei NBL (International Neuroblastoma Staging System) il caso in questione rientra chiaramente in uno Stadio 3 (tumori inoperabili infiltranti la linea mediana con o senza interessamento dei linfonodi regionali).

#### **TC Addome - 17/12/98**

**Referto** – “ *L'esame TC dell'addome superiore ed inferiore, eseguito in condizioni basali, evidenzia presenza di grossa formazione solida occupante spazio in sede retroperitoneale medio-laterale sinistra con massima ampiezza trasversale di circa 4 cm. e massima ampiezza longitudinale di circa 8 cm.*

*Detta formazione ha struttura disomogenea, presenta numerose calcificazioni nel suo contesto; sposta anteriormente le anse intestinali e lateralmente a destra l'aorta e prende intimi rapporti con il margine anteriore della colonna vertebrale...L'aspetto TC di detta formazione è compatibile per Neuroblastoma...”*

Trasferito, dopo la TAC all'Ospedale Pediatrico “Gaslini” di Genova (Istituto di Ricerca e Cura a Carattere Scientifico) il 24/12/98 veniva sottoposto a MRI dell'addome superiore e inferiore, e ad urografia in anestesia generale.

**MRI (24/12/1998) - Referto :** “ *Non si evidenziano lesioni secondarie epatiche. Non linfoadenomegalie periaorto-cavali prox. Nella norma i reni e la milza. Si conferma la presenza di grossolano processo espansivo, che si estrinseca da subito caudalmente il peduncolo vascolare renale fino ad oltre il carrefour aorto bisiliaco.*

*La massa è mediana con prevalente estrinsecazione verso sinistra (superamento della linea mediana), con dislocazione dello psoas omolaterale. La struttura è solida senza evidenza di fenomeni necrotico-colliquativi. Il segnale è francamente iperintenso in T2 con aspetto puntiforme diffuso ipointenso per presenza di calcificazioni. L'aorta e la cava distali, la biforcazione e le arterie e vene iliache (più a sinistra) sono inglobate marginalmente e dislocate verso destra. Non liquido in peritoneo.”*

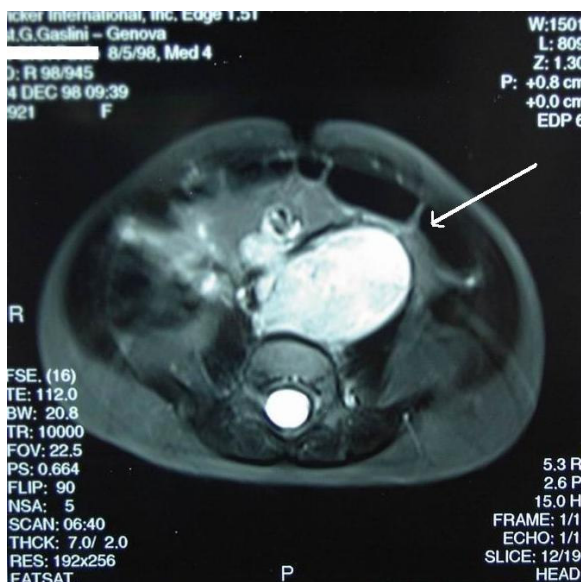
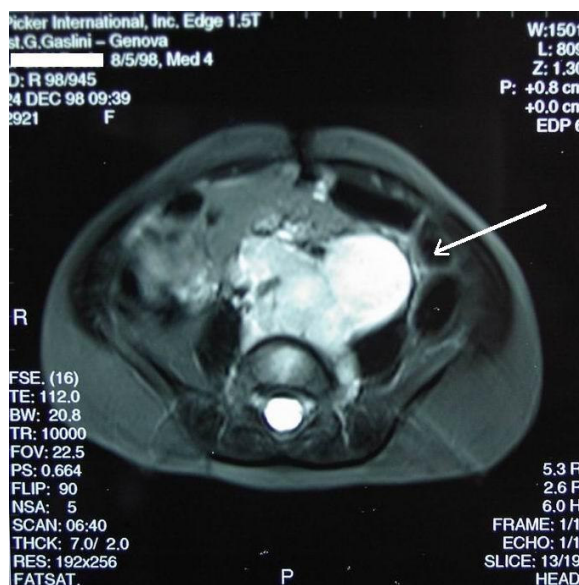
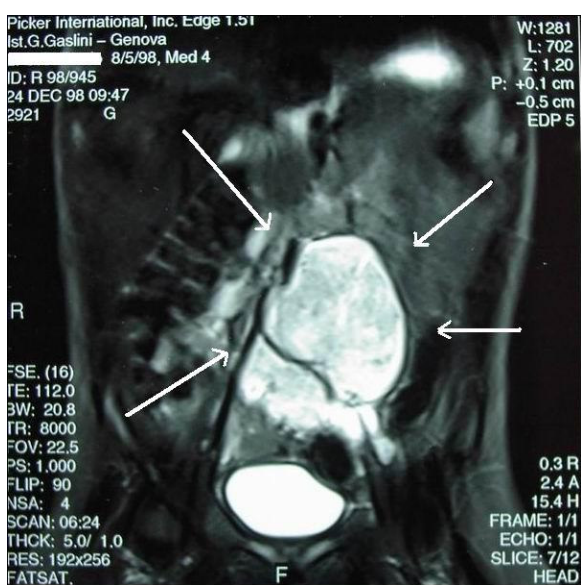


Foto 1-2-3-4 : - MRI 24/12/98

**Urografia (28 /12/1998) - Referto:** “ *Pronta eliminazione e regolare concentrazione del mezzo di contrasto iodato da parte di entrambi gli emuntori renali. A Dx*

*regolare morfologia calico pielica e ureterale. A Sn nella norma la morfologia calico pielica, l'uretere presenta un normale calibro, ma un alterato decorso, nella proiezione AP ( antero-posteriore), il tratto prossimale appare spostato verso l'esterno, mentre in LL ( Latero-laterale) appare anteriorizzato il suo tratto intermedio, verosimilmente dislocato dalla massa retro peritoneale.*"



Foto 5 : urografia 28/12/98

All'Istituto "Gaslini" fu confermata la diagnosi di Neuroblastoma formulata all'Ospedale di Avola.

Fu prospettato ai genitori il rischio particolarmente elevato di un intervento chirurgico, oltre che per l'età, anche per il volume e la forte vascolarizzazione della massa neoplastica, e soprattutto per la difficoltà di individuare piani di clivaggio con l'aorta e la vena cava distali, la biforcazione e le arterie e vene iliache, vasi tutti inglobati dalla massa neoplastica e dislocati a SN.

Il volume particolarmente rilevante della massa neoplastica addomino-pelvica (8 cm x 4 in un bimbo di 7mesi ) con dislocazione dell'uretere e la compressione sulle anse intestinali, stava causando disturbi gastroenterici, coliche, vomito alimentare. Fu proposto un trattamento chemioterapico. Una soluzione si rendeva comunque urgente per il persistere della sintomatologia gastroenterica, l'aggravamento delle

condizioni del bimbo, e la rapida progressione della neoplasia. I genitori rifiutarono l'intervento e la chemioterapia e pertanto, nel gennaio 1999, il bimbo veniva dimesso dall'Istituto "Gaslini" con una relazione per la Clinica Pediatrica di Catania, in cui si specificava che: " *il sospetto di Neuroblastoma è stato consolidato dalle indagini relative alla escrezione urinaria di amine-simpatiche :*

- *Acido Vanilmandelico: 35,6 gamma /mg – creatina*
- *Acido Omovanillico : 79,7 gamma/mg -creatina*
- *NSE: 30 – LDH: 603*
- *Emocromo : Hb 12,9 - Glob.Bianchi : 15900 (con normale formula leucocitaria)*
- *Piastrine : 474000*
- *MRI addominale: grossolano processo espansivo al di sotto del peduncolo vascolare renale, prevalente a sinistra*
- *Urografia endovenosa: alterato decorso dell'uretere sinistro*

I genitori decisero di applicare il MDB.

Di seguito viene riportata la terapia prescritta dal Prof. Luigi Di Bella e iniziata immediatamente dopo la dimissione:

1) *Soluzione di:*

- *Acido Tutto-Trans Retinoico*            *gr 0,5*
- *Axeroftolo palmitato*                *gr 0,5*
- *Betacarotene*                            *gr 2*
- *Alfatocoferile acetato*                *gr 1000*

un cucchiaino con 2 ml di Soluzione ogni 3 ore

insieme a:

2) *Diidrotachisterolo* (una goccia nel cucchiaino per ogni somministrazione)

3) *Bromocriptina* compresse da 2,5 mg ( 1/4 di compressa 2 volte al dì, mattino e sera)

4) *Melatonina 12%, Adenosina 51%, Glicina 37%* (una fiala liofilizzata da 5 mg diluita in acqua)



- 5) *Condroitinsolfato* (una fiala orale da 500 mg a cena )
- 6) *Ciclofosfamide* compresse 50 mg ( 1/4 di compressa, al pasto principale)
- 7) *Somatostatina* 14 aminoacidi ( fiala 0,25 mg lentamente sottocute la sera).

La terapia fu tollerata e fu programmato, ogni 2 settimane, un controllo degli esami ematochimici.

Si registrò un miglioramento delle condizioni generali del bambino con una progressiva riduzione delle coliche, della diarrea, vomito, dell'anoressia e con recupero del peso. Già alla fine del 1999 la crescita ponderale e staturale, così come lo sviluppo psicofisico del bimbo, erano rientrate nei limiti fisiologici. Alla graduale remissione dei sintomi si associò la progressiva normalizzazione dei dati ematochimici, con riduzione della leucocitosi, della VES, di LDH, Ferritina, delle Catecolamine, NSE, Ac Vanil mandelico, Ac Omovanillico. Per i primi mesi l'emocromo è stato effettuato ogni 2 settimane. Il monitoraggio emato-chimico completo è stato effettuato ogni 2-3 mesi in quanto, oltre a rivestire un valore diagnostico elevato, è utile nella sorveglianza dello stato di remissione, per cogliere precocemente recidive, prima di ogni eventuale evidenza clinica. Al miglioramento del quadro emato-chimico fece riscontro la sensibile e continua riduzione volumetrica della massa neoplastica rilevata dalle indagini strumentali. Dopo 40 giorni dall'inizio del MDB, un'**ecografia addominale** del 12/02/99 evidenziava una riduzione della neoplasia di oltre il 10%, refertando: "*...In corrispondenza del reperto obiettivo, in sede ileo-pelvica sn strettamente a ridosso del piano vertebrale, si evidenzia una neoformazione ovoidale, lievemente bernoccoluta, discretamente delimitabile. Misura mm 70 mm (longitudinale) [ il 17/12/08 80 mm] x 40 mm ...Ha ecostruttura solida e disomogenea per la presenza di innumerevoli ecoriflessioni di tipo microcalcifico isolate in ammassi. Al color-doppler, ostacolato dalla irrequietezza del piccolo paziente, si evidenziano alcuni vasi intralesionali con basso indice di resistenza. Nulla da segnalare a carico dei reni e degli organi parenchimatosi dell'alto addome..*".

La terapia venne aggiornata dal Prof. Di Bella il giorno 12/03/1999 portando la dose giornaliera di Somatostatina, dai 0,25 mg. giornalieri iniziali, a 0,5 mg. a giorni alterni per 3 volte la settimana, continuando con 0,25 mg gli altri 4 giorni della settimana, e lasciando invariato il resto.

A sei mesi dall'inizio della terapia, una MRI effettuata il 18/06/1999 evidenziava una regressione di circa il 50%.

**MRI (18/6/1999) - Referto:** “...L'indagine è stata condotta con tecnica turbo-spin-echo, secondo i piani assiale, coronale, con sequenze inversion-recovery e T2 pesate e dopo introduzione e.v. di gadolinio. A confronto con la precedente analoga indagine del 24/12/98, si apprezza una notevole riduzione di volume della neoformazione retroperitoneale della regione paraortica e paravertebrale di sinistra, che in atto misura 5 cm. (longitudinale) e 2 cm. (laterale). Indenni il fegato, milza, pancreas, reni, surreni.”

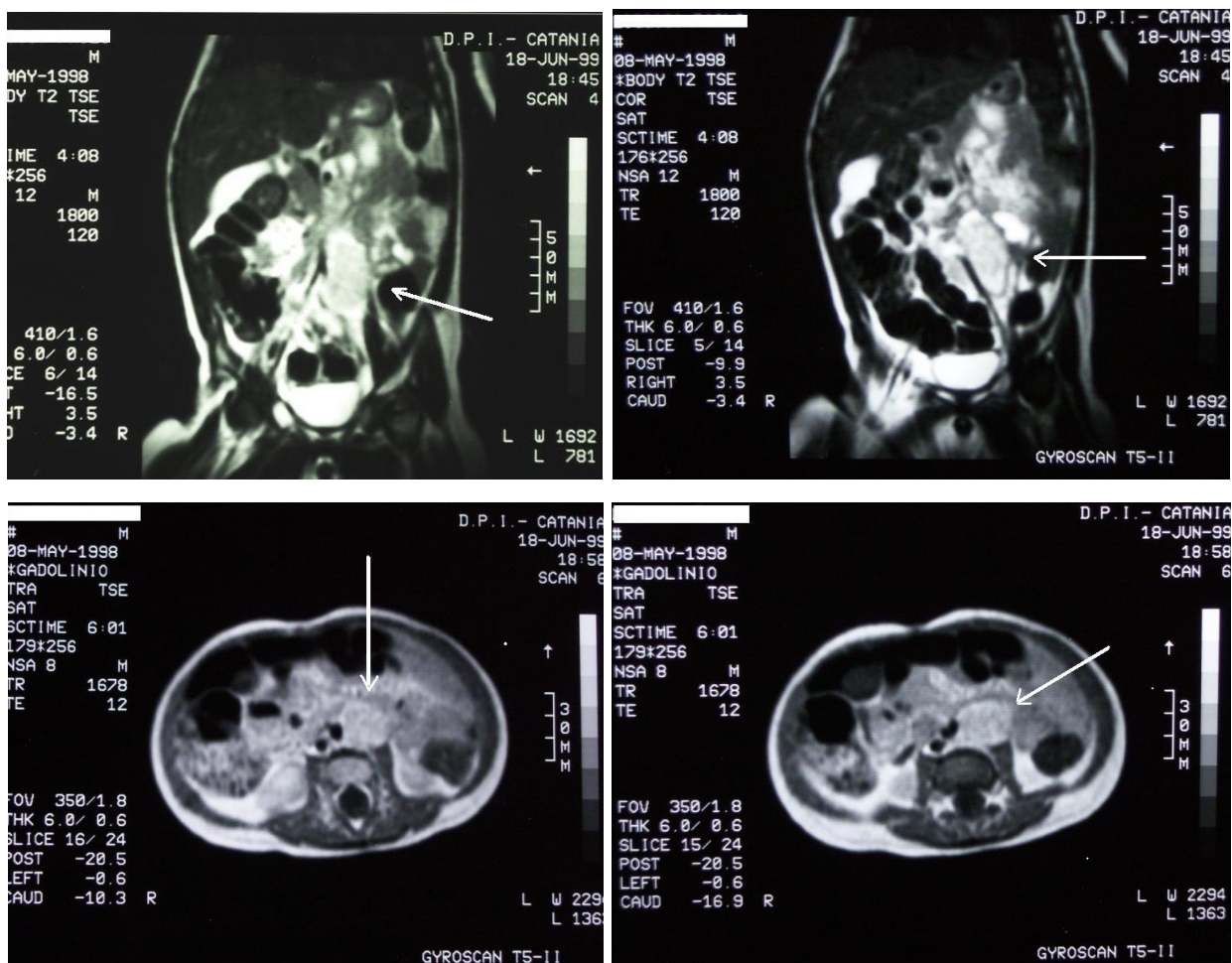


Foto 6-7-8-9-: MRI 18/6/1999

Contemporaneamente VES, LDH, Ferritina, NSE, l'escrezione urinaria di ac Vanilmandelico, di Ac Omovanillico e Catecolamine erano completamente rientrate nei limiti fisiologici.

Dopo un anno di cura, il 21/01/2000, una Risonanza Magnetica effettuata a Catania, evidenziava una pressoché totale scomparsa del Neuroblastoma.

**MRI (21/1/2000) - Referto:** "...L'indagine MRI è stata eseguita con tecnica spin-echo, secondo il piano assiale e coronale, con sequenze inversion recovery e T2 pesate e dopo introduzione e.v. di gadolinio. A confronto con la precedente analoga indagine del 18/06/99, si apprezza una pressoché totale scomparsa della neoformazione retroperitoneale già apprezzata in paraortica e paravertebrale di sinistra, in atto rappresentata da un piccolo residuo in paraortica. Invariato il restante reperto."



Foto 10-11 : MRI 21/1/2000

Nel settembre 2000 (età del bimbo: 28 mesi) dal Prof. Di Bella veniva così aggiornata la terapia:

1) *Soluzione di:*

<b>Acido Tutto-Trans Retinoico</b>	<b>gr</b>	<b>0,5</b>
<b>Axeroftolo palmitato</b>	<b>gr</b>	<b>0,5</b>
<b>Betacarotene</b>	<b>gr</b>	<b>2</b>

***Alfatocoferile acetato*** **gr 1000**

Un cucchiaino da caffè con 2,5 ml di Soluzione tre volte al dì, mattino- mezzodì-sera (almeno 15 minuti prima del pasto)

insieme a:

2) ***Diidrotachisterolo*** (4 gocce nel cucchiaino per ogni somministrazione).

e i seguenti prodotti per bocca durante il pasto :

3) ***Bromocriptina*** compresse da 2,5 mg ( 1/2 compressa, 2 volte al dì)

4) ***Melatonina 12%, Adenosina 51%, Glicina 37%*** compresse da 2 mg.

(2 compresse mattino e mezzodì, 4 prima di coricarsi)

5) ***Somatostatina 14 aminoacidi*** (mg 0,75 lentamente sottocute tutte le sere).

Dal 2001 fu aumentato il dosaggio della Somatostatina portandolo a 1 mg tutte le sere, lasciando il resto invariato.

Nel marzo 2001 una MRI con MDC evidenziava “ *la totale assenza di tracce tumorali.*”

La terapia fu ulteriormente ridotta eliminando definitivamente Ciclofosfamide, Bromocriptina, Condroitinsolfato, Calcio. Fu ridotto il dosaggio della Somatostatina portandolo ad 1 mg sottocute a giorni alterni 3 volte la settimana. Dal 2002 si limitò la somministrazione di Somatostatina a 1 mg la settimana, dal 2003 1 mg ogni 15 giorni, fu sospesa del tutto nel 2007, mentre fino ad oggi continua la somministrazione al mattino a digiuno del composto di retinoidi con 8 gocce di Vit.D<sub>3</sub> (Diidrotachisterolo), e quattro compresse di MLT da 2 mg dopo cena.

Dal marzo 2001 tutti i successivi esami, sia emato-chimici che strumentali (PET, MRI), hanno confermato assenza di malattia con remissione completa del NBL.

**PET (07/10/2003) - Referto:** “ *Assenza di aree di patologico accumulo del tracciante metabolico...Lo studio PET non mette in evidenza alterazioni riferibili a presenza di malattia sostitutiva dotata di elevata attività metabolica.*”



**PET (20/09/2004) - Referto:** “ *Non evidenza di aree di patologico accumulo di tracciante metabolico. Lo studio PET non mette in evidenza alterazioni riferibili a presenza di malattia sostitutiva dotata di elevata attività metabolica.*”

**MRI (06/10/2005) – Referto:** “ *... Si dimostra in atto una completa regressione macroscopica della nota lesione espansiva neoplastica localizzata nel retro peritoneo para-vasale addomino-pelvico ed inglobante i vasi iliacy di sinistra...*”

**PET (17/3/2008) – Referto:** “ *Il controllo PET odierno, eseguito in follow-up, confrontato con i precedenti del 2003 e 2004, non evidenzia aree di patologico accumulo del tracciante metabolico nell'intera area esplorata. In particolare nulla da rilevare a carico dell'addome...*”

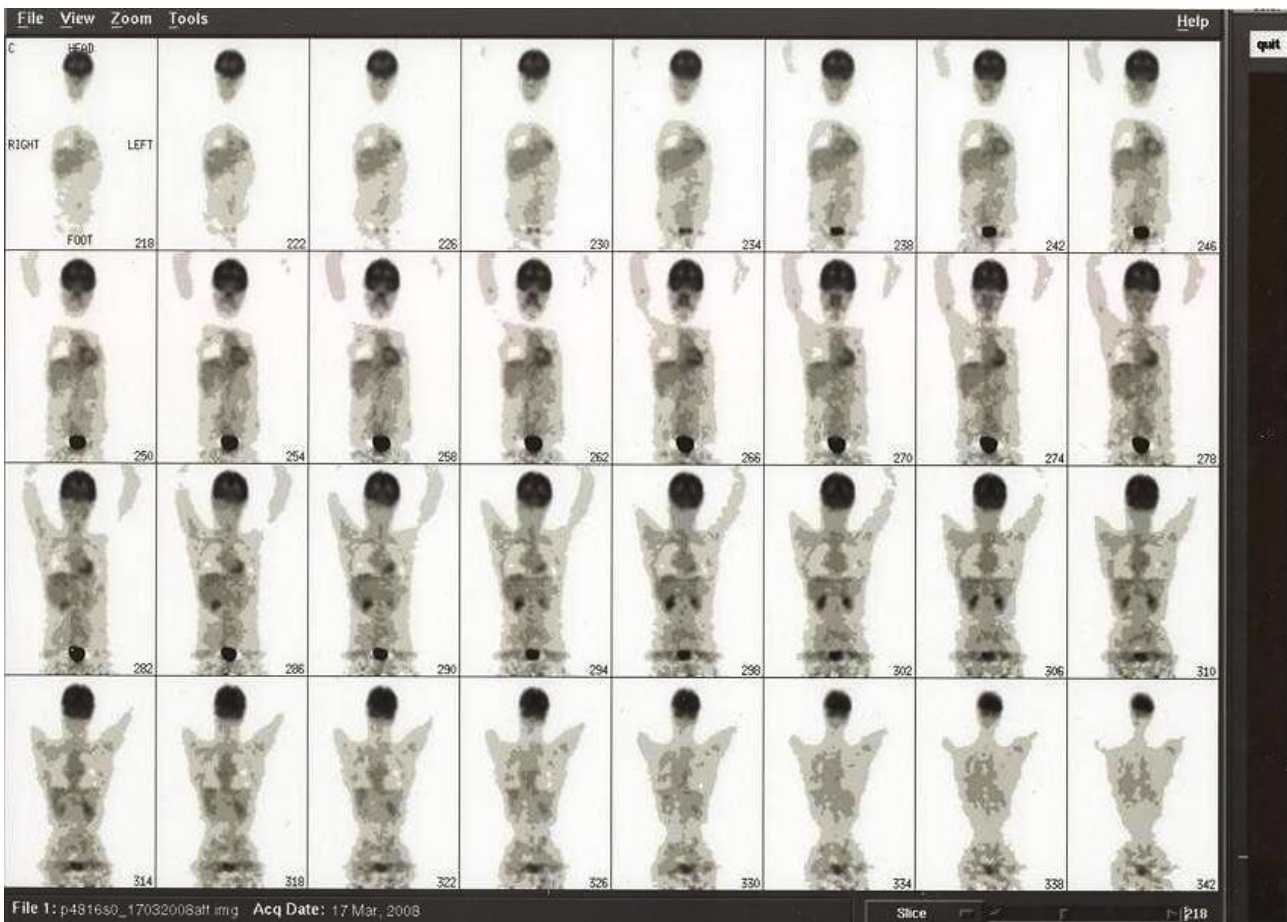


Foto 12 : PET 17/3/2008

## **Risultati**

La terapia biologica neuro-immuno-endocrina del Prof. Luigi Di Bella (MDB) in quattordici mesi ha ottenuto una risposta obiettiva completa, in assenza di tossicità, attraverso un meccanismo d'azione recettoriale, differenziante, apoptotico e antiproliferativo, con criteri, modalità e meccanismi d'azione totalmente difforni dalle consuete terapie citotossiche e citolitiche, dimostrando di potersi sostituire all'intervento chirurgico, e alla radioterapia e/o chemioterapia che comunque non sono in grado di dare risultati paragonabili alla chirurgia, ma eventualmente la precedono e/o la seguono.