

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Fisiopatologia Respiratoria Sperimentale

Ciclo XXIV

FILM POLIMERICI CONTENENTI FARMACI
CHEMIOTERAPICI NEL TRATTAMENTO DEL
MESOTELIOMA PLEURICO MALIGNO:
STUDIO SPERIMENTALE IN MODELLI ANIMALI

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. EMILIO MARANGIO

Tutor:
Chiar.mo Prof. PAOLO CARBOGNANI

Dottorando: LUCA AMPOLLINI

INDICE

| | |
|--------------------------------------|--------|
| 1. SEZIONE INTRODUTTIVA | pag 3 |
| 1.1 Riassunto | pag 4 |
| 1.2 Cenni di anatomia | pag 8 |
| 1.3 Definizione | pag 11 |
| 1.4 Epidemiologia | pag 11 |
| 1.5 Amianto | pag 12 |
| 1.6 Eziopatogenesi | pag 16 |
| 1.7 Anatomia Patologica | pag 18 |
| 1.8 Clinica | pag 25 |
| 1.9 Diagnosi strumentale | pag 29 |
| 1.10 Stadiazione | pag 36 |
| 1.11 Prognosi | pag 44 |
| 1.12 Trattamento | pag 46 |
| 2. SEZIONE SPERIMENTALE | pag 67 |
| 2.1 Premessa | pag 68 |
| 2.2 Obiettivi del progetto di studio | pag 69 |

| | |
|---|---------|
| 2.3 Materiali e Metodi | pag 70 |
| 2.31 Animali e linee cellulari | pag 70 |
| 2.32 Farmaci e film polimerici | pag 71 |
| 2.33 Studi in vitro | pag 79 |
| 2.34 Studi di farmacocinetica | pag 81 |
| 2.35 Gruppi di lavoro | pag 86 |
| 2.36 Trattamento chirurgico e applicazione film polimerico | pag 98 |
| 2.37 Determinazione della concentrazione del farmaco | pag 100 |
| 2.38 Preparazione dei campioni per l'analisi istologica | pag 101 |
| 2.4 Risultati: | pag 102 |
| 2.41 Recidiva locale della malattia | pag 112 |
| 2.42 Curve di decadimento del farmaco | pag 118 |
| 2.43 Tossicità | pag 120 |
| 2.5 Conclusioni | pag 126 |
| 3. APPENDICE | pag 128 |
| 4. BIBLIOGRAFIA | pag 129 |

1. SEZIONE INTRODUTTIVA

1.1 Riassunto

Introduzione: il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è un tumore molto aggressivo con un'incidenza in aumento ed un picco previsto in Europa tra il 2010 e 2020.

Il trattamento è ancora controverso; attualmente la sopravvivenza migliore è riportata dopo terapia multimodale comprendente chemioterapia d'induzione con cisplatino e pemetrexed, intervento chirurgico (pleurectomia e decorticazione pleurica o pleuro-pneumectomia extrapleurica) e radioterapia adiuvante.

Ciononostante la recidiva loco-regionale rimane il più importante fattore prognostico negativo e rappresenta la vera sfida da affrontare. La terapia intrapleurica è un'opzione attraente per il controllo locale della malattia con risultati promettenti in studi clinici e sperimentali. Ulteriori miglioramenti sono però assolutamente necessari.

L'obiettivo del progetto è quello di valutare la possibilità di utilizzo, l'efficacia e l'eventuale tossicità di film polimerici contenenti farmaci chemioterapici sulla recidiva tumorale in un modello murino di MPM e successivamente in un modello ovino.

Materiali e Metodi: la prima parte del progetto di studio è stata dedicata allo sviluppo e elaborazione dei film polimerici per il rilascio di farmaci antitumorali; la seconda parte ha riguardato lo studio *in vivo* in un modello murino di MPM utilizzando dapprima il cisplatino e in un secondo momento l'associazione cisplatino-pemetrexed; la terza parte del progetto sperimentale, ancora in corso, riguarda lo studio

farmacocinetico dei film polimerici caricati con cisplatino in un modello ovino. Per la preparazione dei film, sono stati utilizzati ialuronato e chitosano e sono stati caricati con cisplatino (100 mg/m^2) e pemetrexed ($10\text{-}100\text{mg/kg}$). Dopo aver eseguito studi *in vitro* e studi di farmacodinamica, questi dispositivi sono stati testati in un modello murino di MPM. Le cellule di mesotelioma sono state iniettate in sede subpleurica nei ratti anestetizzati. Sei giorni dopo un nodulo tumorale delle dimensioni di 5mm è stato asportato ed eseguita una pleuro-pneumonectomia sinistra. Dopo l'intervento, i film caricati con farmaco o soluzioni di cisplatino e di pemetrexed, sono stati applicati a livello intrapleurico secondo randomizzazione. Dopo 6 giorni gli animali sono stati sacrificati e gli organi prelevati per l'esame anatomo-patologico. L'obiettivo primario è stato valutare il volume di recidiva tumorale post trattamento. L'obiettivo secondario era valutare la tossicità e le curve di rilascio del farmaco dai film polimerici. Per lo studio nel modello ovino, è stata eseguita una pneumonectomia sinistra e, sulla base della randomizzazione, il cisplatino è stato somministrato per via endovenosa, mediante soluzione intrapleurica oppure con l'applicazione intrapleurica dei film polimerici. Sono stati valutate le concentrazioni di farmaco nel siero e nelle urine, la presenza di tossicità ematica e d'organo. ANOVA è stato utilizzato per l'analisi statistica.

Risultati: sono stati realizzati due film polimerici con diverse caratteristiche: quello di ialuronato permette un rilascio rapido e

completo del farmaco entro 72 ore; quello di chitosano, al contrario, consente un rilascio molto lento del farmaco (circa il 20% dopo 8 giorni). Il volume della recidiva tumorale è apparso significativamente ridotto nei gruppi ialuronato cisplatino e ialuronato-chitosano cisplatino rispetto al gruppo di controllo ($p=0.001$ e $p<0.0001$, rispettivamente). Gli animali trattati con ialuronato-chitosano cisplatino hanno avuto una recidiva tumorale significativamente più piccola rispetto agli animali che hanno ricevuto la soluzione di cisplatino ($p=0.003$) e ialuronato cisplatino ($p=0.032$). L'associazione di pemetrexed (10-100mg/kg) ai film polimerici caricati con cisplatino non ha mostrato un'ulteriore riduzione significativa della recidiva tumorale rispetto ai gruppi ialuronato cisplatino e ialuronato-chitosano cisplatino. Non sono state osservate differenze significative di tossicità correlate al trattamento nei diversi gruppi, eccetto il livello di transaminasi (GOT) negli animali trattati con pemetrexed endovena rispetto al gruppo ialuronato pemetrexed a distanza di 24 ore dal trattamento ($p=0.015$). A distanza di 24 e 48 ore dal trattamento, le concentrazioni plasmatiche di cisplatino sono risultate significativamente maggiori e mantenute più a lungo in circolo nei gruppi ialuronato cisplatino e ialuronato-chitosano cisplatino rispetto al gruppo con la soluzione intrapleurica. Il pemetrexed è stato completamente eliminato dopo 72 ore. I dati di farmacocinetica riguardanti lo studio in corso nel modello ovino saranno disponibili in seguito.

Conclusioni: i film polimerici caricati con cisplatino e pemetrexed sono risultati significativamente efficaci nel ridurre il volume della recidiva tumorale rispetto alla soluzione dopo somministrazione endovenosa e intrapleurica. I film di ialuronato e di ialuronato-chitosano caricati con cisplatino permettono di ottenere maggiori concentrazioni plasmatiche del farmaco e più prolungate nel tempo rispetto al farmaco in soluzione senza un incremento di tossicità. I dati derivanti dallo studio farmacocinetico nel modello ovino consentiranno una migliore caratterizzazione dei film polimerici in previsione di uno studio clinico.

1.2 Cenni di Anatomia

La pleura è una membrana sottile formata da cellule appiattite che poggiano su uno strato di tessuto connettivo lasso. Come le altre sierose sono costituite da un foglietto viscerale e da uno parietale, che si continuano l'uno nell'altro riflettendosi sugli elementi dell'ilo polmonare e formando il legamento triangolare del polmone.

La pleura viscerale, sottile e trasparente, ricopre completamente il polmone tranne l'ilo polmonare e si affonda nelle scissure di cui tappezza le due facce sino verso il fondo, senza arrivare a contatto con le strutture ilari. È strettamente aderente al polmone per mezzo di un sottile strato di tessuto connettivo o tessuto sottopleurico, che si continua con il connettivo interlobulare.

La pleura parietale tappezza la cavità toracica che contiene il polmone e viene divisa a seconda delle regioni in pleura costale, diaframmatica, mediastinica e cupola pleurica.

La pleura costale riveste la faccia interna della parete toracica e si continua:

- a) in basso con la pleura diaframmatica dando origine al seno costo diaframmatico;

b) posteriormente ed anteriormente con la pleura mediastinica, formando rispettivamente il seno costo-mediastinico posteriore (vertebro-mediastinico) ed il seno costo-mediastinico anteriore.

La pleura mediastinica nella metà superiore del torace, si estende senza interruzione dal seno vertebro-mediastinico al seno costo mediastinico anteriore, mentre in corrispondenza dell'ilo e al di sotto di esso è interrotta dai vasi e dai bronchi principali e dal legamento polmonare che rappresenta la riflessione della pleura viscerale sulla parietale.

La cupola pleurica corrisponde a tutta la parte superiore della pleura parietale, che come un cappuccio ricopre l'apice polmonare dell'emittoce.

La pleura parietale propriamente detta è costituita da tre strati:

- 1) un monostrato di cellule appiattite (cellule mesoteliali);
- 2) tenue strato di tessuto connettivo povero di cellule e privo in condizioni normali di capillari sanguinei (tonaca propria);
- 3) una membrana elastica (di Bizzozzero e Salvioli), formazione molto sottile e facilmente lacerabile, costituita da un intreccio a maglie per lo più larghe di fibre collagene ed elastiche.

Gli strati sottostanti alla pleura parietale costale sono anch'essi tre:

- 1) uno strato di tessuto connettivo lasso, con carattere lamellare, più spesso e più ricco di cellule connettivali e dotato di vasi (strato sotto-fasciale);

2) la fascia endotoracica degli antichi anatomici (ipopleura di Favaro) rappresentata da uno spesso strato di tessuto fibroelastico;

3) uno strato di tessuto connettivo lasso più sottile, ricco di adipe e di vasi in corrispondenza degli spazi intercostali che posteriormente si perde sul periostio dei corpi vertebrali.

Il piano di scollamento ideale è quello sotto-fasciale ed è quindi in questo piano che si pratica lo scollamento extrapleurico chirurgico.

In corrispondenza della cupola pleurica lo scollamento si produce nello spessore della fascia endotoracica ed al di sotto del cosiddetto diaframma fibroso di Bourgery, formazione di struttura nettamente diversa, costituita da fibre collagene, priva di fibre elastiche, che si inserisce solidamente sul bordo della prima costa ed in parte sulla faccia interna. Il diaframma di Bourgery è quindi una formazione esclusivamente collagena che appartiene alla fossa sopraclavicolare ed è una condensazione del mesenchima cervicale. La cupola pleurica è tenuta in sede dalle sue aderenze alla prima costa e dall'adesione alla faccia interna del diaframma fibroso, che è una formazione della parete toracica. ⁽¹⁾

1.3 Mesotelioma pleurico: definizione

Il mesotelioma pleurico è un tumore che origina dalle cellule che rivestono le cavità pleuriche e peritoneali, come per il pericardio e la tonaca vaginale. La sua distribuzione può essere uni- o pluri-focale o può ricalcare la distribuzione che assumono le cellule del mesotelio.

1.4 Epidemiologia

Il mesotelioma è un tumore poco frequente, con una incidenza aumentata soprattutto nei paesi industrializzati, nei quali è stato riconosciuto in stretta relazione con l'esposizione pregressa all'asbesto per motivi occupazionali.

In Italia il tasso annuale di incidenza è di 3-4 casi per 100000 abitanti per i soggetti al di sopra dei 40 anni, con punte di 10-15% nelle città con maggior impatto industriale (Genova, Trieste, Taranto, Alessandria, Torino). L'età media dei soggetti colpiti è compresa tra i 50 e i 60 anni. Il sesso maschile risulta più colpito, con un rapporto M/F di 2-6/1. ⁽²⁾

Alcuni studi epidemiologici prospettano nei prossimi vent'anni un aumento dell'incidenza del mesotelioma maligno, a causa dell'ampio utilizzo dell'asbesto (o amianto) avuto nei decenni scorsi ed in relazione al lungo periodo di latenza con cui la malattia si manifesta. ⁽³⁾

Uno studio prospettico statunitense ha stimato che i casi di mesotelioma annuali negli Stati Uniti (circa 2500-3000) tenderanno ad aumentare nei prossimi anni, fino ad un picco massimo previsto per il 2020. ⁽⁴⁾

Oltre alla forma maligna, può essere riscontrata una patologia mesoteliale benigna primitiva della pleura. Questa è conosciuta come mesotelioma “fibroso solitario” o anche mesotelioma fibroso benigno della pleura. Esso presenta in Italia un’incidenza del 2,8 per 100000 abitanti. ⁽²⁾

1.5 Amianto

Con il termine generico di asbesto o amianto si indica una famiglia di silicati fibrosi resistenti al calore, agli acidi ed agli alcali. Le varietà mineralogiche che vengono più comunemente utilizzate comprendono amianti di serpentino (crisotilo) ed amianti di anfibolo (crocidolite, amosite, antofillite, tremolite, ed actinolite).

Solamente la crocidolite e l’amosite hanno avuto una notevole importanza industriale, mentre i rimanenti si trovano generalmente come impurezze o minerali associati (la tremolite, ad esempio, costituisce l’impurezza presente nel talco asbestiforme). L’amianto si trova in natura sotto forma di vene o fasci di fibre nelle litoclasti o all’interno della roccia madre. Le sue fibre a seconda delle diverse giaciture in cui possono trovarsi prendono il nome di:

- *Cross Fibre* se sono orientate perpendicolarmente alla superficie delle vene;
- *Slip Fibre* se sono poste sul piano delle litoclasti;
- *Mass Fibre* se sono disposte in maniera caotica all'interno della roccia inglobante.

All'abito cristallino di tipo asbestiforme si accompagnano delle peculiari caratteristiche quali la possibilità, unica fra le fibre minerali, di essere filate e tessute e le capacità isolanti nei confronti del calore e del rumore.

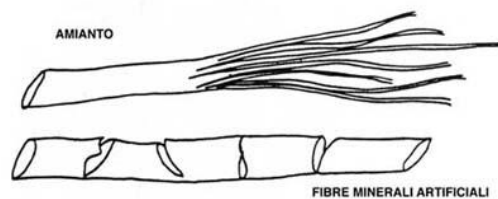
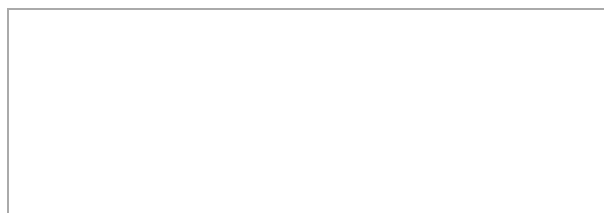


Figura 1: Rappresentazione di una fibra d'amianto vs una fibra minerale artificiale

Questi minerali hanno anche la proprietà di dividersi longitudinalmente in lunghe e sottilissime fibre, impropriamente dette fibrille, ed è questa la causa della loro pericolosità per la salute (a differenza delle fibre artificiali che si fratturano trasversalmente).



Confronto tra i diametri di varie fibre

| TIPO DI FIBRA | DIMENSIONI | | |
|------------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|
| | | LANA DI ROCCIA | 4 - 7 μm |
| FIBRILLA DI CRISOTILO | 0,02 - 0,04 μm | FIBRA DI SCORIA | 3 - 5 μm |
| FIBRA DI CRISOTILO | 0,75 - 1,50 μm | LINO, CANAPA | 12 - 80 μm |
| FIBRILLA DI ANFIBOLI | 0,10 - 0,20 μm | COTONE | 10 μm |
| FIBRE DI ANFIBOLI | 1,50 - 4 μm | LANA | 20 - 28 μm |
| FIBRA DI VETRO | 1 - 5 μm | RYON, NYLON | 7 - 7,5 μm |
| | | RAGNATELA | 7 μm |
| | | CAPELLO UMANO | 40 μm |

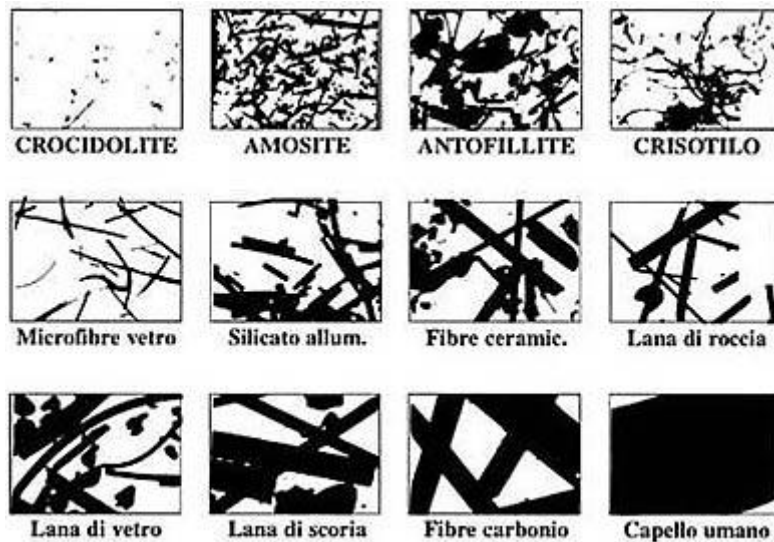


Figura 2: Immagini microscopiche di diversi tipi di fibre in confronto con un capello umano

L'asbesto, definito in passato "magico minerale", era conosciuto già dagli antichi egizi e menzionato da Plinio. Tuttavia l'inizio della sua estrazione e l'utilizzo a fini industriali risale al 1890, quando venne adoperato in diverse attività produttive.

L'ipotesi che il mesotelioma risultasse legato all'esposizione dell'asbesto fu fatta per la prima volta da Gloyne, in Gran Bretagna, nel 1935.

Nel 1960, Wagner & al. dimostrarono la reale associazione di tale forma tumorale con l'attività lavorativa, riportando 33 casi di mesotelioma in minatori di crocidolite in Sud Africa. Ulteriori studi si sono succeduti, tra cui quello del 1987 di Baris et al, in cui si osservava uno straordinario aumento di mortalità per mesotelioma nella popolazione di alcuni villaggi siti in un'area vulcanica (poi scopertasi ricca di crocidolite nel terreno circostante) della Cappadocia centrale.

Numerose segnalazioni sono state riportate in diversi ambienti lavorativi:

miniere, cantieri navali, produzione di materiali isolanti, cemento-amianto, freni e frizioni.

Per quello che riguarda l'Italia, sono stati riportati diversi casi a Casal Monferrato, in relazione agli impianti di produzione di pannelli di eternit, a La Spezia, Mestre, Portogruaro, Piombino, in relazione all'attività cantieristico-navale dove l'asbesto è usato per le sue proprietà isolanti nella struttura delle caldaie e dell'impianto motore.

Tutto questo ha sollevato una delle più importanti questioni di sanità pubblica, con l'emanazione, da parte del Governo, di speciali decreti atti a regolare:

- le restrizioni ed i divieti di impiego di amianto;
- l'incolumità e la sicurezza dei lavoratori;
- la tutela dell'ambiente;
- i disciplinari tecnici;
- i materiali sostitutivi l'amianto;

1.6 Eziopatogenesi

Nel polmone esposto ad asbesto possono essere rinvenute 5 differenti tipi di fibre: crisotilo, amosite, crocidolite, tremolite, antofillite.

La malattia polmonare da asbesto può presentarsi in varie forme: versamento pleurico benigno, placche pleuriche, ispessimento pleurico diffuso e mesotelioma maligno diffuso.

È stato ampiamente dimostrato come la qualità aerodinamica delle diverse fibre di asbesto sia rilevante nella patogenesi delle lesioni pleuriche: un alto rapporto lunghezza/diametro permette una più profonda penetrazione nelle vie aeree, con aumentato rischio di danno polmonare e pleurico. A questo riguardo la crocidolite ed il gruppo degli anfiboli sono certamente quelli con più alta patogenicità, per via del loro diametro e della possibilità di raggiungere facilmente l'albero tracheobronchiale, il polmone e da qui raggiungere lo spazio

pleurico. Anche l'esposizione a fibre minerali distinte dall'asbesto, presenti in ambienti vulcanici, come l'erionite, rientra nell'eziologia del mesotelioma.

Le cellule mesoteliali, considerate in passato come esclusive cellule di rivestimento, giocano un ruolo importante anche nel processo infiammatorio. Ancora non chiari risultano il significato della differenziazione cellulare espressione di un polimorfismo fenotipico non legato alla grande varietà di specificità antigenica (cheratina, vimentina, CEA), e la natura delle numerose anomalie cromosomiche riscontrate all'analisi del cariotipo, comprendenti modificazioni in diversi cromosomi: 5, 7, 20, 22. Le ricorrenti mutazioni di sequenze di DNA suggeriscono che, molto probabilmente, le aree cromosomiche corrispondenti contengono geni importanti per l'iniziazione e per la progressione del tumore. Un ruolo importante nello sviluppo delle cellule neoplastiche sembra essere svolto dall'azione dei fattori di crescita: in molti studi l'incrementata espressione dei geni per il PDGF (fattore di crescita derivato dalle piastrine) e del suo recettore suggerisce il ruolo che questi può avere come fattore di crescita autocrino nel mesotelioma. La stessa espressione del HGF (fattore di crescita epatocitario) e del suo recettore c-met sembra coinvolta, non solo nella progressione del mesotelioma, ma anche nella sua crescita e nella relativa migrazione.

Anche se nella maggior parte dei casi l'esposizione all'amianto è dovuta a motivi occupazionali, paraoccupazionali o ambientali, l'amianto può essere considerato un materiale ubiquitario. Le autopsie eseguite nei grandi centri urbani hanno rilevato la presenza di fibre o corpi di amianto nei polmoni di circa il 30% della popolazione. Negli ultimi anni, il progressivo incremento

dell'incidenza di mesotelioma si è osservato anche per i soggetti non a rischio professionale, configurandosi così la possibilità di un inquinamento ambientale.

(5 e 6)

Ancora da chiarire è invece la capacità oncogenetica del virus SV40, in grado di dare mesotelioma pleurico, e che è stato trovato come contaminante nel vaccino poliomeelitico negli anni '50 e '60 nel Regno Unito. ^(7 e 8)

1.7 Anatomia Patologica

Macroscopicamente il mesotelioma ha una apparenza stereotipata ma all'esame microscopico dimostra una spiccata diversificazione della sua strutturazione cito-architettónica tanto da esprimere vari tipi neoplastici. Malgrado la sua origine da una sola linea cellulare, esistono mesoteliomi che sono di natura esclusivamente epiteliale o completamente mesenchimale od ancora forme da commistione fra tumore sarcomatoide e tumore epiteliale. La classificazione istologica del mesotelioma pleurico considera quattro tipi fondamentali di mesotelioma:

- Epiteliale (tubulo-papillare ed epitelioide)
- Sarcomatoso (includente la forma desmoplastica)
- Bifasico (misto)
- Scarsamente differenziato (o indifferenziato)

Il mesotelioma maligno diffuso della pleura è caratterizzato dalla tendenza a diffondere all'interno dell'intera cavità pleurica. Nelle forme iniziali le lesioni appaiono come piccoli noduli multipli sulla pleura viscerale o parietale. In seguito i noduli tumorali si estendono lungo la superficie pleurica, formando un ispessimento a corazza, irregolare, che comprime il polmone sottostante. Il cavo pleurico può essere per lo più completamente oblitterato o, altre volte, presentare i due foglietti separati, almeno in parte, per la presenza di un versamento emorragico.

Con il progredire della crescita la massa tumorale invade il parenchima polmonare, le coste e i tessuti intercostali e sottocutanei e può metastatizzare ai linfonodi regionali, al polmone controlaterale, al fegato, al cervello, alle ossa e altre sedi.

I **mesoteliomi pleurici maligni** presentano spesso aspetti istopatologici polimorfi.

Essi sono prevalentemente distinti in tre diversi istotipi:

- forme epiteliali;
- forme sarcomatoidi;
- forme miste o bifasiche.

La **forma epiteliale** è caratterizzata dalla presenza di formazioni pseudoghiandolari, cordoni e papille superficiali di cellule con aspetto epiteliale. Tali cellule mostrano alcune somiglianze con i carcinomi, particolarmente

adenocarcinomi, con formazione tubulare. I tubuli sono di solito allineati con un semplice epitelio cubico, supportato da uno stroma fibroso di aspetto benigno, che spesso forma noduli rotondi. Un pattern tubulo-papillare dell'epitelio è comune, ma in tumori poco differenziati sono stati riscontrati strati o trabecole di cellule poligonali. Nella distinzione con l'adenocarcinoma la presenza di mucina epiteliale intracellulare (diastasi PAS-positiva) può essere distinta dalla mucina acida delle cellule mesoteliali (acido ialuronico) mediante la colorazione ialuronidasi-alcian blu. I casi che presentano un incerto inquadramento possono essere supportati dalla microscopia elettronica: le cellule mesoteliali, entrambe benigne e maligne, sono riconoscibili grazie ai loro lunghi microvilli.

La **forma sarcomatoide** presenta cellule fusate con atteggiamenti fibromatosi e sarcomatosi. Fibre collagene e reticolari possono essere trovate tra le cellule tumorali con speciali colorazioni e qualche volta il collagene è presente in grande quantità. I mesoteliomi sarcomatosi sono distinguibili dalle fibrosi pleuriche benigne per la maggiore cellularità, per la presenza di cellule più larghe e per un numero più elevato di mitosi.

La **forma bifasica** presenta aspetti misti e combinati. È la forma di più comune riscontro, tanto che alcuni autori sostengono che se manca la dimostrazione del carattere bifasico la diagnosi di mesotelioma maligno è sempre alquanto incerta.

La **forma mista** si riferisce a quei mesoteliomi che presentano i pattern epiteliali e sarcomatosi, in varia proporzione.

La forma benigna, definita anche **mesotelioma fibroso solitario**, è tipicamente di tipo fibroso (a cellule fusate); in sezione ricorda i fibromi, spesso con spazi cistici ripieni di liquido, delimitati da cellule epiteliali mesoteliali. I tumori benigni si presentano come formazioni polipoidi peduncolate, originanti prevalentemente dalla pleura viscerale. Possono trovarsi raramente nel mediastino, nella tunica vaginale del testicolo, nelle cavità paranasali e nel fegato.

Le caratteristiche anatomopatologiche determinano un aspetto di massa solitaria ben circoscritta, più o meno lobulata, non infiltrante le strutture vicine, di dimensioni da qualche cm a 20 cm e oltre. Al microscopio la formazione è delimitata da mesotelio appiattito e costituita da tessuto cellulare di elementi in gran parte fusiformi fittamente stipati, disposti disordinatamente o in brevi fasci, intrecciati a formare grossolani accumuli reciprocamente separati da collagene ialino. Le cellule fusate presentano scarso citoplasma, debolmente eosinofilo, e nuclei ovalari normocromici per lo più privi di nucleoli; le mitosi sono molto rare. I tumori fibrosi localizzati mostrano un singolo istologico pattern nella maggioranza dei casi, due pattern differenti in una minoranza e tre o più patterns raramente. Il gruppo più comune presenta una combinazione tra cellule simili ai fibroblasti e tessuto connettivo in varia proporzione e in modo disordinato o casuale; il secondo pattern istologico più comune simil-emangiopericitoma è osservato nel 25% dei tumori.

Dal punto di vista immunostochimico i tumori solitari sono tipizzati dalla positività alle colorazioni per vimentina e desmina e dalla negatività per cheratina.

Per la diagnosi differenziale con altri tumori mesenchimali può risultare utile la determinazione della proteina S100, dell'actina, dell'antigene leu-7-cd57 e dell'enolasi neurone specifica (NSE), la cui negatività permette di escludere l'origine neuronale, vascolare o muscolare della formazione. Tuttavia, non esistono criteri definitivi per determinare il possibile comportamento aggressivo o maligno del tumore. La resezione chirurgica della lesione risulta, quindi, indispensabile sia per chiarire la diagnosi sia per attuare l'unica terapia attualmente proponibile.

Per il mesotelioma maligno, al fine di una corretta diagnosi istologica del tumore, grande ruolo hanno assunto negli ultimi anni le caratteristiche istochimiche, con l'utilizzo della PAS-positività e della colorazione Alcian blu, e le caratteristiche immunoistochimiche, come la positività per cheratina e vimentina. L'impiego di anticorpi monoclonali diretti contro antigeni di membrana di cellule epiteliali permette una buona discriminazione tra mesotelioma e adenocarcinoma; anche la microscopia elettronica, in casi dubbi, svolge un ruolo significativamente rilevante nella diagnosi differenziale.

Le forme monofasiche a morfologia epiteliale, essendo costituite da elementi cellulari disposti in cordoni solidi, papille o in formazioni pseudo-ghiandolari, pongono il problema di operare una diagnosi differenziale con le localizzazioni secondarie alla pleura di adenocarcinoma. Analogo problema differenziale esiste con le iperplasie reattive del mesotelio, quando le cellule si dispongono in file che mimano la forma maligna.

La difficoltà diagnostica spinge il patologo ad affidarsi a metodiche aggiuntive: l'istochimica per evidenziare specifici prodotti del tessuto, l'immunoistochimica

tramite anticorpi monoclonali per evidenziare eventuali antigeni specifici del tumore, e la microscopia elettronica.

Tra le metodiche istochimiche la dimostrazione dell'acido ialuronico è poco specifica, in quanto quest'acido può essere sintetizzato anche da elementi mesenchimali immaturi presenti in altri tipi di tumore. Il mesotelioma produce acido ialuronico, a differenza degli adenocarcinomi metastatici che producono muco-sostanze neutre. Entrambe le neoplasie possono reagire positivamente con il PAS, ma dopo trattamento con diastasi, i citoplasmici risultano PAS-negativi nel mesotelioma, mentre rimangono positivi nell'adenocarcinoma.

In molti casi il mesotelioma risulta Alcian blu positivo, essendo l'acido ialuronico una sostanza mucoide acida. Tuttavia un trattamento con ialuronidasi negativizza la reazione. Nei rari casi di adenocarcinoma, in cui siano presenti sostanze Alcian blu positive, la ialuronidasi non ha invece alcun effetto.

La colorazione al mucicarminio, positiva negli adenocarcinomi, è generalmente negativa nei mesoteliomi. In un quarto dei casi di mesotelioma è possibile evidenziare con il Van Gieson (tricromica) i globi di collagene nel centro di alcuni aggregati cellulari.

Numerosi studi immunoistochimici hanno individuato anticorpi specifici in grado di distinguere, routinariamente su tessuto incluso in paraffina, un mesotelioma da un adenocarcinoma metastatico.

L'intensità di colorazione per la citocheratina CAM 5.2 è uguale in tutti i tipi di mesotelioma, mentre l'intensità con citocheratina AE1/AE3 diminuisce passando dal tipo epiteliale al tipo sarcomatoide. La colorazione con vimentina

è più intensa per il tipo sarcomatoide, mentre con l'antigene di membrana epiteliale (EMA) è più intensa la forma epiteliale.

Il tipico pattern per un mesotelioma con un fenotipo epiteliale o prevalentemente epiteliale presenta una reazione negativa o debole per vimentina, una forte reazione per le citocheratine (CAM 5.2, AE1/AE3), è una reazione molto forte per EMA.

Per il tipo sarcomatoide, o prevalentemente sarcomatoide, il tipico pattern è rappresentato da una forte reazione alla vimentina e citocheratina CAM 5.2, una debole reazione alla citocheratina AE1/AE3, e una negativa o debole all'EMA. Si osserva, in tal modo, che un piccolo pannello di anticorpi può risultare molto utile a definire il profilo immunofenotipico dei differenti mesoteliomi. ^(9, 10, 11)

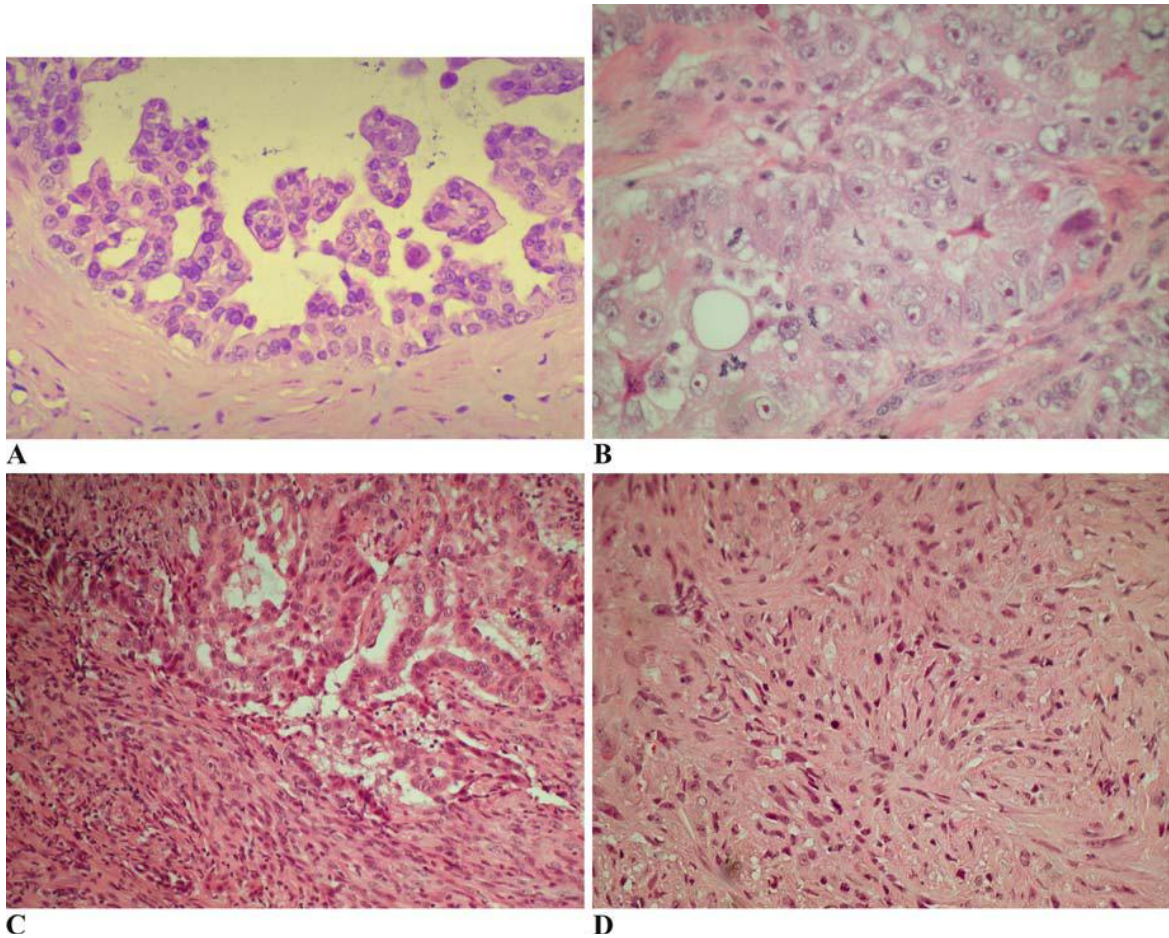


Figura 3: a) *Mesotelioma epiteliale sottotipo tubulo-papillare*; b) *Mesotelioma epiteliale sottotipo solido*; c) *sottotipo bifasico*; d) *sottotipo sarcomatoide*

1.8 Clinica

Il mesotelioma è una patologia tipica del maschio adulto (70-80% casi) tra la 5° e la 7° decade. Si presenta tipicamente con reperti di dispnea, di dolore toracico o entrambi. 1/3 dei pazienti circa riferisce mancanza di respiro dovuto alla diffusione del mesotelioma lungo la gabbia toracica in assenza di dolore. Quando presente, il dolore toracico tende ad essere sordo o ricorrente, ma il tipico dolore pleurico può verificarsi in presenza di effusioni pleuriche. Può

repertarsi disfagia, anche se è in genere di riscontro tardivo. Diversamente dai carcinomi broncogeni i reperti di emottisi, linfadenopatia e sintomi mediastinici sono meno comuni.

Il coinvolgimento delle strutture mediastiniche è di solito ben diagnosticato ma la presenza di riduzione del timbro vocale o sindrome della vena cava superiore solo raramente sono sinonimo di un interessamento più grave di tali strutture. Massa sconfinante nella gabbia toracica, perdita di peso e sudorazione profusa sono elementi meno comuni, come pure il riscontro di un mesotelioma peritoneale, sebbene si possa rilevare in almeno un terzo degli esami autoptici. ⁽¹²⁾

L'esordio di un mesotelioma peritoneale avviene con sintomi non specifici come perdita di peso, inappetenza, nausea, vomito, diarrea, stipsi, ed occasionalmente ascite carcinomatosa. L'ostruzione dell' intestino tenue è generalmente un reperto tardivo e la sopravvivenza mediana è di 7 mesi, inferiore a quella del mesotelioma pleurico.

Sono state inoltre descritte numerose sindromi paraneoplastiche associate a MPM che includono ⁽¹³⁾:

- Coagulazione intravascolare disseminata (CID)
- Tromboflebiti migranti (see "Hypercoagulable disorders associated with malignancy")
- Trombocitosi
- Anemia emolitica Coombs (+)

- Ipoglicemia
- Ipercalcemia associata a secrezione del “parathyroid hormone-like peptide”

Marcatori tumorali sierici

Non è ancora stato dimostrato un ruolo diagnostico per i seguenti marcatori tumorali sierici. I più promettenti sono la mesotelina e l'osteopontina.

La mesotelina è una glicoproteina che è espressa sulla superficie delle normali cellule mesoteliali ⁽¹⁴⁾ e che è altamente sovra espressa nel mesotelioma maligno. I peptidi solubili correlati alla mesotelina (SMRPs=*Soluble mesothelin-related peptides*) riscontrabili in circolo sono ritenuti essere di frammenti clivati dalla mesotelina o varianti anormali di mesotelina che non sono in grado di aderire correttamente (o di costituire la normale mesotelina) alla membrana cellulare e che vengono ritrovati nel siero.

Il potenziale ruolo diagnostico della misurazione dei SMRPs nel siero è stato dimostrato da uno studio iniziale in cui i livelli di SMRPs erano incrementati nell'84 % di 44 pazienti affetti da mesotelioma pleurico⁽¹⁵⁾. Per paragone, elevati livelli di SMRPs sono stati trovati in 3 di 160 pazienti appartenenti ad un gruppo di controllo (2%), che erano sani o che possedevano lesioni benigne del polmone, lesioni pleuriche o altri tipi di tumori maligni (soprattutto ADK polmonari e ca. polmonare a piccole cellule).

La potenziale utilità del dosaggio sierico degli SMRPs è stata confermata in almeno altri 3 studi addizionali, ma si sono riscontrate delle limitazioni riguardo la specificità del marcatore agli istotipi epitelioide e bifasico del mesotelioma. Difatti la limitazione principale consiste nell'incapacità di essere un buon marcatore di distinzione nel caso di mesotelioma sarcomatoide dagli altri tipi di lesioni polmonari ⁽¹⁶⁻²⁰⁾.

SMRPs sono stati inoltre quantificati nel liquido pleurico ⁽²⁰⁻²²⁾. In uno studio retrospettivo di 52 pazienti con mesotelioma maligno il risultato di tale quantificazione era una sensibilità del 67% con una specificità del 98 % in 84 pazienti con versamento pleurico benigno⁽¹⁹⁾. Inoltre sia nel liquido pleurico che nel liquido peritoneale sono stati riscontrati elevati livelli di SMRPs in pazienti con altre neoplasie maligne come cancro dell'ovaio e pancreatici.

Pazienti che presentano un sospetto per malattia mesoteliale maligna, elevati livelli di SMRPs in siero, versamento pleurico, o liquido ascitico non possono rimpiazzare la diagnosi istologica ⁽²³⁾. La quantificazione degli SMRPs è attualmente disponibile dal punto di vista commerciale (Mesomark assay) ma è indicata solo nel monitorare la risposta agli eventuali trattamenti in pazienti in cui la diagnosi è già stata posta.

L'Osteopontina è invece una glicoproteina che media le interazioni cellula-matrice extracellulare e che è sovra espressa in numerose forme tumorali. In uno studio condotto su 190 pazienti, è stato dimostrato che i livelli di osteopontina risultavano più alti nei pazienti affetti da mesotelioma (133ng/mL) rispetto a pazienti con patologie asbesto-correlate non maligne (30ng/mL) e rispetto a pz non esposti precedentemente all'asbesto (20ng/mL)⁽²⁴⁾. I livelli di

osteopontina nel liquido pleurico possono essere utili nel distinguere un mesotelioma maligno ^(25, 26); tuttavia più di uno studio suggerisce che l'osteopontina ha un'accuratezza diagnostica minore rispetto la mesotelina nel dimostrare ciò ⁽¹⁷⁾.

1.9 Diagnosi strumentale

1. Il radiogramma del torace (RX) è un esame di primo livello, spesso aspecifico, può testimoniare un versamento pleurico, o più raramente evidenziare la presenza di opacità margino-costali mammellonate.

2. La TC è senza dubbio più accurata rispetto alla radiologia tradizionale sia nell'identificazione che nella caratterizzazione della patologia pleurica; grazie all'avvento della *TC multislice* ci si può avvalere di ricostruzioni multiplanari che hanno ridotto almeno in parte i limiti diagnostici ma soprattutto stadiativi della TC nei confronti della risonanza magnetica (RM), tradizionalmente superiore nell'identificazione del coinvolgimento della parete toracica e del diaframma.

3. La RM si distingue per l'ottimo *enhancement* dell'ispessimento neoplastico. Essa a differenza della TC può aggiungere maggiori informazioni riguardo il coinvolgimento del diaframma, della fascia endotoracica o di singoli foci di invasione a livello della gabbia toracica. Il MPM tipicamente si presenta come iso o leggermente iperintenso all'immagine T1-pesata e modestamente iperintenso all'immagine T2-pesata.

4. La PET ha un ruolo importante soprattutto nella stadiazione per la ricerca di metastasi linfonodali o a distanza. Il volume di captazione standardizzato, che è una misura semiquantitativa dell'attività metabolica della lesione, è significativamente più alto nel MPM rispetto alle lesioni pleuriche benigne (come pleuriti e quadri asbestosici-correlati). In virtù della ridotta risoluzione spaziale la PET non può prescindere dall'utilizzo combinato con la TC che ne aumenta la sua risoluzione.

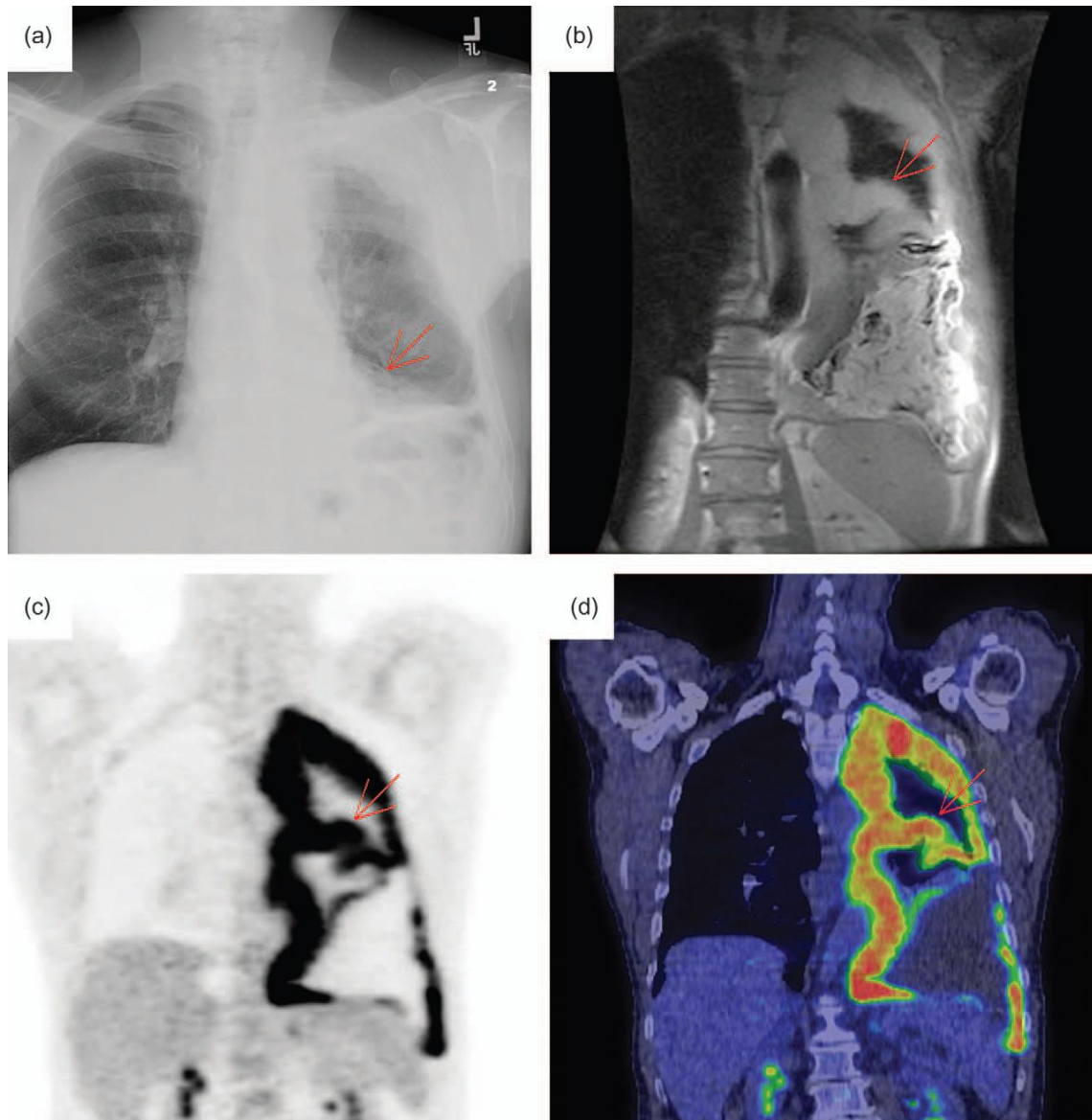


Figura 4: Coinvolgimento del polmone sinistro e della scissura obliqua con collasso del lobo inferiore di sx. 64enne maschio con diagnosi di MPM sottotipo epiteliale. (a) Radiografia del torace; (b) Risonanza magnetica coronale (RMN); (c) Tomografia ad emissione di positroni coronale (PET); (d) PET/CT coronale;

All'esordio, il quadro radiologico può essere paucisintomatico, dominato da un versamento modesto, ma più spesso quest'ultimo può diventare tanto abbondante da interessare un intero emitorace, tanto da dislocare contro-

lateralmente il mediastino. Altre volte, pure in presenza di versamento, il mediastino è in asse in relazione al “congelamento” delle strutture pleuro-mediastiniche da parte delle alterazioni della pleura sottostante.

Placche o calcificazioni che testimoniano una esposizione pregressa all’asbesto possono essere presenti nel 20% dei casi. La lesione diretta, di tipo diffuso, è costituita da ispessimento delle limitanti pleuriche. La sua superficie è liscia e lo spessore non uniforme; frequenti sono le nodularità. Caratteristico è il coinvolgimento della limitante mediastinica che viceversa è raramente interessata nei versamenti su base flogistica (ispessimento circumferenziale). La natura neoplastica di un ispessimento è dunque ipotizzabile in presenza di un’estensione circumferenziale (specificità 100%), di nodularità (specificità 94%), di uno spessore maggiore di 1 cm (specificità 94%), del coinvolgimento della limitante mediastinica (specificità 88%).

La sensibilità dei segni citati, purtroppo, è bassa e varia dal 30 al 60% a seconda delle casistiche; e infatti una pleura normale in TC non esclude la natura neoplastica del versamento. E’ impossibile differenziare gli aspetti sopra riportati del mesotelioma da quelli di una metastatizzazione pleurica diffusa; alcuni autori hanno suggerito il criterio della presenza di linfadenopatie come più probabile indicatore di malattia metastatica, ma non tutti lo condividono.

Con il progredire della malattia, il mesotelioma tende a estendersi a entrambe le sierose e le nodulazioni tendono a confluire sino a formare una cotenna dall’apice alla base del polmone con aspetto detto “a corazza”. Sono invase più frequentemente le porzioni posteriori e inferiori degli emitoraci, probabilmente per cause gravitazionali; ne conseguono ipomobilità e retrazione delle regioni

basali con ripercussioni sulla funzionalità respiratoria. Possono associarsi tumefazioni dei linfonodi mediastinici. L'infiltrazione delle strutture toraciche, evidentemente, è un segno specifico di malignità ma è poco frequente. L'evoluzione loco-regionale si conclude con l'invasione di strutture limitrofe quali parete toracica, mediastino e diaframma. Le metastasi a distanza sono poco comuni, soprattutto all'esordio, così come l'interessamento linfonodale (27-30).

5. La Toracosopia rappresenta lo standard di riferimento per la diagnosi istologica in vivo di questa patologia in quanto, la biopsia toracoscopica sotto controllo visivo, consente di identificare gran parte dei casi riuscendo ad eguagliare l'accuratezza della toracotomia.

L'esame endoscopico (toracosopia), oltre a permettere prelievi tissutali abbondanti e adeguati per le colorazioni immunoistochimiche necessarie per la diagnosi differenziale con l'adenocarcinoma, consente di valutare l'estensione endocavitaria della neoplasia, potendo fornire dati che si integrano con quelli della diagnostica per immagini (TC in particolare, ma anche RM e PET) per una stadiazione della malattia che si è rivelata importante indicatore prognostico, nonché elemento decisivo per l'approccio terapeutico. Negli stadi iniziali, dove il coinvolgimento neoplastico è localizzato alla sola pleura parietale e diaframmatica, può essere infatti efficace un trattamento locale con immunomodulatori, mentre in quelli più avanzati è sempre possibile somministrare sostanze che inducano pleurodesi a scopo sintomatico.

L'esplorazione del cavo pleurico dunque è da ritenersi oggi pressoché obbligatoria nel sospetto di mesotelioma, oltre che per l'insostituibile importanza diagnostica anche per il suo valore prognostico e terapeutico.

Esistono, dal punto di vista della casistica analizzata fino ad ora, una serie di quadri endoscopici caratteristici per la diagnosi di mesotelioma pleurico che ci permettono di differenziarlo da secondarismi pleurici di altre neoplasie (es. polmone) (Casalini e coll.). Un aspetto importante, perché utile per un orientamento diagnostico, è rappresentato dalle placche fibro-ialine di aspetto asbestosico (superficie irregolare con noduli "a gocce di cera"). La coesistenza di queste placche, che esprimono una pregressa esposizione all'amianto, con quadri francamente neoplastici (noduli, vegetazioni, ispessimenti) consente un preciso orientamento verso il mesotelioma.

Altro aspetto distintivo è la diffusione all'emidiaframma, pressoché costante nel mesotelioma, spesso del tutto assente nelle metastasi, queste ultime inoltre sono caratterizzate da un coinvolgimento diffuso della pleura costale. Le colonizzazioni neoplastiche viscerali limitate alle scissure sono osservabili nel mesotelioma, mentre le metastasi si caratterizzano per un più ampio coinvolgimento viscerale. La neoplasia primitiva inoltre fornisce più spesso rilievi endoscopici "misti", con più lesioni elementari associate, e pleura parietale "dura" al prelievo bioptico, mentre i tumori metastatici sono più spesso monomorfi. Anche i movimenti respiratori del polmone e del diaframma differiscono: queste strutture sono più rigide nel mesotelioma, pressoché fisiologiche nelle metastasi. Alcuni autori infine descrivono come segno endoscopico caratteristico anche se non esclusivo del mesotelioma le

nodulazioni confluenti, bianche o giallastre, traslucide, con aspetto ad “acini d’uva” da cui dopo la biopsia fuoriesce un liquido denso e vischioso ⁽³¹⁻³⁵⁾.

Esistono delle controindicazioni assolute e relative alla toracosopia.

Le controindicazioni assolute comprendono:

- a) grave ipossiemia ($PaO_2 < 50 \text{ mmHg}$), non correggibile con O_2 terapia, associata o meno a ipercapnia;
- b) scompenso cardiaco in atto;
- c) aritmie complesse;
- d) infarto recente ($< 3 \text{ mesi}$);
- e) terapia anticoagulante in atto o alterazione della conta piastrinica ($< 50000 \text{ mm}^3$) e dell’attività protrombinica ($< 50\%$);

Le controindicazioni relative comprendono:

- a) iperpiressia;
- b) tosse incontrollabile;
- c) stato settico;
- d) estese aderenze;
- e) modesta ipossiemia.

6) La Mediastinoscopia gioca anch’essa un ruolo importante nella diagnosi e nella stadiazione del mesotelioma come ha recentemente dimostrato uno

studio che valutava l'importanza del coinvolgimento linfonodale mediastinico come fattore prognostico negativo ⁽³⁶⁾.

1.10 Stadiazione

Nel corso degli ultimi 30 anni sono stati proposti diversi sistemi di stadiazione del mesotelioma pleurico. Il primo, proposto dall'AJCC, fu immediatamente accettato dalla *International Union Against Cancer* e pubblicato nella quinta edizione del Manuale AJCC per la stadiazione del cancro. Il sistema di stadiazione che viene qui descritto rispecchia quello proposto nel 1995 dall'*International Mesothelioma Interest Group* (IMIG) e si basa su dati aggiornati riguardanti la relazione tra i parametri T e N e la sopravvivenza globale. Sebbene già si disponga di diverse conferme della sua validità in campo chirurgico è probabile che tale sistema venga rivisto in futuro mano a mano che si renderanno disponibili nuovi dati raccolti su casistiche di pazienti più ampie. I mesoteliomi delle cavità peritoneale e pericardica sono rari e poco si prestano alla stadiazione con il sistema TNM ⁽³⁷⁾.

Definizioni del TNM

Sistema di stadiazione IMIG per il mesotelioma maligno pleurico diffuso:

Tumore primitivo (T)

TX -->> Tumore primitivo non definibile

T0 -->> Tumore primitivo non evidenziabile

T1 -->> Tumore che coinvolge la pleura parietale omolaterale, con o senza coinvolgimento della pleura viscerale. A sua volta viene ripartito in:

T1a = Tumore che coinvolge la pleura parietale omolaterale (mediastinica e diaframmatica) con assenza di coinvolgimento della pleura viscerale (Fig.5)

T1b = Tumore che coinvolge la pleura parietale omolaterale (mediastinica e diaframmatica) con focale coinvolgimento della pleura viscerale (Fig.5)

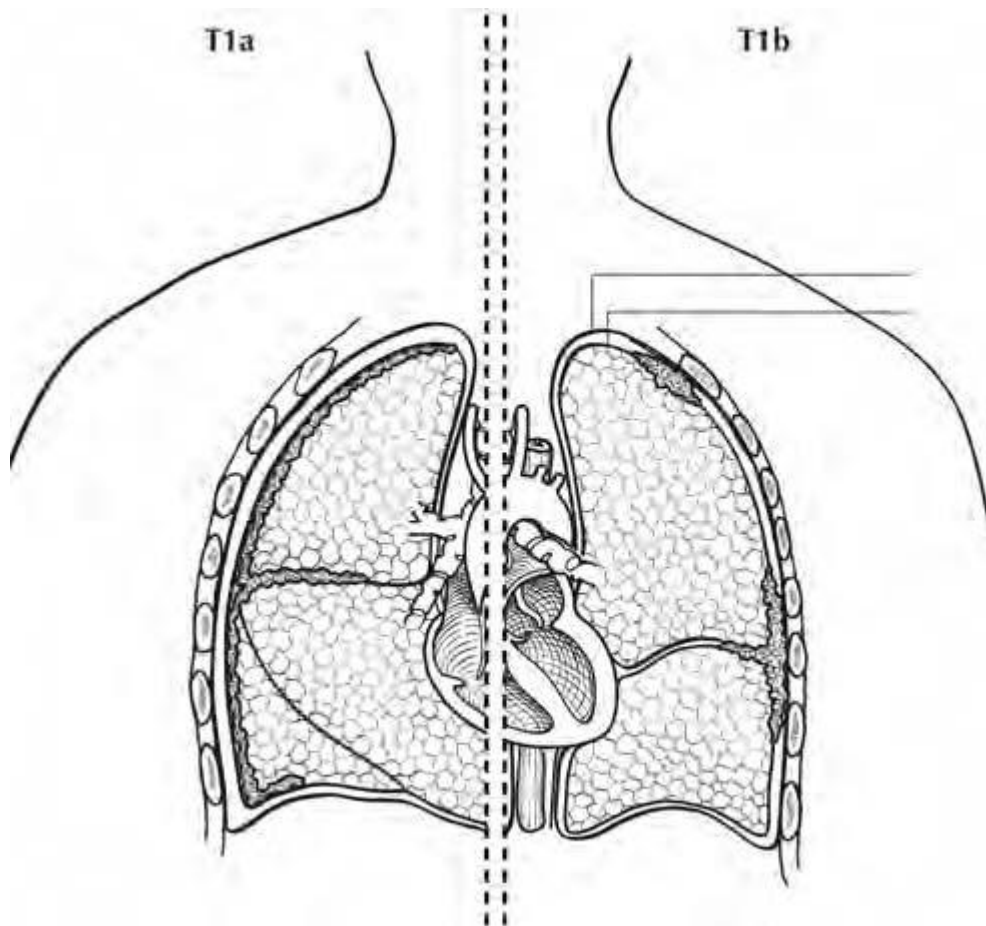


Figura 5: T1a (sinistra) è caratterizzato da assenza di coinvolgimento della pleura viscerale. T1b (destra) è caratterizzato da coinvolgimento della pleura parietale, con focale coinvolgimento della pleura viscerale.

T2 -->> Tumore che coinvolge le superfici pleuriche omolaterali (parietale, mediastinica, diaframmatica e viscerale) con almeno uno dei seguenti aspetti (Fig. 6):

- tumore confluyente della pleura viscerale (inclusa la fessura);
- coinvolgimento del muscolo diaframma;

- invasione del parenchima polmonare sottostante la lesione pleurica;

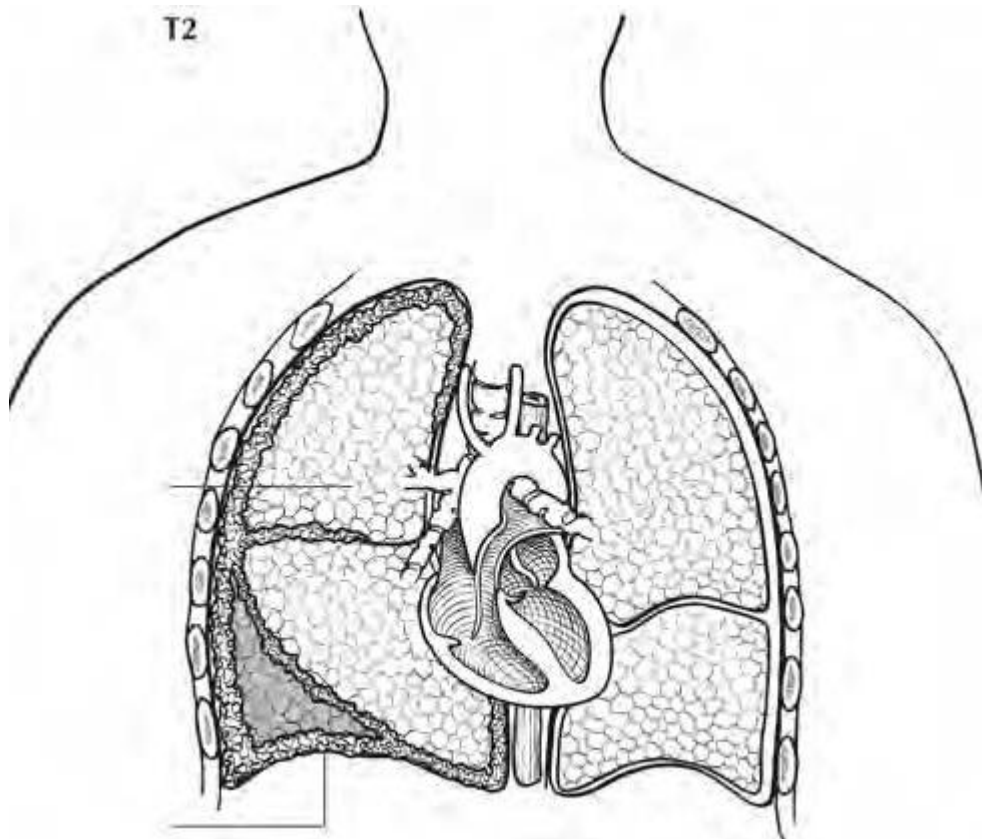


Figura 6: T2 è caratterizzato da coinvolgimento di qualsiasi delle superfici pleuriche omolaterali con almeno uno dei seguenti dati: tumore confluyente della pleura viscerale (incluso la fessura); invasione della muscolatura del diaframma (come illustrato); e/o invasione del parenchima polmonare (come illustrato).

T3_(t) -->> Tumore localmente avanzato ma potenzialmente resecabile; tumore che coinvolge tutte le superfici pleuriche omolaterali (parietale, mediastinica, diaframmatica e viscerale) con almeno uno dei seguenti aspetti (Fig. 7):

- invasione della fascia endotoracica;
- estensione nel tessuto adiposo mediastinico;

- focolaio unico, completamente resecabile, di neoplasia che invade i tessuti molli della parete toracica;
- coinvolgimento non-transmurale del pericardio;

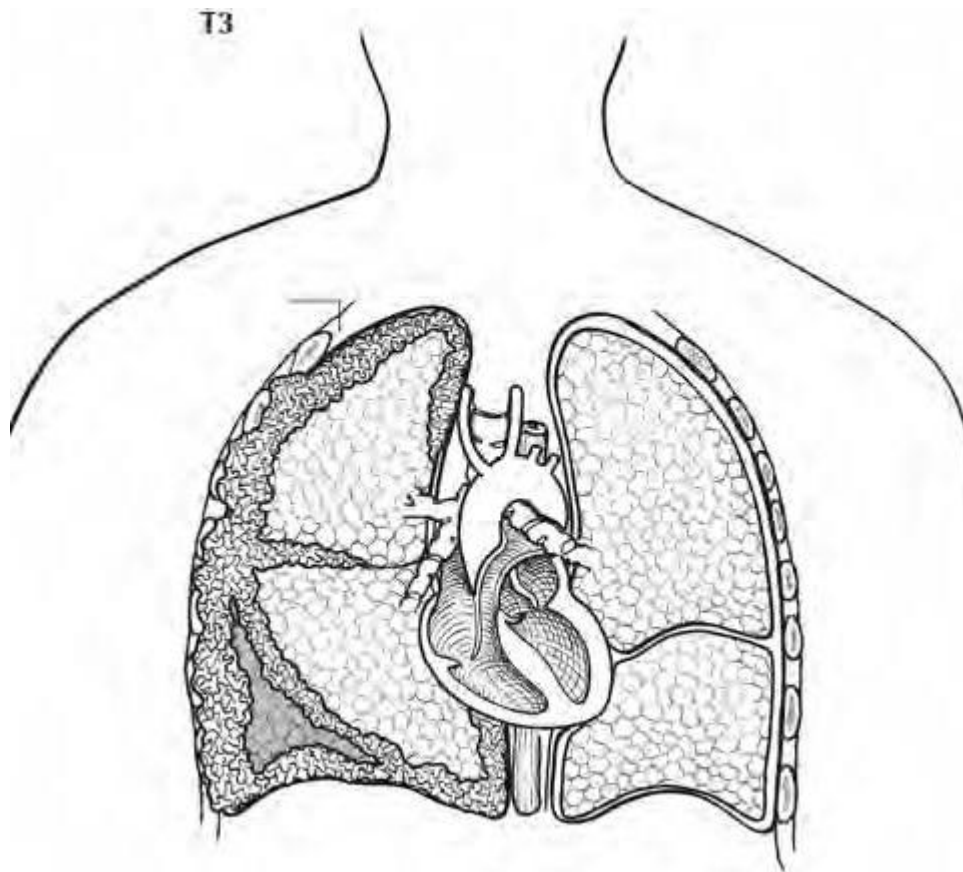


Figura 7: T3 è caratterizzato da coinvolgimento di qualsiasi superficie pleurica omolaterale, con almeno uno dei seguenti dati: invasione della fascia endotoracica, estensione nel tessuto adiposo mediastinico; focolaio unico di tumore che invade i tessuti molli della parete toracica (come illustrato); e/o coinvolgimento non trasmurale del pericardio

T4₍₂₎ -->> Tumore localmente avanzato e non resecabile chirurgicamente; neoplasia che coinvolge qualsiasi superficie pleurica omolaterali (perietale, mediastinica, diaframmatica e viscerale) con

almeno uno dei seguenti aspetti (Fig 8):

- diffusa estensione o masse multifocali nella gabbia toracica con o senza distruzione costale associata;
- invasione del peritoneo attraverso il diaframma;
- invasione diretta di qualsiasi organo mediastinico;
- estensione diretta alla pleura contro laterale;
- invasione della colonna vertebrale;
- estensione alla superficie interna del pericardio o versamento pericardico con esame citologico positivo per MPM;
- invasione del miocardio;
- invasione del plesso brachiale;

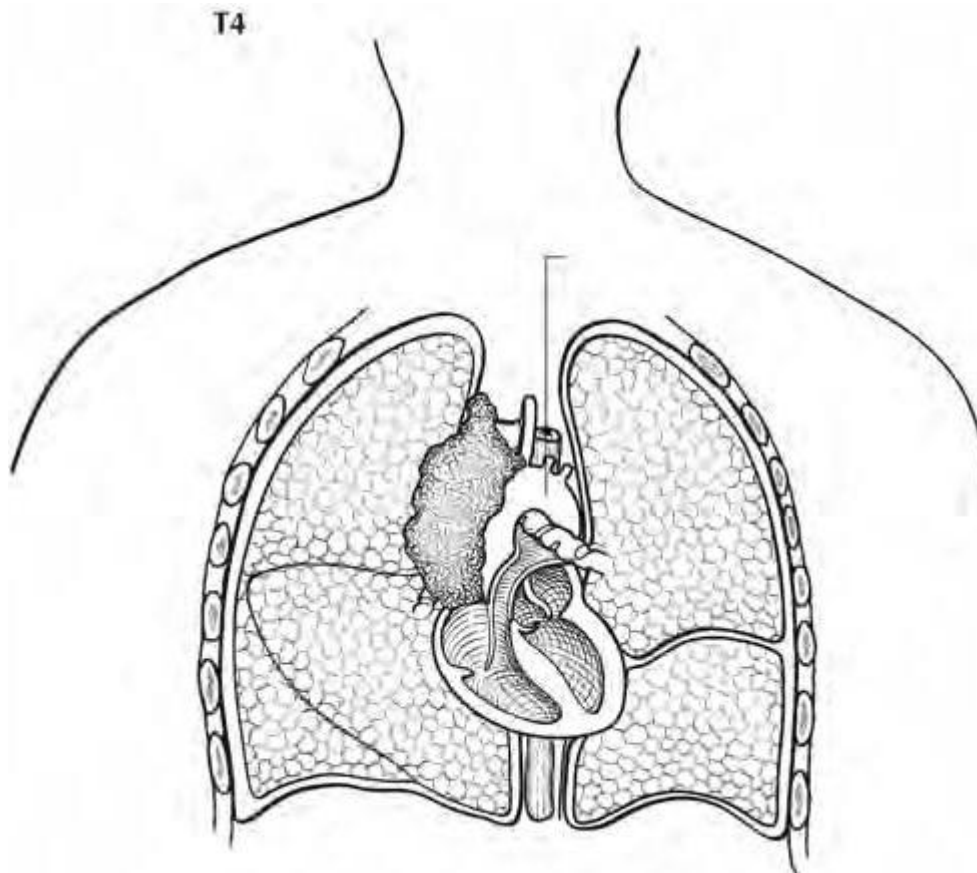


Figura 8: Il tumore T4 coinvolge qualsiasi superficie pleurica omolaterale con almeno un parametro addizionale, come l'estensione alla superficie interna del pericardio, come illustrato. (La lista completa dei parametri addizionali è fornita nella sezione delle Definizioni del TNM).

Linfonodi regionali (N)

NX = Linfonodi regionali non valutabili;

N0 = Assenza di metastasi nei linfonodi regionali;

N1 = Metastasi nei linfonodi broncopolmonari e/o ilari ipsilaterali alla lesione;

N2 = Metastasi in uno o più linfonodi delle stazioni subcarenale e/o mammaria interna o mediastinica ipsilaterale alla lesione;

N3 = Metastasi in uno o più linfonodi delle stazioni mediastinico contro-laterale, mammaria interna contro-laterale, ilare contro-laterale, e/o sovraclaveare ipsilaterale o contro-laterale o scalenica;

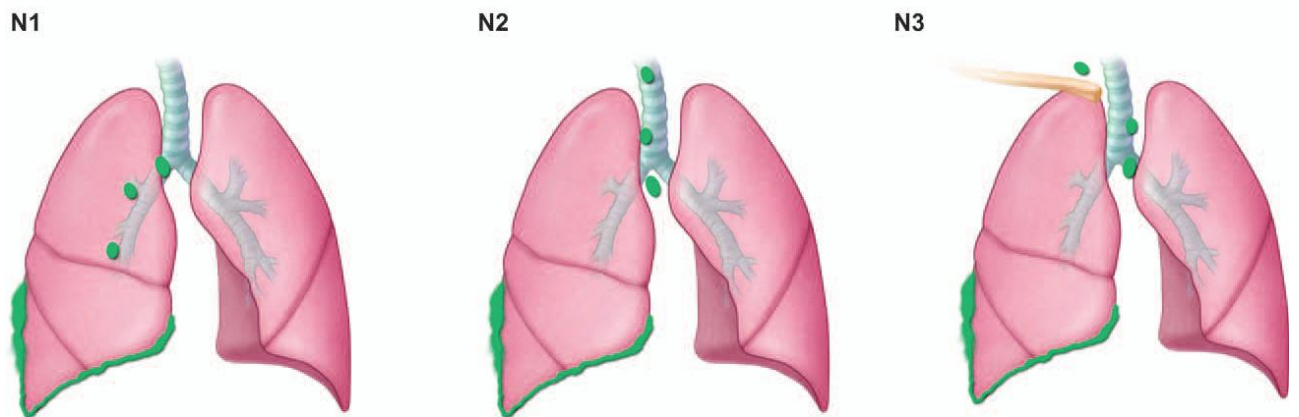


Figura 9: Rappresentazione delle metastasi linfonodali

Metastasi a distanza (M):

MX = Metastasi a distanza non accertabili;

M0 = Metastasi a distanza assenti;

M1 = Metastasi a distanza presenti;

NOTE

1. T3 designa un tumore localmente avanzato ma tecnicamente resecabile

2. T4 designa un tumore localmente avanzato e tecnicamente non resecabile

Da queste evidenze si ricavano poi gli stadi:

| | |
|------------------|---------------|
| Stadio I | |
| | 1a) T1a N0 M0 |
| | 1b) T1b N0 M0 |
| | |
| Stadio II | |
| | T2 N0 M0 |

| | |
|-------------------|------------|
| Stadio III | |
| | Ogni T3 M0 |
| | Ogni N1 M0 |
| | Ogni N2 M0 |
| Stadio IV | |
| | Ogni T4 |
| | Ogni N3 |
| | Ogni M1 |

Tabella I: Rappresentazione degli stadi della malattia

1.11 Prognosi

Numerosi studi hanno cercato di identificare dei fattori o degli elementi in grado di predire la prognosi per questa malattia ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾.

Una prognosi sfavorevole si correla a tali fattori:

- Trombocitosi, leucocitosi, o anemia
- Febbre di origine sconosciuta (criptogenetica)
- Istotipo sarcomatoide o misto
- Età >65 anni

- Scarso indice di performance
- Sesso maschile

D'altro canto una buona prognosi è associata ai seguenti fattori:

- Istotipo epitelioide
- Malattia allo stadio I
- Età < 65 anni
- Indice di performance pari a 100 o 90
- Dolore toracico debole
- La comparsa di sintomi 6 mesi prima della diagnosi istologica

I sistemi prognostici a punti descritti dal *Cancer and Leukemia Group B* (CALGB) e dalla *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) sono quelli maggiormente usati.

CALGB index — Il sistema a punti CALGB ha messo in relazione la presenza di caratteristiche cliniche e caratteristiche anatomo-patologiche con la sopravvivenza in un gruppo di 337 pazienti trattati con sola chemioterapia adiuvante in corso di malattia localmente avanzata per un periodo di 10 anni di studio ⁽⁴¹⁾. In questa analisi multivariata, il coinvolgimento pleurico (sia pericardico che peritoneale), una concentrazione di lattico deidrogenasi sierica (LDH) superiore a 500 UI/L, uno scarso indice di performance, la presenza di dolore toracico, una conta piastrinica superiore a 400'000/mm³, istotipi non epitelioidi ed un'età superiore a 75 anni, sono stati considerati indici di scarsa sopravvivenza ⁽⁴²⁻⁴⁴⁾.

EORTC index — In modo analogo, il sistema prognostico proposto dall'EORTC valutava i dati relativi a 204 pazienti reclutati per 5 diversi studi consecutivi di fase II per un periodo di 9 anni ⁽⁴⁰⁾. Considerati 5 parametri (scarso indice di performance, alta conta leucocitaria, sesso maschile, istotipo sarcomatoide, e certezza della diagnosi), sono stati creati 2 gruppi uno a prognosi favorevole ed uno con prognosi sfavorevole rispettivamente con 40% e 12% di indice di sopravvivenza, e con una sopravvivenza mediana di 8.4 mesi.

Il significato e l'accuratezza della scala prognostica proposta dall'EORTC è stato successivamente confermato in una analisi multivariata all'interno di uno studio chemioterapico di fase III associante cisplatino con raltitrexed ⁽⁴⁴⁾.

1.12 Trattamento

Poiché ci sono diverse difficoltà nel raggiungimento della diagnosi di mesotelioma nonostante la radiologia, la citologia e le tecniche biottiche, il trattamento generale dei pazienti affetti da mesotelioma deve essere effettuato da un team di esperti che coprano le diverse problematiche di questa neoplasia tra cui pneumologi, oncologi, chirurghi, esperti in cure palliative e personale ospedaliero accuratamente istruito.

Il fallimento delle singole modalità di trattamento del MPM nell'incrementare la sopravvivenza, ha aperto la porta ad approcci multidisciplinari.

Trattamento Chirurgico

Sono 3 i trattamenti chirurgici proposti ai pazienti:

a) La **Pleurectomia / Decorticazione (P/D)** che rimuove tutta la massa tumorale senza asportazione del polmone sottostante, viene riservata ai pazienti che hanno un minimo coinvolgimento della pleura viscerale.

Via d'accesso

Si inizia con una toracotomia postero laterale standard nel V spazio intercostale. Inciso il periostio della VI costa si giunge sulla faccia esterna della pleura parietale, dura, giallastra, talora con piccole nodosità, ma facilmente scollabile dalla fascia endotoracica. La pleura si scolla per qualche centimetro e si pone il divaricatore. Se l'apertura è difficoltosa, non si deve esitare e asportare la VI costa.

I° tempo. **Scollamento della pleura costale.** Si procede gradualmente nello scollamento della pleura parietale dalla fascia endotoracica, analogamente a quanto si fa nella decorticazione per empiema cronico. Man mano che si procede si può aumentare l'apertura del divaricatore e si inizia l'emostasi mediante telini caldi ed elettrocoagulazione dei punti sanguinanti.

II° tempo. **Scollamento nei punti di riflessione.** Vi sono zone di riflessione della pleura costale in quella mediastinica che richiedono particolare cautela:

a) l'apice del polmone dove si deve evitare di ledere con le dita o con il tampone i vasi succlavi, la catena del simpatico e i nervi frenico e vago;

b) anteriormente lo scollamento deve evitare di lacerare i vasi mammari interni;

c) posteriormente bisogna evitare di lacerare il tronco ascendente della vena azygos e l'esofago a destra o l'aorta discendente all'origine delle arterie intercostali a sinistra come pure il dotto toracico.

III° tempo. **Scollamento della pleura mediastinica.** Dall'apice si scolla gradualmente la pleura mediastinica fino all'arco della vena azygos a destra o fino all'arco aortico a sinistra, riconoscendo le strutture vascolari e nervose. Si giunge sul pericardio, dal quale la cotenna della pleura mediastinica quasi sempre non è separabile. Non bisogna esitare ad aprire il sacco pericardico in sede anteriore vicino allo sterno, asportandolo ampiamente insieme alla pleura mediastinica. Quasi sempre il nervo frenico viene sacrificato.

IV° tempo. **Seconda toracotomia.** Scollando la pleura costale verso il basso, si avverte con le dita il punto di riflessione della cotenna del seno costo frenico. Poiché la pleura diaframmatica è strettamente adesa al diaframma è necessario che questo venga resecato. Se la visione sul diaframma non è sufficiente è opportuno eseguire una seconda toracotomia nell'ottavo spazio. È possibile preparare il piano costale in tale sede scollando in basso i muscoli o praticando una seconda incisione cutanea: quest'ultima soluzione ha il vantaggio di evitare scollamenti muscolari con ematomi post-operatori nella compagine della parete. Alcune volte è sufficiente asportare la VI costa, evitando così la seconda toracotomia.

V° tempo. **Resezione del diaframma.** Si inizia alla periferia sul contorno laterale: si solleva la cotenna diaframmatica separandola con l'elettrobisturi dal peritoneo sottostante. Si tratta di un lavoro lungo e minuzioso; talvolta si può aprire il peritoneo: è bene suturarlo subito per evitare che il sangue diffonda in cavo addominale e creare così delle peritoniti chimiche o nella peggiore delle ipotesi delle peritoniti microbiche. È opportuno identificare l'esofago, la vena cava inferiore, procedendo medialmente fino al centro frenico, che viene asportato con la cotenna pleurica. Particolarmente difficile è la resezione nella zona posteriore dei pilastri diaframmatici e nel seno pericardio-diaframmatico; a destra è bene procedere dall'avanti all'indietro, dopo aver aperto il pericardio e identificata la vena cava inferiore e l'esofago incisione al diaframma deve passare all'esterno della vena cava inferiore. A sinistra il diaframma è reciso dopo aver identificato l'esofago e l'aorta.

VI° tempo. **Ricostruzione del diaframma.** Il piano diaframmatico residuo è costituito da una parte più o meno ampia di peritoneo e da aree periferiche di muscolo. Si cerca innanzitutto di suturare le piccole brecche. È necessario ricostruire il piano in modo da evitare l'ernia diaframmatica post-operatoria. Soltanto in quel caso a destra il piano rappresentato dal peritoneo è abbastanza solido ed è sufficiente passare dei punti in Vicryl ancorati ai bordi. Negli altri casi e sempre a sinistra è necessario porre una protesi; può essere usata una rete in Vicryl o in Prolene o una lamina impermeabile di Goretex, ancorata al diaframma residuo o alla parete toracica con dei punti pericostali. È preferibile la rete se il peritoneo è stato chiuso completamente e non vi è pericolo che il sangue del cavo pleurico scenda in addome. Se restano orifizi o

se manca gran parte del diaframma o del peritoneo è preferibile il Goretex che è impermeabile.

VII° tempo ***Ricostruzione del pericardio***. L'asportazione estesa del pericardio espone al pericolo di una lussazione cardiaca. La ricostruzione pericardica è ottenuta con un tratto di rete di Vicryl o di Prolene fissato ai bordi del pericardio residuo con punti staccati o con una sutura continua interrotta ogni tanto; possono essere usati dura madre liofilizzata o Goretex sottile, fessurato per evitare il tamponamento. La ricostruzione del pericardio deve essere sempre fatta a destra, mentre a sinistra è preferibile ma non essenziale.

VIII° tempo ***Lavaggio, revisione del cavo, accurata emostasi e posizionamento di un drenaggio***.

Terminato l'intervento prima di chiudere il cavo è opportuno effettuare una serie di lavaggi della cavità pleurica. Si adotta lo schema [(a)fisiologica+betadine; (b)fisiologia+perossido d'idrogeno; (c)fisiologica; che viene ripetuto per tre volte]. Successivamente si consiglia di controllare accuratamente l'emostasi della vasta superficie cruentizzata. Il drenaggio (Argyle 32 Ch.) viene lasciato chiuso ed i liquidi evacuati mattina e sera: a seconda della quantità si giudicherà se lasciarlo per 2 o più giorni. Se il mediastino si sposta dal lato sano, il tubo può essere lasciato a caduta per controllo radiografico quotidiano. Se il paziente si anemizza, sarà trasfuso durante il periodo postoperatorio.

b) La ***Pleuro-pneumonectomia extrapleurica (EPP)*** definita come una resezione *en-bloc* della pleura costale, mediastinica, diaframmatica (compreso lo strato muscolare ed il centro frenico da essa non separabili), del polmone, del diaframma ipsilaterale alla lesione e del pericardio omolaterale, viene riservato per le lesioni localmente avanzate in pazienti con tumori confluenti alla pleura viscerale non separabili dal polmone e parzialmente o totalmente fusi nello spazio pleurico. L'intervento è qui di seguito riportato:

Via d'accesso

Si inizia con una toracotomia postero laterale standard nel V spazio intercostale. Inciso il periostio della VI costa si giunge sulla faccia esterna della pleura parietale, dura, giallastra, talora con piccole nodosità, ma facilmente scollabile dalla fascia endotoracica. La pleura si scolla per qualche centimetro e si pone il divaricatore. Se l'apertura è difficoltosa, non si deve esitare ad asportare la VI costa.

I° tempo. ***Scollamento della pleura costale.*** Si procede gradualmente nello scollamento della pleura parietale dalla fascia endotoracica, analogamente a quanto si fa nella decorticazione per empiema cronico. Man mano che si procede si può aumentare l'apertura del divaricatore e si inizia l'emostasi mediante telini caldi ed elettrocoagulazione dei punti sanguinanti.

II° tempo. ***Scollamento nei punti di riflessione.*** Vi sono zone di riflessione della pleura costale in quella mediastinica che richiedono particolare cautela:

a) l'apice del polmone dove si deve evitare di ledere con le dita o con il tampone i vasi succlavi, la catena del simpatico e i nervi frenico e vago;

- b) anteriormente lo scollamento deve evitare di lacerare i vasi mammari interni;
- c) posteriormente bisogna evitare di lacerare il tronco ascendente della vena azygos e l'esofago a destra o l'aorta discendente all'origine delle arterie intercostali a sx come pure il dotto toracico.

III° tempo. **Scollamento della pleura mediastinica.** Dall'apice si scolla gradualmente la pleura mediastinica fino all'arco della vena azygos a destra o fino all'arco aortico a sinistra, riconoscendo le strutture vascolari e nervose. Si giunge sul pericardio, dal quale la cotenna della pleura mediastinica quasi sempre non è separabile. Non bisogna esitare ad aprire il sacco pericardico in sede anteriore vicino allo sterno, asportandolo ampiamente insieme alla pleura mediastinica. Quasi sempre il nervo frenico viene sacrificato.

IV° tempo. **Seconda toracotomia.** Scollando la pleura costale verso il basso, si avverte con le dita il punto di riflessione della cotenna del seno costo frenico. Poiché la pleura diaframmatica è strettamente adesa al diaframma è necessario che questo venga resecato. Se la visione sul diaframma non è sufficiente è opportuno eseguire una seconda toracotomia nell'ottavo spazio. È possibile preparare il piano costale in tale sede scollando in basso i muscoli o praticando una seconda incisione cutanea: quest'ultima soluzione ha il vantaggio di evitare scollamenti muscolari con ematomi post-operatori nella compagine della parete. Alcune volte è sufficiente asportare la VI costa, evitando così la seconda toracotomia.

V° tempo. **Resezione del diaframma.** Si inizia alla periferia sul contorno laterale: si solleva la cotenna diaframmatica separandola con l'elettrobisturi dal peritoneo sottostante. Si tratta di un lavoro lungo e minuzioso; talvolta si può aprire il peritoneo: è bene suturarlo subito per evitare che il sangue diffonda in cavo addominale e creare così delle peritoniti chimiche o nella peggiore delle ipotesi delle peritoniti microbiche. È opportuno identificare l'esofago, la vena cava inferiore, procedendo medialmente fino al centro frenico, che viene asportato con la cotenna pleurica. Particolarmente difficile è la resezione nella zona posteriore dei pilastri diaframmatici e nel seno pericardio-diaframmatico; a destra è bene procedere dall'avanti all'indietro, dopo aver aperto il pericardio e identificata la vena cava inferiore e l'esofago incisione al diaframma deve passare all'esterno della vena cava inferiore. A sinistra il diaframma è reciso dopo aver identificato l'esofago e l'aorta.

VI° tempo. **Ricostruzione del diaframma.** Il piano diaframmatico residuo è costituito da una parte più o meno ampia di peritoneo e da aree periferiche di muscolo. Si cerca innanzitutto di suturare le piccole brecce. È necessario ricostruire il piano in modo da evitare l'ernia diaframmatica post-operatoria. Soltanto in quel caso a destra il piano rappresentato dal peritoneo è abbastanza solido ed è sufficiente passare dei punti in Vicryl ancorati ai bordi. Negli altri casi e sempre a sinistra è necessario porre una protesi; può essere usata una rete in Vicryl o in Prolene o una lamina impermeabile di Goretex, ancorata al diaframma residuo o alla parete toracica con dei punti pericostali. È preferibile la rete se il peritoneo è stato chiuso completamente e non vi è pericolo che il sangue del cavo pleurico scenda in addome. Se restano orifizi o

se manca gran parte del diaframma o del peritoneo è preferibile il Goretex che è impermeabile.

VII° tempo ***Ricostruzione del pericardio***. L'asportazione estesa del pericardio espone al pericolo di una lussazione cardiaca. La ricostruzione pericardica è ottenuta con un tratto di rete di Vicryl o di Prolene fissato ai bordi del pericardio residuo con punti staccati o con una sutura continua interrotta ogni tanto; possono essere usati dura madre liofilizzata o Goretex sottile, fessurato per evitare il tamponamento. La ricostruzione del pericardio deve essere sempre fatta a destra, mentre a sinistra è preferibile ma non essenziale.

VIII° tempo ***Pneumonectomia***. Se si ritiene necessario perché le 2 pleure sono fuse in un'unica corazza fissa al polmone o perché vi sono nodi neoplastici sulla pleura viscerale, si procede alla pneumonectomia secondo la tecnica abituale seguita dalla linfadenectomia ilare e mediastinica.

Se si constata che la neoplasia è oramai sconfinata sulla parete toracica o ha invaso gli organi mediastinici o sottodiaframmatici, l'intervento non potrà essere radicale. In questi casi si valuterà caso per caso se è opportuno e possibile risparmiare il polmone.

IX° tempo ***Lavaggio, revisione del cavo, accurata emostasi e posizionamento di un drenaggio***.

Terminato l'intervento prima di chiudere il cavo è opportuno effettuare una serie di lavaggi della cavità pleurica. Si adotta lo schema [(a) fisiologica + betadine; (b) fisiologia + perossido d'idrogeno; (c) fisiologica] che viene ripetuto per tre volte. Successivamente si consiglia di controllare accuratamente l'emostasi della vasta superficie cruentizzata. Il drenaggio (Argyle 32 Ch.) viene lasciato chiuso ed i liquidi evacuati mattina e sera: a seconda della quantità si giudicherà se lasciarlo per 2 o più giorni. Se il mediastino si sposta dal lato sano, il tubo può essere lasciato a caduta per controllo radiografico quotidiano. Se il paziente si anemizza, verrà trasfuso durante il periodo postoperatorio.

c) La **Pleurodesi** consiste nella fusione della pleura parietale con la pleura viscerale ed ha lo scopo di evitare l'accumulo di liquido o di aria che si può verificare a seguito di processi patologici intratoracici. Viene perciò riservato sia per il trattamento dei versamenti massivi o recidivanti, neoplastici e benigni che per evitare le recidive di pneumotorace.

Aspetti tecnici

Nel corso degli anni sono state impiegate diverse sostanze come agenti sclerosanti tra cui talco farmaci antineoplastici (bleomicina mitomicina mostarde azotate, tiothepa), antibiotici (tetraciline, doxiciclina, minociclina), citochine (interferone alfa e beta, IL-2, TGF-alfa) ma solo alcuni hanno dimostrato la loro validità ⁽⁴⁶⁻⁵⁵⁾.

Il pleurodetico ideale dovrebbe innanzitutto indurre una sinfisi duratura, essere poco costoso (tenuto conto del suo uso palliativo), scevro da effetti collaterali, maneggevole, eventualmente riutilizzabile e di facile reperimento sul mercato

(poiché tetracicline e *Corynebacterium parvum* non sono facilmente reperibili). Queste caratteristiche sono tutte rintracciabili nel talco, che è un silicato di magnesio con particelle di dimensioni inferiori a 50 μm , sterilizzato con raggi g a calore secco o con ossido di etilene. ⁽⁵⁶⁾

Per la pleurodesi toracoscopica da MPM se ne somministrano 4-5g mentre solo 2g nel pneumotorace recidivante. L'importanza delle dimensioni delle particelle non inferiori a 10 μm è dovuto principalmente al fatto che si deve evitare disseminazione extrapleurica ed effetti sistemici. Esso determina un'irritazione delle superfici pleuriche cui consegue un'inflammazione acuta locale con precoce accumulo di polimorfonucleati neutrofili e distruzione delle cellule mesoteliali, meccanismo del tutto aspecifico simile a quello che si osserva nella cicatrizzazione delle ferite. ⁽⁵⁷⁾

Tecnica d'esecuzione

L'insufflazione di talco viene effettuata a conclusione dell'indagine endoscopica, dopo aver completato l'aspirazione del liquido, eliminando eventuali aderenze, per ottenere una cavità completamente libera. La distribuzione deve essere omogenea anche sulle aree di pleura sana. Per dominare la sensazione algogena è necessario utilizzare una tecnica di analgesia-sedazione che preveda una anestesia locale e l'uso di analgesici sistemici e sedativi anche nelle ore successive all'intervento. Viene quindi posizionato un drenaggio pleurico di calibro sufficientemente grande (28-32F) collegato con un sistema a raccolta di liquido con valvola ad acqua che deve rimanere in sede per alcuni giorni (almeno 3) fino al completo esaurimento dell'essudazione (<100ml/24h di versamento) con pressioni d'aspirazione

medio-alte (-30/40cmH₂O) in modo da tenere efficacemente adesi i due foglietti pleurici e rimuovere i prodotti dell'intensa infiammazione.

Controindicazioni

valgono le controindicazioni generali della toracosopia:

- coagulopatie gravi;
- insufficienza respiratoria ipercapnica;
- cardiopatia ischemica con infarto avvenuto da meno di tre mesi;
- aritmia cardiaca instabile ⁽⁵⁸⁾

Attualmente si preferisce effettuare una pneumonectomia extrapleurica come trattamento d'elezione e lasciare alla pleurectomia/decorticazione un ruolo di palliazione al fine di garantire una espansione polmonare residua ed alleviare i sintomi di dispnea e dolore toracico ⁽⁵⁹⁾.

Tuttavia in un recentissimo lavoro pubblicato da Raja MF et al. ⁽⁴⁵⁾ hanno messo a confronto la EPP e la P/D in un campione di 663 pazienti i cui risultati dimostravano che sebbene la EPP sia un intervento ad alto tasso di mortalità e di complicanze a breve termine, ha una percentuale di recidive loco regionali maggiore rispetto alla P/D. Accanto a questo dato, l'outcome e la compliance dei pazienti erano migliori nella P/D. In virtù di questi dati così ottenuti, ad oggi si preferisce, quando possibile, ricorrere alla pleurectomia/decorticazione piuttosto che alla pleuro-pneumonectomia.

Ogni paziente che si appresta a eseguire l'intervento chirurgico viene valutato dal punto di vista respiratorio e cardiovascolare attraverso:

| | |
|-------------------------------------|---------------------------|
| Ecocardiogramma; | Test da diffusione di CO; |
| Prove di funzionalità respiratoria; | TC/PET; |
| Emogasanalisi; | RMN; |

Criteria di esclusione per l'intervento chirurgico sono i seguenti

- Volume di flusso espiratorio forzato nel primo secondo < 1L;
- Presenza di DLCO e FEV1 residui < rispetto alla metà del teorico
- PCO₂ pre-operatoria > 45 mmHg;
- PO₂ < 65 mmHg;
- Frazione di eiezione del ventricolo di sx < 45%;
- Presenza di ipertensione polmonare;
- Indice di Karnofsky < 70 (*vd Appendice A*);
- Condizioni cliniche del soggetto giudicate insoddisfacenti;
- Presenza di neoplasia allo stadio IV;

Controindicazioni all'intervento chirurgico

- Storia di aritmia instabile;
- Infarto del miocardio negli ultimi 3 mesi

Le complicanze del trattamento chirurgico sono notevoli. Butchart et al. nel 1976 hanno riportato una mortalità peri-operatoria del 31% in pz sottoposti a EPP senza trattamento chemioterapico neoadiuvante. Nelle recenti revisioni sono stati dimostrati tassi di mortalità peri-operatoria tra 4-15% in pz sottoposti a EPP senza trattamento chemio e radioterapico neoadiuvante. Nonostante questa riduzione la morbilità rimane elevata con un tasso di complicanze post-operatorie del 60%. ⁽⁶⁰⁻⁶²⁾

| Complicanze | | Peri-operatorie | Post-operatorie |
|-----------------|--|-----------------|-----------------|
| Tecniche | Deiscenza del patch diaframmatico | | X |
| | Chilotorace | | X |
| | Emorragia intratoracica | X | X |
| | Fistola bronco pleurica | | X |
| | Sepsi intracavitaria | | X |
| | Deiscenza della ferita periostale | | X |
| | Sindrome di Bernad-Horner | X | |
| | Paralisi corde vocali | X | |
| Cardiovascolari | Fibrillazione Atriale | X | X |
| | Spostamento mediastinico improvviso con tamponamento | | X |

| | | | |
|-------------------|--|---|---|
| | cardiaco | | |
| | Insufficienza ventricolare acuta destra | | X |
| | Arresto cardiaco | | X |
| | Forame ovale pervio | | X |
| | Ipertensione polmonare | | X |
| | Ictus | X | X |
| | Trombosi venosa profonda | | X |
| Respiratorie | Polmoniti | | X |
| | ARDS | | X |
| | ALI | | X |
| | Pneumotorace contro laterale | | X |
| Gastrointestinali | Pseudo-ostruzione | | X |
| | Ulcera gastrica | | X |
| | Perforazione esofagea | | X |
| Infettive | Sepsi | | X |

Tabella II: Rappresentazione delle complicanze dell' intervento chirurgico di EPP

Trattamento Radioterapico

La radiosensibilità delle cellule del mesotelioma è modesta. L'efficacia della radioterapia nel trattamento del MPM è limitata dalla natura diffusiva del tumore e dalla radiosensibilità delle strutture adiacenti. I limiti di radiazione per le strutture vitali adiacenti sono:

| | |
|-------------------------|-----------------|
| polmone (20Gy); | cuore (45Gy); |
| fegato (30Gy); | esofago (50Gy); |
| midollo spinale (45Gy); | |

Il successo della sola radioterapia nel trattamento del MPM è stata dimostrata in un ristretto gruppo di pazienti. Un efficace palliazione richiede delle dosi di radiazione superiori a 40Gy. In particolare è stato dimostrato che una dose di 54Gy (range 45-54Gy) a seguire una pneumonectomia extrapleurica è molto efficace. Il bersaglio di tale radioterapia è costituito dall'intero emitorace malato, includendo le cavità pleuriche, la toracotomia e il sito di incisione per il tubo di drenaggio ⁽⁶³⁻⁶⁵⁾.

Trattamento Chemioterapico

La sensibilità alla chemioterapia del mesotelioma è modesta. Anche se la malattia può essere tenuta localmente sotto controllo, molti pazienti sviluppano metastasi sistemiche. La chemioterapia può essere effettuata prima o dopo un trattamento chirurgico curativo ⁽⁶⁴⁻⁷⁰⁾. Accanto a questi aspetti può essere effettuata a livello intracavitario in sede di approccio chirurgico per rafforzarlo e migliorarlo al tempo stesso ⁽⁶⁹⁾.

Possiamo perciò distinguere tra le seguenti forme di approccio chemioterapico:

- Chemioterapia adiuvante — 183 pazienti sono stati trattati con EPP, e a seguire un trattamento RT ed uno chemioterapico (doxorubicina, cyclophosphamide, and cisplatino per 4 fino a 6 cicli). A seguire sono stati effettuati follow-up ad intervalli di 13 mesi e la sopravvivenza globale a 2 ed a 5 anni era rispettivamente del 36% e 14%. Fattori associati con una favorevole prognosi includevano epitelioide istologia, margini di resezione indenni (R0), e assenza di coinvolgimento linfonodale extrapleurico.
- Chemioterapia neoadiuvante — Un trial multicentrico di fase II ha valutato il ruolo della chemioterapia neoadiuvante prima dell'esecuzione di EPP e RT. A tutti i 77 pazienti è stato precedente confermata sia istologicamente sia radiologicamente uno stadio di malattia di grado I, II, III MPM. Solo 57 pazienti (74 %) hanno completato tutti i 4 cicli di chemioterapia con pemetrexed e cisplatino e sottoposti successivamente a trattamento chirurgico. Tutti i 54 pazienti hanno eseguito con successo EPP, mentre 44 pazienti, di cui solo 40, hanno portato a termine il trattamento radioterapico, alla dose di 54Gy. Riguardo i pazienti che hanno completato con successo tutto il ciclo di trattamento, la sopravvivenza mediana è stata di 29 mesi e la percentuale di sopravvivenza a due anni del 61%.
- Chemioterapia intracavitaria — La chemioterapia intracavitaria intraoperatoria è stata sperimentata per rafforzare il controllo locale della malattia. In una serie di 92 pazienti una perfusione intracavitaria ipertermia con cisplatino (225 mg/m^2) è stata eseguita in seguito a EPP. Tuttavia è stata riscontrata la ripresa di MPM in 47 pazienti (51%) di cui 16 manifestavano ripresa ipsilaterale (17%).

Nessun chemioterapico considerato singolarmente si è rivelato efficace nell'aumentare la sopravvivenza del paziente. Difatti, almeno tre diversi studi clinici hanno sancito la superiorità, in termini di sopravvivenza, di una chemioterapia basata sulla combinazione cisplatino-altro chemioterapico rispetto a una chemioterapia con singolo agente chemioterapico.

In virtù di queste considerazioni si è passati a un approccio costituito da più chemioterapici (almeno 2). Numerosi studi clinici si sono susseguiti nel tempo nel dimostrare quale fosse la migliore associazione chemioterapica. Tra questi ricordiamo quelli che prevedevano le seguenti associazioni:

| Gruppo di ricerca | 1° Chemioterapico | 2° Chemioterapico | 3° Chemioterapico | % di risposta |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------|
| Solheim et al. | Metotrexate | Leucovorin | | 37% |
| Chahinian et al. | Cisplatino | Doxorubicina | Mitomicina C | 21% |
| CALGB | Cisplatino | Doxorubicina | | 13% |
| CALGB | Cisplatino | Mitomicina C | | 13% |
| Ardizzoni et al. | Interferon | Doxorubicina | | 29% |
| Byrne et al. | Cisplatino | Gemcitabina | | 48% |
| Hughes et al. | Cisplatino | Pemetrexed | | 50% |

Tabella III: gruppi di ricerca e relativi chemioterapici sperimentati

Particolarmente efficace si è rivelata l'associazione tra cisplatino e pemetrexed che ha dato delle percentuali di risposta pari al 50%.

Quest'ultimo è un chemioterapico appartenente alla famiglia degli agenti antifolati in grado di andare ad inibire gli enzimi Timidilato Sintetasi, Diidrofolato Reduttasi e Glicinamide Ribonucleotide Formiltransferasi. Gli effetti collaterali di questo farmaco possono essere minimizzati con la supplementazione di acido folico e vitamina B12 a concentrazioni < 400µg, che non ne riduce l'efficacia, ma sembra addirittura che l'aumentano. Accanto alla miglior percentuale di risposta quello che sorprende è la variazione della sopravvivenza mediana. Vogelzang NJ et al. hanno comparato l'efficacia della combinazione cisplatino + pemetrexed rispetto l'uso del solo cisplatino (+ placebo). I pazienti che ricevevano la prima associazione avevano una sopravvivenza mediana di 12.1 mesi rispetto ai 9.3 mesi del gruppo di controllo, e la percentuale di risposta era rispettivamente del 41,3% rispetto al 16,7%. ⁽⁷³⁻⁸¹⁾

Infine è giusto ricordare che grazie all'ampliamento della conoscenza sulla biologia e sull'immunoistochimica del MPM sono stati introdotti nella pratica clinica agenti farmacologici per *target therapy* e farmaci biologici tra i quali ricordiamo:

Il Sunitinib, un inibitore multi-bersaglio tirosin-kinasico (TKI) del VEGF-R e del PDGF-R; L'AZD2171, un altro TKI, a somministrazione orale, attivo contro il VEGFR1-2;

NGR-hTNF è un nuovo agente anti vascolare che è stato geneticamente ricavato dall'unione di un dominio N-terminale del TNF-alfa umano con la catena C-terminale del *tumor-homing peptide* (NGR) che si lega selettivamente ad un recettore di superficie cellulare espresso dalle cellule endoteliali di recente formazione ad opera del tumore, incluse le cellule endoteliali espresse

dal MPM. In modelli preclinici, l'NGR-hTNF ha mostrato una attività anti-tumorale sia a basse che ad alte dosi.

Il Vandetanib (ZD6474) un inibitore selettivo del VEGFR-2, VEGFR-3, RET and EGFR;

Gli inibitori dell'EGFR. Si è visto infatti che il MPM tende a sovra esprimere EGFR e tramite un trattamento con EGFR TKI gefitinib si aveva una riduzione dose-dipendente dell'espressione superficiale di EGFR e quindi della crescita cellulare. Successivamente il trattamento combinato erlotinib+bevacizumab ha dimostrato che solo alcuni istotipi di MPM possedenti la mutazione per EGFR erano in grado di rispondere a tale trattamento.

Gli inibitori dell'Histone Deacetilasi (HDAC) [Belinostat e Vorinostat] che per mezzo di una acetilazione del complesso istonico provocano un arresto del ciclo cellulare e l'attivazione di geni oncosoppressori responsabili della morte della cellula. Sono inoltre in grado di modulare effetti anticancerogeni tramite l'acetilazione di numerose proteine non istoniche;

La Ranpirinase, un farmaco appartenente alla superfamiglia degli inibitori delle ribonucleasi, ha mostrato un'efficacia terapeutica nei pazienti affetti da mesotelioma in combinazione con doxorubicina ;

Il Bortezumib, inibitore del complesso enzimatico del proteasoma.

Tuttavia è bene ricordare che sebbene sia stata dimostrata una qualche attività clinica, a questi farmaci è riservato attualmente un posto nelle chemioterapia di terza linea o a protocolli sperimentali in cui non si può dimostrare una chiara randomizzazione di gruppi dei pazienti. ⁽⁸²⁻⁸⁹⁾

| Agente | N° | RR | CB | mTTP (mos) | mSV (mos) |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------------|------------------|
| Sorafenib | 31 | 4% | 64% | 3.6 | 14.6 |
| Sunitinib | 22 | 27% | NR | 3.7 | 8.2 |
| AZD2171 | 45 | 9% | 42% | 3.0 | 10.0 |
| Erlotinib + Bevacizumab | 21 | 0 | 50% | 2.2 | 5.8 |
| Ranpirnase + Doxorubicina | 65 | 13% | 71% | NR | 10.5 |
| Belinostat | 13 | 0 | 15% | 1 | 5 |
| NGR - hTNF | 43 | 0 | 44% | 2.8 | NR |

Tabella IV: N°: numero di pazienti; RR: percentuale di risposta; CB: beneficio clinico (parziale risposta + stabilità della malattia); mTTP: tempo medio di progressione; mSv: sopravvivenza mediana; mos: mesi; NR: non riportati o non pervenuti.

2 SEZIONE SPERIMENTALE

2.1 Premessa

Per quello che riguarda la sperimentazione di nuovi protocolli terapeutici, il problema presente fino a qualche anno fa, era dato dall'impossibilità di avere un modello animale in cui ricreare una condizione compatibile con il mesotelioma pleurico maligno.

Di conseguenza i trattamenti sperimentali erano rivolti tutti a pazienti in fase avanzata con ancora una buona funzionalità d'organo residua.

Successivamente sono stati studiati e sviluppati diversi modelli animali, immuno-compromessi ⁽⁹⁰⁾, partendo dall'iniezione di cellule di mesotelioma umano per via transcutanea in sede pleurica; tuttavia, tali modelli non riflettevano la situazione clinica dei pazienti con malattia pleurica e con sistema immune integro.

Infine nel 2006 Kane et al. ⁽⁹¹⁾ elaborarono con successo un modello animale, immunocompetente, in cui veniva ricreata la malattia pleurica ed in cui si potevano sperimentare nuovi approcci terapeutici; tale modello è stato valutato e utilizzato successivamente dal gruppo di ricerca diretto dal prof. Weder dell'Ospedale Universitario di Zurigo nel quale ho lavorato per oltre un anno. ⁽⁹²⁾

2.2 Obiettivi del progetto di studio

Prima parte: L'obiettivo è stato lo sviluppo e elaborazione di film polimerici per il rilascio di farmaci antitumorali e l'iniziale valutazione di efficacia e tossicità dei film di ialuronato e chitosano contenenti cisplatino sulla recidiva tumorale di MPM in un modello murino.

Seconda parte: L'obiettivo è stato quello di validare l'efficacia dei film polimerici con cisplatino e studiare l'effetto della combinazione cisplatino+pemetrexed sul volume della recidiva tumorale rispetto al solo cisplatino nello stesso modello murino di MPM.

Terza parte: quest'ultima parte del progetto sperimentale, ancora in corso, prevede uno studio farmacocinetico di confronto tra film polimerici caricati con cisplatino e soluzione di cisplatino somministrata per via endovenosa e intrapleurica in un modello ovino.

2.3 MATERIALI E METODI

I protocolli di studio sono stati approvati dal comitato etico veterinario locale (protocolli N° 39/09; 23/10; 92/11 rispettivamente) e gli esperimenti sono stati condotti secondo i requisiti richiesti dalla normativa nazionale (D.Lgs. 116/1992) nonché dalla legge regionale (L.R. n° 020/2002, Regione Emilia Romagna e relative modifiche).

2.31 Animali e linee cellulari

Il modello animale murino per lo sviluppo e lo studio sul mesotelioma pleurico maligno fu utilizzato per la prima volta da Kucharczuk nel 1995 ed estesamente studiato dal gruppo di ricerca diretto dal prof. Weder dell'Ospedale Universitario di Zurigo⁽⁹⁰⁻⁹⁴⁻⁹⁵⁾.

Ratti maschi Fisher 344 del peso di 280-300g (in media 291g) sono stati forniti dalla *Charles River Laboratories* (23885 Calco, LC, Italia).

Non appena arrivati, i ratti sono stati distribuiti in apposite gabbie nello stabulario animale presente al Dipartimento di Farmacia dell'Università degli Studi di Parma (Area Parco delle Scienze), e mantenuti con uno schema giornaliero di 12h di luce e 12h di buio con cibo ed acqua a volontà.

La linea cellulare di mesotelioma pleurico maligno che è stata utilizzata negli esperimenti è IL-45. Tali cellule sono il risultato di una selezione di cellule tumorali derivate da mesotelioma peritoneale maligno asbesto-indotto in

modelli murini di ratti Fisher ⁽²⁶⁾. Le cellule sono state gentilmente donate dal laboratorio di ricerca dell'Ospedale Universitario di Zurigo.

Le cellule sono state coltivate in RPMI medium arricchito con glutammina 2mM, 10% siero fetale *calf*, 100 U ml⁻¹ di penicillina e 100 mg ml⁻¹ di streptomina e posizionate a 37°C, in incubazione a 5% di CO₂.

Prima di ogni serie di esperimenti, 1 milione di cellule sono state contate e risospese in 50 µl di soluzione di coltura a media crescita in provette dedicate che venivano poi poste in ghiaccio.

2.32 Farmaci e Film polimerici

La scelta dei materiali utilizzati per la formulazione dei film polimerici è ricaduta sul *chitosano* e *sodio ialuronato*, in ragione delle loro interessanti caratteristiche biofarmaceutiche. L'acido ialuronico, la cui struttura consiste nella ripetizione dell'unità disaccaridica di acido D-glucuronico e (1- β -3) N-acetil D-glucosamina ^[85], è ampiamente distribuito in natura, nelle cellule e nei tessuti dei mammiferi, in particolar modo nel liquido sinoviale, nell'umor vitreo e nel derma. Si ritrova anche in batteri, quali stafilococchi e streptococchi e attualmente questi ne rappresentano una buona fonte commerciale mediante l'uso delle biotecnologie. L'acido ialuronico ha una funzione fondamentale nell'organizzazione e nel mantenimento della struttura della matrice extracellulare, nella regolazione dell'adesione cellulare e nella morfogenesi ⁽⁸⁵⁾. Trattandosi di una molecola senza alcun potere immunogenico può essere un materiale ideale per la liberazione del farmaco. È stato utilizzato in differenti

forme farmaceutiche, quali: microsfele, idrogel, polimeri coniugati, polveri e impianti ⁽⁸⁵⁾. Rosato ha eseguito studi in vivo e in vitro usando una combinazione di Paclitaxel e ialuronato nel trattamento intra-vescicale del cancro superficiale della vescica, osservando un miglioramento significativo rispetto al convenzionale Paclitaxel, in termini di idrosolubilità, azione contro le cellule tumorali in vitro e biocompatibilità in vivo ⁽⁸⁶⁾. Il chitosano è un polimero naturale, con proprietà immunogeniche e muco-adesive che può essere utilizzato al fine di migliorare l'efficacia terapeutica del farmaco, sia aumentando il tempo di contatto nel sito d'azione, sia migliorando la penetrazione attraverso la barriera mucosa mediante l'apertura delle giunzioni serrate (*tight junctions*) ⁽⁸⁷⁾. Il suo potenziale come sistema di rilascio dei farmaci è già stato descritto ampiamente nella letteratura scientifica. Jauhari, tra gli altri, ha sviluppato un sistema di liberazione in situ per il rilascio di Paclitaxel composto da un gel a base di chitosano ⁽⁸⁸⁾. Il chitosano possiede caratteristiche intrinseche di stabilità e lenta degradazione anche in vivo, mentre il sodio ialuronato ha opposte proprietà di rapida gelificazione e dunque dissoluzione in mezzo acquoso. Per entrambi i materiali è documentata una pressoché nulla tossicità in vivo ^(89, 90). La formulazione di film a doppio strato, ovvero di uno strato di chitosano e uno di ialuronato entrambi "caricati" con farmaco, applicati direttamente a contatto della superficie pleurica, ha risposto quindi all'esigenza di raggiungere concentrazioni locali adeguate di farmaco immediatamente dopo l'intervento citoreducente (strato di ialuronato) poi mantenute più a lungo nel tempo (strato in chitosano). Questi supporti sono apparsi anche facilmente riproducibili industrialmente, con evidenti ripercussioni positive sui costi.

La scelta del chemioterapico è ricaduta dapprima sul *cisplatino* quale farmaco utilizzato in protocolli standard nella chemioterapia per MPM, efficace e disponibile. Dopo studi preliminari dei quali si riportano di seguito le notazioni salienti, si è eseguito pertanto un primo studio *in vivo* nel modello murino indicato con l'obbiettivo di verificare gli effetti dell'applicazione intrapleurica di film a base di chitosano e ialuronato, "caricati" con cisplatino, sulla riduzione del volume tumorale in un modello murino di MPM. In secondo luogo si sono valutati l'efficacia e la tossicità di questo trattamento in rapporto al modello di riferimento, cioè la semplice somministrazione intrapleurica di cisplatino in soluzione (attraverso analisi del sangue delle cavie in tempi differenti ed esami istopatologici degli organi prelevati durante l'autopsia).

I film polimerici (Figura) sono stati prodotti dai colleghi del Dipartimento Farmaceutico di Parma e le caratteristiche dei lotti prodotti registrate consentendo la rintracciabilità della provenienza di ogni film.

La tecnica di stesura in strato sottile seguita da essiccamento è stata scelta considerando questo metodo maggiormente applicabile a un'eventuale scale-up industriale rispetto alla semplice evaporazione di solvente in stampi di forma predefinita.

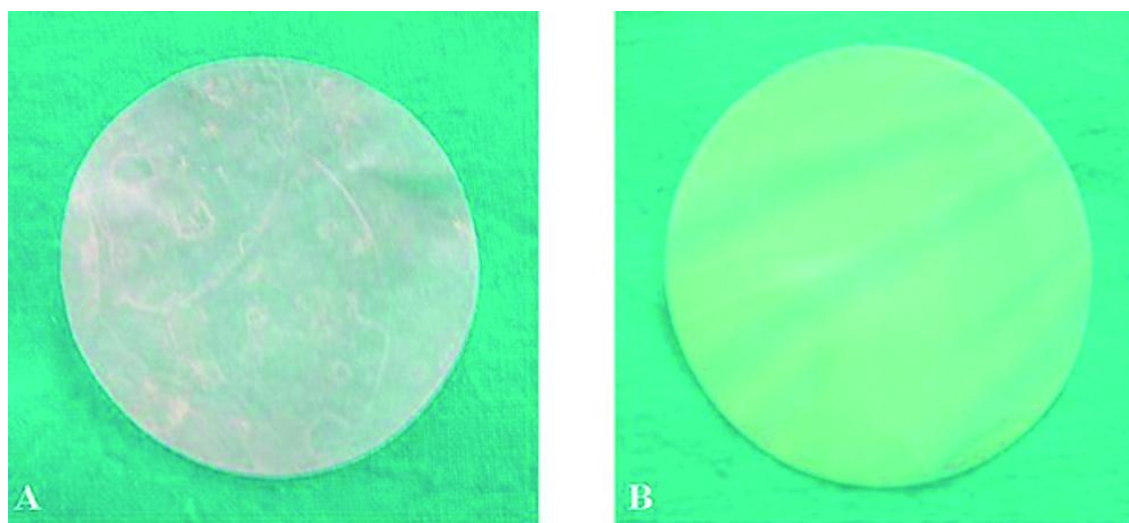
I plasticizzanti (Sorbitolo, PEG1000s e PEG200) e l'agente filmogeno (PVA83400) sono stati preventivamente disciolti in 15 ml di acqua distillata riscaldata a circa 80°C e sotto agitazione magnetica per permettere una rapida dissoluzione del PVA. Alla soluzione limpida e raffreddata a temperatura ambiente è stato successivamente aggiunto il farmaco (*cis*-diammindicloroplatino, puro al 99,9%) e, dopo qualche minuto di agitazione magnetica, il polisaccaride (sodio ialuronato, lotto HPt o chitosano, lotto CPt).

Nel caso dei film contenenti chitosano per consentire la dissoluzione del polisaccaride è stata aggiunta una quantità di acido acetico tale da raggiungere una concentrazione pari all'1% v/v. La sospensione è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 12-18h fino a completa dissoluzione del farmaco e del polisaccaride. Per eliminare le bolle d'aria eventualmente presenti all'interno della soluzione viscosa ottenuta, essa è stata posta per breve tempo in un comune bagno ad ultrasuoni. Le soluzioni viscose deposte in strato sottile (altezza di deposizione di 2 mm) sono state essiccate in stufa alla temperatura di 55°C per circa 6h, fino a completa asciugatura. La deposizione è avvenuta su una lastra di vetro ricoperta con un film sottile di poliestere per favorire il distacco e la successiva manipolazione dei film prodotti.

Film polimerici prodotti con la stessa procedura e con gli stessi eccipienti ma privi di farmaco sono stati prodotti per effettuare esperimenti di confronto con i film caricati di cisplatino (lotti CB e HB). Nei film "caricati" con cisplatino la sua concentrazione era pari allo 0,5%. Film combinati sono stati ottenuti mediante il semplice contatto per 10-15 minuti di due differenti film polimerici sotto una pressione pari a 10 kg, facendoli diventare così adesivi e permettendo di poterli tagliare insieme. Per gli esperimenti in vivo dischetti di film di 4,5 cm di diametro sono stati tagliati e messi in un imballaggio termo-sigillato fino al loro uso.

La stessa dose di cisplatino, approssimativamente 0,9 mg, in soluzione con 1,5 ml di NaCl allo 0.9% (volume proporzionato alla capacità media di una cavità toracica di ratto privata di un polmone), è stata utilizzata per l'applicazione intrapleurica.

Figura 10 Film polimerici: A) ialuronato e B) chitosano.



Rilascio di cisplatino dai film polimerici

Per lo studio del rilascio del farmaco antitumorale dai film polimerici “caricati”, strisce di film di dimensione 70 x 10 mm sono state tagliate, pesate e poste in contenitori di vetro ambrato (diametro: 30 mm) contenenti 15 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%, filtrata su filtri di acetato di cellulosa con aperture di 0,45 μ m e degasata). I contenitori sono stati posti in agitatore dotato di bagno riscaldante posto a 37°C. Campioni da 1 ml sono stati prelevati a intervalli regolari prefissati avendo cura di reintegrare il mezzo di dissoluzione. La concentrazione di cisplatino è stata determinata per cromatografia liquida, applicando il metodo prescritto dalla Farmacopea Europea.

I parametri cromatografici utilizzati sono stati i seguenti:

1. colonna cromatografica di lunghezza 25 cm, diametro interno 4,6 mm, impaccata con sferette di gel di silice a scambio anionico forte;
2. fase mobile metanolo/soluzione acquosa NaCl 0.9%, 90:10;
3. velocità di flusso in fase mobile 1,2 ml/min;
4. rilevazione spettrofotometrica nell'ultravioletto (λ = 220 nm);

5. iniezioni di campione da 20 μ l.

Nel caso dei film a base di sodio ialuronato è stato misurato un rilascio di farmaco rapido (> 80% dopo 30 min) che procede di pari passo con la dissoluzione del film polimerico, essendo il sodio ialuronato solubile in soluzione fisiologica, a contatto della quale rapidamente gelifica e dissolve. Il rilascio è completo dopo circa 24 ore dall'inizio della dissoluzione.

Il rilascio del cisplatino dai film a base di chitosano è molto più lento e avviene nell'ordine di parecchi giorni (poco più del 20% in 8 giorni). Essendo il chitosano insolubile a pH neutro, era atteso un maggiore controllo del rilascio da parte di questi film, tuttavia un rallentamento di tale entità fa sospettare un'interazione importante tra farmaco e polisaccaride.

Per la seconda parte dello studio, solo un tipo di film polimerico è stato utilizzato, quello contenente acido ialuronico come maggior componente. Alcol polivinilico, glicole di polietilene, e sorbitolo sono stati usati come agenti plastificanti e formanti il film.

La tecnica di stesura in strato sottile seguita da essiccamento è stata scelta considerando questo metodo applicabile a un'eventuale scale-up industriale rispetto alla semplice evaporazione di solvente in stampi di forma predefinita.

Sono poi stati realizzati film a base di acido ialuronico in cui sono stati caricati contemporaneamente due farmaci antitumorali cisplatino (CisPt) e pemetrexed (Px).

Per quanto riguarda i film costituiti da ialuronato e pemetrexed (HPx), ne sono stati preparati due tipi: uno caricato con un titolo teorico di pemetrexed al 2% p/p adatto ad una somministrazione in dosi di 10 mg/kg (HPx 10mg/Kg) e uno caricato con un titolo teorico di pemetrexed al 20% p/p adatto ad una

somministrazione in dosi pari a 100mg/kg (HPx 100 mg/kg) equivalenti alla dose somministrata in corso di chemioterapia nell'uomo (pari rispettivamente a 50 mg/m² e 500 mg/m² in base ad uno studio francese).⁽⁹⁶⁾

La dimensione dei film da utilizzare, corrispondente a una precisa dose di farmaco, veniva calcolata sulla base del peso in g del singolo ratto randomizzato in modo da rendere la dose del farmaco personalizzata al bersaglio (così come verrebbe realizzato per l'uomo).

Tutti i film, per l'esecuzione degli esperimenti in vivo, sono stati tagliati a foglia di dischi del diametro di circa 4,5 cm e posti in buste termo-sigillate fino al loro utilizzo.

La composizione per 80 ml di soluzione filmogena usata per produrre i film è riportata in Tabella V.

Tabella V: Composizione della soluzione filmogena per 80 ml

| Sostanze | HB | HPt | HPx (10mg/kg) | HPx (100mg/kg) | CPx (10mg/kg) |
|------------------|-----|------|------------------|-------------------|------------------|
| | G | G | g | g | g |
| Chitosano | | | | | |
| 7cP | - | | | | 0.8 |
| Chitosano | | | | | |
| 103cP | | | | | 2.4 |
| Ialuronato | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| PVA 84300 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| PEG 200 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| PEG 1000s | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| Sorbitolo | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| Cisplatino | | 0.03 | | | |
| Pemetrexed | | | 0.11 | 1.3 | 0.11 |

Tabella V: HB = ialuronato senza farmaco; HPt = ialuronato + chitosano; HPx = ialuronato + pemetrexed; CPx = chitosano + pemetrexed.

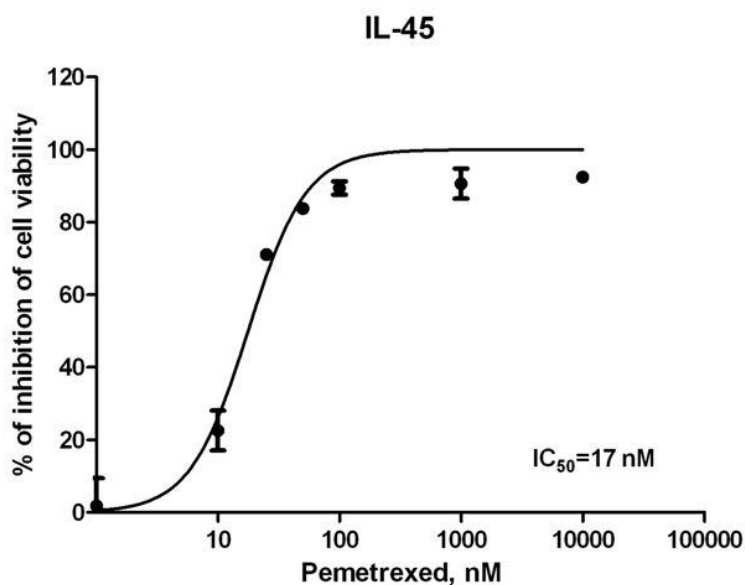
Combinazione di due tipi di film

I film doppi (HPx-HPt) utilizzati per gli studi in vivo sono stati ottenuti sovrapponendo i due film preformati e applicando una pressione (circa 5 kg, per 30 minuti) grazie alle loro proprietà leggermente adesive. Una volta uniti i film vengono conservati in camera climatizzata in condizioni di atmosfera controllata (25°C, 60% UR, Branca Idealair, Mercallo, Italia).

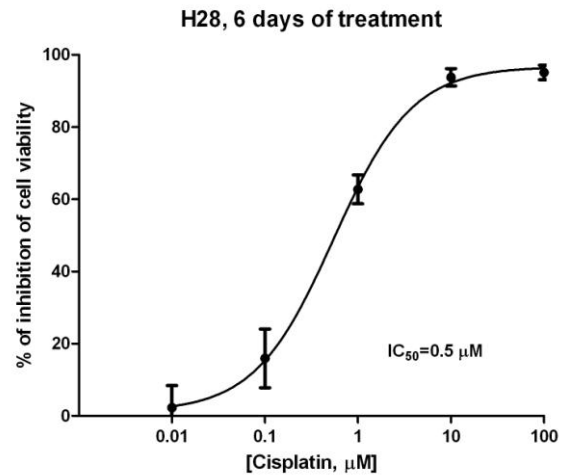
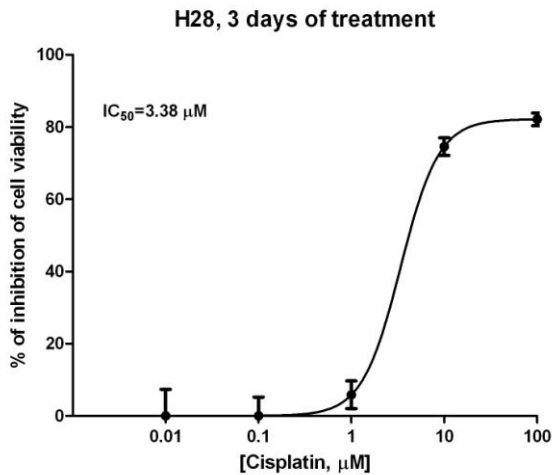
2.33 Studi in vitro

Prima di procedere allo studio in vivo, sono stati condotti esperimenti in vitro mettendo a contatto la linea cellulare di IL-45 con i chemioterapici che abbiamo poi usato nei nostri esperimenti.

In particolare per il pemetrexed è stato riscontrato un valore di IC₅₀ pari a 17nM come mostrato dal grafico successivo; una risposta iniziale pari al 20% la si otteneva per una concentrazione pari a 10 nM, mentre il plateau lo si raggiungeva per concentrazioni approssimative di 100nM.



Al pari per il cisplatino abbiamo eseguito degli studi in vitro che dimostravano l'efficacia del farmaco sulle linee cellulari trovando valori di IC₅₀ pari a 3.38 μ M nel caso di 3 giorni di trattamento, ed una IC₅₀ pari a 0.5 μ M nel caso di 6 giorni di trattamento come riportato nei seguenti grafici:



Ricordiamo per completezza che l'IC₅₀ o concentrazione inibente è la concentrazione di un farmaco necessaria per inibire il 50% del bersaglio in esame (in questo caso la linea IL-45 di cellule mesoteliali).

L'IC₅₀ è perciò un parametro utilizzato per valutare l'efficacia di una sostanza nell'inibire il target ed è uno dei metodi comunemente usati nella ricerca farmacologica per misurare la potenza di un antagonista. Viene espressa secondo la seguente formula:

$$IC_{50} = \left[1 + \frac{[Substrato]}{K_m} \right] \times K_i$$

dove:

K_i è l'affinità di legame dell'inibitore

K_m è la costante di Michaelis-Menten

2.34 Studi di farmacocinetica

Studi preliminari di farmacocinetica sono stati svolti per valutare il destino dei farmaci pemetrexed e cisplatino dopo somministrazione di soluzioni per via intrapleurica o intravenosa.

Gli studi di cinetica sono effettuati somministrando una quantità definita di farmaco in soluzione attraverso la via di somministrazione prevista e andando a fare sei prelievi a tempi definiti nell'arco di un tempo di osservazione pari a 24 ore (rispettivamente a 30', 1, 2, 4, 8, 24h).

Sono stati condotti due studi di farmacocinetica, uno somministrando pemetrexed alla dose di 10 mg/kg e uno somministrando una dose 10 volte maggiore, 100 mg/kg di pemetrexed, in linea con l'unico studio, francese, recentemente presentato dal gruppo di lavoro di Grellier et al. ⁽⁹⁶⁾

Tali dosaggi equivalgono alla dose di pemetrexed somministrata per la chemioterapia nell'uomo che è calcolata in mg/m^2 (rispettivamente $50 \text{ mg}/\text{m}^2$ e $500 \text{ mg}/\text{m}^2$).

Px 10 mg/Kg

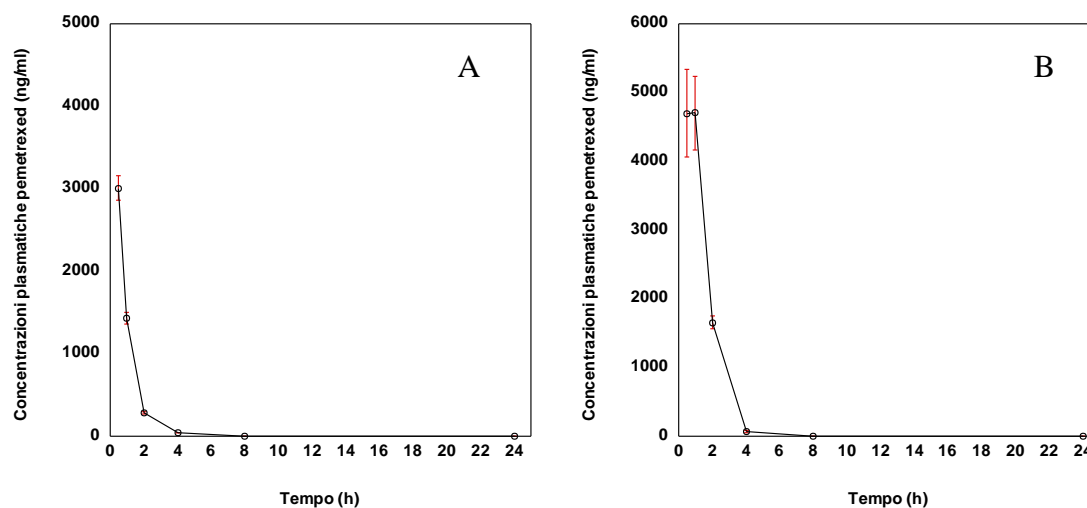


Figura 10 Profili plasmatici di pemetrexed 10mg/Kg dopo somministrazione EV (A) e IP (B)

Il pemetrexed somministrato endovena parte da concentrazioni plasmatiche minori rispetto a quello somministrato a livello intrapleurico, questo andamento insolito potrebbe essere dovuto alla rapida cinetica del farmaco che viene già eliminato prima del primo prelievo effettuato, nel quale si riscontrano concentrazioni minori di quelle somministrate. La discesa delle concentrazioni è comunque più rapida per la somministrazione endovena; all'ottava ora non c'è più farmaco in circolo, dopo somministrazione intrapleurica allo stesso tempo restano delle tracce.

Px 100mg/Kg

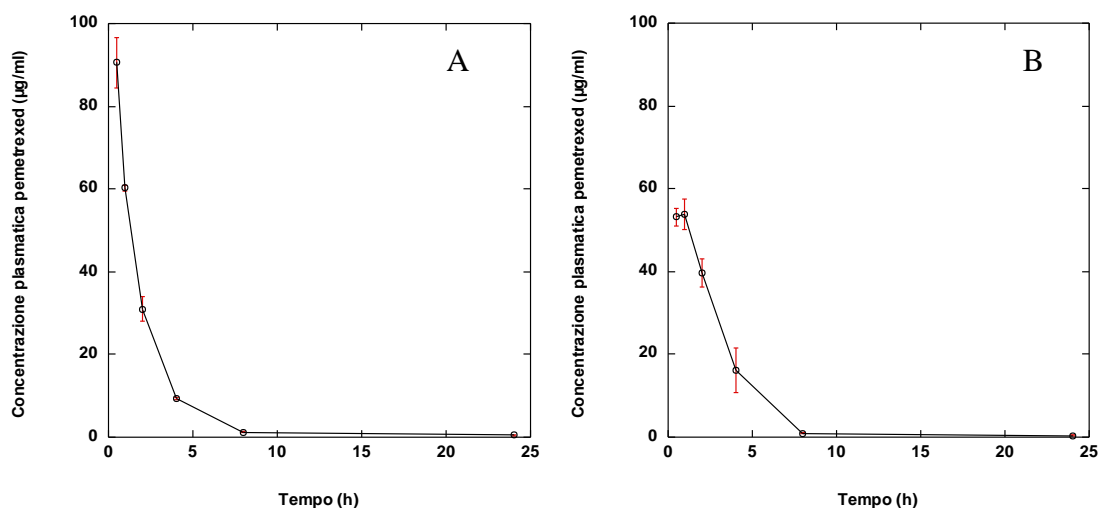


Figura 11 Profili plasmatici di pemetrexed 100mg/Kg dopo somministrazione EV (A) e IP (B)

Si evidenziano concentrazioni iniziali maggiori per la somministrazione EV rispetto a quella IP perché la distribuzione del farmaco dal compartimento pleurico al sangue ritarda la comparsa del farmaco nel plasma e ne limita il picco di concentrazione. Le concentrazioni del farmaco sono ancora abbastanza elevate dopo 30 minuti dalla somministrazione e scendono più rapidamente dopo la somministrazione EV in quanto la ripartizione tra compartimento pleurico e compartimento plasmatico per quanto rapida sostiene le concentrazioni per un tempo sufficiente a ritardarne la discesa. L'aumento di dieci volte della concentrazione del farmaco somministrato non cambia la cinetica: dopo l'ottava ora il farmaco è presente in tracce o assente. Per quanto riguarda la somministrazione IP in entrambi i dosaggi, si evidenzia

la presenza di un plateau iniziale delle concentrazioni dovuto al breve ritardo di passaggio del farmaco al compartimento plasmatico da quello pleurico.

CisPt IP 3 mg/Kg

Il cisplatino è stato valutato dopo somministrazione intrapleurica. Il farmaco è tuttavia anche in questo caso eliminato in maniera rapida dal torrente circolatorio nel corso delle prime 4 ore. Per i tempi successivi, la concentrazione plasmatica resta a concentrazioni modeste ma rilevabili fino anche alla ventiquattresima ora. Questo andamento è spiegabile con il fatto che il farmaco si lega alle proteine plasmatiche. Sono inoltre riportati i grafici di rilascio del cisplatino dai film di acido ialuronico. In quest'ultimo caso il rilascio del farmaco è più rapido. Intorno alla 7h è stato osservato un rilascio del 30% che arriva al 100% dopo 4gg. Il rilascio di farmaco dai film di ialuronato procede di pari passo con la dissoluzione del film polimerico, essendo lo ialuronato solubile in soluzione fisiologica a contatto con la quale rapidamente gelifica.

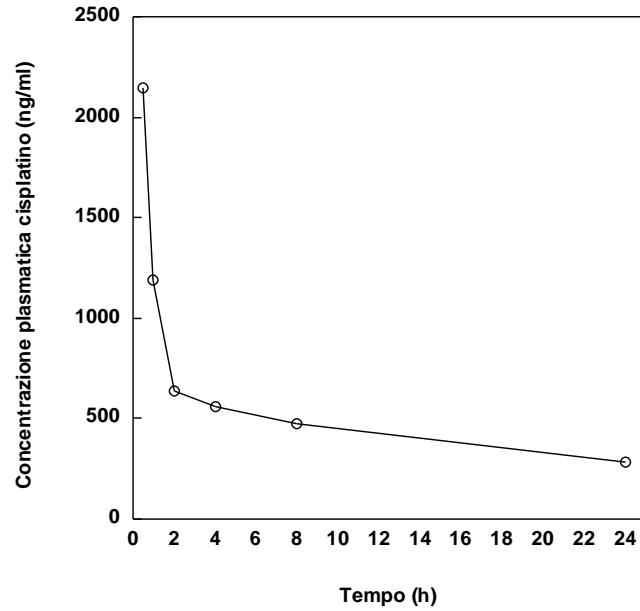


Figura 12 Profili plasmatici di cisplatino 3mg/Kg dopo somministrazione IP

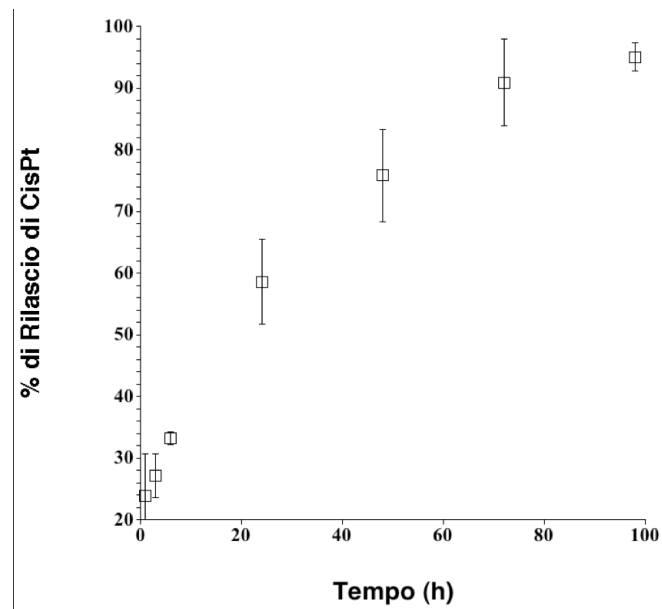


Figura 13 Rilascio di cisplatino da film di ialuronato (HPt) in soluzione isotonica a 37° C.

2.35 Gruppi di lavoro

Per il primo studio *in vivo*, 35 ratti sono stati assegnati in modo randomizzato a differenti gruppi di trattamento (descritti in tabella n.10). L'assegnazione avviene prima dell'inoculo delle cellule tumorali.

Tabella VI Gruppi di trattamento

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. GRUPPO A: controllo (nessuna terapia adiuvante dopo l'intervento chirurgico).2. GRUPPO B: film di chitosano.3. GRUPPO C: film di ialuronato.4. GRUPPO D: soluzione di cisplatino.5. GRUPPO E: film di chitosano "caricato" con cisplatino.6. GRUPPO F: film di ialuronato "caricato" con cisplatino.7. GRUPPO G: film a doppio strato (chitosano + ialuronato) "caricati" con cisplatino. |
|--|

● Fasi dello studio

Giorno 1: una sospensione di cellule di mesotelioma maligno viene inoculata in sede sub-pleurica attraverso una piccola toracotomia sinistra.

Giorno 7: in sede di inoculo si ritrova un unico nodulo tumorale di circa 6x5mm che viene resecato in maniera macroscopicamente radicale dopo pleuropneumonecemia sinistra, al fine di mimare la procedura chirurgica che si effettua nell'uomo; l'animale è quindi sottoposto al trattamento adiuvante proprio del gruppo di trattamento di appartenenza.

Giorno 14: gli animali vengono sacrificati e se ne esegue l'autopsia; l'intera emiparete toracica dal lato affetto viene asportata, e si misurano macroscopicamente lunghezza e larghezza della recidiva tumorale ; il campione viene inviato all'analisi anatomopatologica per determinarne microscopicamente la terza dimensione (spessore massimo) e analizzarne

l'istopatologia; si prelevano e inviano anche reni, fegato, cuore e polmone contro-laterale; si prelevano frammenti di tessuto tumorale e, quando presenti, i residui dei film.

- **Tecnica anestesiológica**

L'anestesia viene indotta mediante iniezione intraperitoneale di sodio pentobarbitale (Nembutal) alla dose di 50 mg/Kg. Vi era la necessità di due operatori, uno per trattenere il ratto in posizione declive (45°) impugnando la cotenna retronucleare, la coda e una delle zampe posteriori, e un secondo per completare l'immobilizzazione del secondo arto posteriore e per eseguire l'iniezione. Attenzione doveva essere posta a non iniettare in organi parenchimatosi tentando di mobilizzare l'ago di pochi gradi (se ciò fosse stato impedito o vi fosse stata resistenza l'ago sarebbe potuto essere accidentalmente infisso in un organo solido), né in vasi arteriosi o venosi (eventualità esclusa applicando una leggera aspirazione prima di iniettare, visualizzando l'assenza di aspirazione di sangue). In entrambi i casi si sarebbe dovuto procedere a ritirare parzialmente l'ago ripetendo poi la procedura.

Entro una decina di minuti il ratto appariva addormentato. Ci si assicurava riguardo allo stato di vita, valutando l'espansione respiratoria del torace e palpando il battito cardiaco sull'emitorace sinistro. Stringendo con decisione ma delicatezza la coda dell'animale tra due dita se ne valutava poi la sensibilità residua agli stimoli dolorosi, che doveva essere ovviamente nulla per procedere all'intervento: si attendeva fino alla totale assenza di movimenti di reazione allo stimolo. Solo a questo punto i riflessi dell'animale (tra cui il riflesso faringeo e

quello di chiusura glottica) potevano considerarsi sufficientemente inibiti da consentire l'intubazione orotracheale. La ventilazione meccanica era fondamentale per determinare l'espansione polmonare poiché questi animali non possiedono organi di compartimentazione dei visceri, come l'uomo: la presenza un'unica cavità cardio-bipolmonare avrebbe esposto entrambi i polmoni al collasso quando messa in comunicazione con la pressione atmosferica. Entrambi i polmoni venivano invece insufflati con aria a pressione positiva ($P >$ pressione atmosferica), ciclicamente immessa da un ventilatore meccanico per roditori collegato, ad animale già intubato, al catetere da intubazione.

Si regolavano il volume erogato e la frequenza di erogazione (volume corrente di 10mL/kg BW, a 75 atti/min), oltre alla possibilità di trasferire aria ambiente o aria arricchita di ossigeno (collegando o meno il ventilatore ad una fonte; di solito si forniva ossigeno al 100%).

L'intubazione oro-tracheale del ratto avveniva utilizzando un dispositivo finalizzato che permetteva di sospendere l'animale per i suoi denti incisivi superiori, tipicamente sporgenti, lasciandolo in decubito dorsale su di una superficie inclinata studiata per permettere una agevole visualizzazione dell'imbocco tracheale in cui introdurre il catetere per la ventilazione. L'apertura buccale veniva mantenuta dalla trazione esercitata in basso e in fuori sulla lingua per mezzo di una pinzetta atraumatica, con una conseguente migliore visualizzazione delle strutture faringee. La lingua veniva dunque "caricata" su una spatola e immobilizzata dalla base sul pavimento della cavità orale. Una fonte di luce posizionata a ridosso della superficie anteriore del collo del ratto

consentiva di discriminare, perché transilluminata, la trachea anteriormente all'esofago. Dopo questa identificazione si procedeva all'introduzione del catetere (un piccolo catetere di polietilene da infusione, di 16 Gauge, prestato all'uso).

Si mobilizzava dunque l'animale su un tappetino termoisolante in sughero; il contributo determinante all'omeostasi termica dell'animale derivava tuttavia dal calore emesso dalle lampade di illuminazione del tavolo operatorio, "puntate" sull'animale. Si controllava di aver eseguito correttamente l'intubazione come descritto e si fissava il collegamento al ventilatore meccanico. Si sconsigliava il ricorso, nel tentativo di addormentare animali poco responsivi ai farmaci narcotizzanti, a nuove iniezioni intraperitoneali di farmaco nei minuti/ore immediatamente successivi al primo fallito tentativo: per l'alto rischio di sovradosaggio con morte per arresto cardiorespiratorio .

La durata dell'anestesia era di circa due ore: un'ora per il risveglio parziale, tre perché si risvegliasse quasi completamente, pur rimanendo inerte, disorientato e assopito anche per diverse ore. Tale durata si è dimostrata più che sufficiente poiché, infatti, la durata media dell'intervento di inoculo e di pleuropneumonectomia era rispettivamente di 15 e 30 minuti.

Gli animali, al termine delle procedure chirurgiche, venivano posizionati in un'area protetta di risveglio/recupero sotto lampade riscaldanti, su tappetini di sughero termoisolanti e qui lasciati riposare e monitorati finché non completamente vigili e solo allora ritrasferiti nelle gabbie ordinarie. Il decubito preferenziale era il sinistro, di modo da facilitare l'espansione respiratoria dal lato sano.

Per prevenire l'essiccamento corneale si applicava topicamente un'apposita pomata (Sificetina 1%, unguento oftalmico al cloramfenicolo) appena prima degli interventi. Per l'analgesia, 1,2 ml di paracetamolo in soluzione da infusione (10mg/ml) erano iniettati sottocute prima dell'intervento di inoculazione; il doppio (2,4 ml) prima dell'intervento di pleuropneumectomia. Iniezioni da 1 ml si effettuavano estemporaneamente se l'animale appariva sofferente.

Al termine di ogni intervento, l'animale veniva reidratato mediante iniezione sottocutanea di 2 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%).

- **Tecnica chirurgica**

Per l'inoculazione tumorale una sospensione di 50 µl contenente 1×10^6 cellule tumorali veniva preparata e l'animale posizionato sul tavolo operatorio in decubito laterale destro, dopo aver eseguito in sede di incisione chirurgica un'ampia tricotomia. Si utilizzava come disinfettante cutaneo Clorexidina 2% in preparazione spray. Si eseguiva disinfezione superficiale, dunque si incideva la cute per circa 2 cm al 4° spazio intercostale, circa 1 cm caudalmente all'articolazione gleno-omeroale sinistra. Si procedeva all'apertura dei piani sottocutanei e alla dissezione smussa del muscolo "cutaneous maximus", il margine ventrale del muscolo grande dorsale veniva identificato e retratto per permettere la visualizzazione degli spazi intercostali. Si dissecava il muscolo intercostale prescelto dal margine superiore della costa sottostante visualizzando così la pleura. L'accesso toracotomico era così completo (figura n.17). Si introduceva un divaricatore (Finocchietto) entro l'accesso

toracotomico per migliorare la visualizzazione delle strutture e agevolare le operazioni seguenti. A questo punto le cellule tumorali, previa loro risospensione mediante agitazione con apparecchiatura vibrante Vortex, venivano iniettate con siringa ad ago sottile (30½ Gauge) in sede sub-pleurica parietale, sotto visione diretta, a livello del margine superiore della toracotomia. Si estraeva dunque il divaricatore riaccostando i piani costale e muscolare mediante sutura continua con Prolene 4/0. La cute veniva suturata con Vicryl 3/0, sempre in sutura continua, e infine disinfettata. L'emostasi era assicurata, quando la compressione con tamponcino risultasse insufficiente, utilizzando una pinza elettrocoagulante bipolare azionata a pedale ^[94, 95, 96, 97].

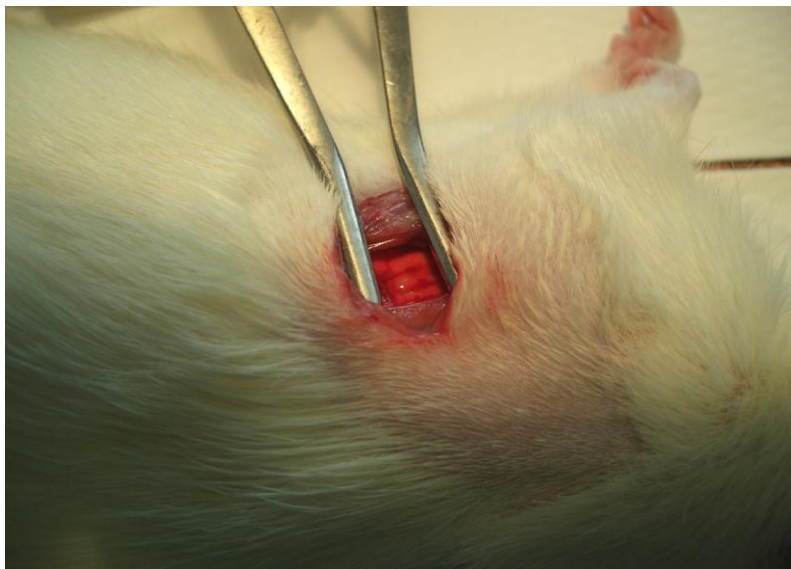
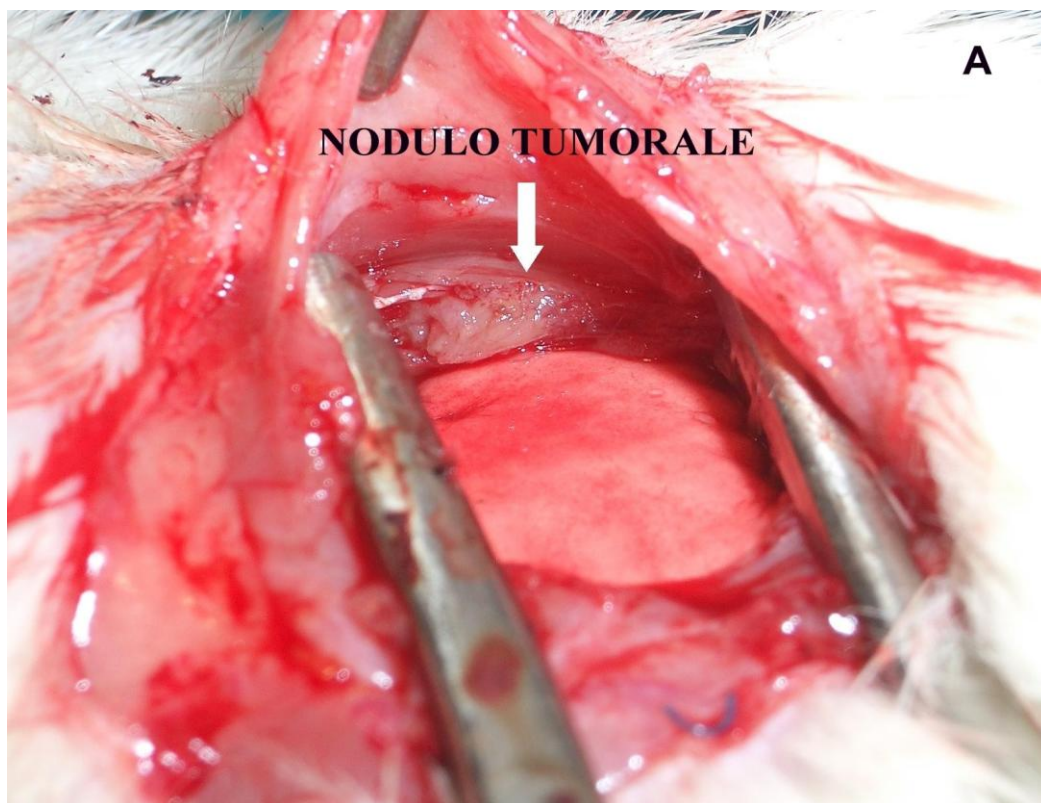


Figura 14 La foto mostra l'accesso toracotomico sinistro eseguito su una delle cavie

Dopo sei giorni dall'inoculazione, secondo il modello sperimentale adottato, si ritrovava in sede di inoculo un unico nodulo tumorale di circa 6x5 mm (figura n.18, A), visualizzabile dopo esecuzione di un nuovo accesso toracotomico esattamente ricavato sul primo. La cicatrice ancora immatura della precedente

breccia cutanea era completamente rimossa facendosi strada attraverso abbondante tessuto di granulazione, friabile e sanguinante e i punti di sutura, precedentemente infissi, rimossi. Dopo inserimento del divaricatore, il tumore risultava riconoscibile come una formazione nodulare pleurica parietale, posta precisamente nella sede di inoculazione della sospensione cellulare, distinguibile per aspetto (superficie grigia irregolare) e consistenza dai tessuti molli circostanti. Esso veniva resecato in maniera macroscopicamente radicale, e con esso ogni eventuale apparente localizzazione secondaria del tumore.

*Figura 15 A) Nodulo tumorale visibile in sede di inoculo, mediante toracotomia sinistra, sei giorni dopo l'inoculazione delle cellule di MPM di tipo sarcomatoide.
B) Posizionamento di un film di chitosano alla superficie interna della cavità toracica.*





Una pneumonectomia sinistra era poi eseguita secondo i seguenti passaggi: ispezione della cavità pleurica con identificazione e preservazione del nervo frenico; sezione del legamento polmonare inferiore; identificazione delle strutture ilari (vena e arteria polmonare sinistra e bronco principale sinistro); legatura delle strutture ilari mediante due clips metalliche (Ethicon LigaClip – Titanium20); resezione polmonare e asportazione del polmone con la sua pleura viscerale.

Dopo il controllo dell'emostasi e il lavaggio della cavità pleurica con soluzione fisiologica, si iniziava il trattamento adiuvante in base al gruppo di appartenenza. I film polimerici caricati o meno con cisplatino erano posizionati (figura n.18, B) in modo tale che l'intera pleura parietale fosse in contatto con la superficie della pellicola contenente il farmaco. I film in chitosano, maggiormente rigidi, richiedevano di essere tagliati in quattro parti uguali per

agevolarne l'introduzione e il posizionamento. Quando l'anatomia lo richiedeva, i film venivano suturati alla parete per stabilizzarne la tenuta. La soluzione di cisplatino veniva instillata in cavo pleurico gradualmente e la gabbia toracica, in questo e in ogni caso, subitaneamente richiusa. Si concludeva come nel precedente intervento.

Dopo sei giorni, agli animali si somministrava una dose sovramassimale di sodio pentobarbitale (Nembutal) con addormentamento e decesso dell'animale entro pochi minuti. Appena l'animale era incosciente e non reagente al dolore, si procedeva all'esecuzione di una laparotomia allo scopo di prelevare adeguate quantità campione di sangue per l'analisi ed effettuare il prelievo degli organi da analizzare.

L'incisione laparotomica veniva effettuata sulla linea mediana. Il decesso del ratto avveniva subito dopo il prelievo, mediante sanguificazione. Si procedeva tempestivamente al prelievo degli organi per semplice liberazione dai mezzi propri di fissità ed estrazione. L'incisione veniva prolungata superiormente fino all'altezza del giugulo. Venivano prelevati fegato, reni, cuore, polmone contro-laterale e l'emiparete toracica malata, dopo la necessaria ispezione; tutti gli organi erano poi conservati in formalina e inviati per le indagini previste. Parte della neoplasia e dei tessuti peritumorali venivano conservati mediante congelamento in azoto liquido per le successive indagini molecolari, immunologiche e metaboliche.

I residui di film eventualmente presenti erano rimossi e anch'essi consegnati per le analisi previste.

- **Prelievi ematici e analisi effettuate su di essi**

Prelievi di sangue e di siero sono stati eseguiti su ogni cavia il giorno stesso dell'intervento, poi il giorno seguente e il giorno dell'autopsia e uno intermedio tra questi (giorni: 0, 1, 3 e 6). Ad eccezione del prelievo effettuato il giorno dell'autopsia tutti gli altri si sono svolti secondo le medesime modalità. I ratti venivano posizionati al di sotto di una cappa in aspirazione, all'interno di un apposito box per l'induzione dell'anestesia con etere, di cui venivano appositamente imbevuti alcuni batuffoli di cotone. Questa sostanza è in grado di superare la barriera ematoencefalica inibendo le strutture del tronco encefalico (tra cui la sostanza reticolare ascendente ma anche i centri del respiro e del cuore). Una volta anestetizzato il ratto, questo veniva posizionato in posizione supina e praticato il prelievo da una delle vene della lingua di 1,5 ml, di cui 0,5 ml utilizzati per le analisi standard del sangue, mentre 1 ml centrifugato per 10 min a 10000 g e il siero ottenuto utilizzato per la valutazione della funzionalità epatica e renale. 50 μ l di siero venivano separati e mantenuti a -80°C fino alle analisi per la determinazione dei valori sierici di cisplatino.

Il ratto ritornava cosciente entro qualche secondo, seppur con qualche segno di ottundimento e incoordinazione motoria per ancora qualche minuto. Dopo questa procedura le cavie venivano infuse, per via sottocutanea, con 1,5 ml di soluzione fisiologica e li si osservava nelle loro gabbie per qualche minuto.

Il giorno dell'autopsia il prelievo avveniva invece direttamente per dissanguamento dell'animale, addormentato con dose letale di sodio pentobarbitale (Nembutal) e successivamente laparotomizzato, con esposizione dei visceri contenuti in cavità addominale. La vena porta veniva

individuata e il sangue estratto con siringa da 2,5 ml e riversato poi nelle provette continuando come sopra. Qualora l'animale fosse deceduto per causa farmacologica prima di aver potuto estrarre una quantità sufficiente di sangue (che è nel ratto assai facilmente coagulabile: la vena dunque rapidamente può trombizzare e coaguli possono ostruire gli aghi), si procedeva velocemente all'apertura della cavità toracica e alla puntura e aspirazione delle camere cardiache, data la centralizzazione del circolo conseguente al decesso.

Sono state dunque previste misurazioni su:

1. SIERO: dosaggio del cisplatino in tutti gli animali trattati con il farmaco e random per un solo animale per ogni gruppo di controllo, per valutarne l'assorbimento sistemico nel tempo.
2. SANGUE: emocromo (RBC, WBC, Hb, Hct), profilo di funzionalità renale (creatinina, urea), profilo di funzionalità epatica (GOT).

- **Preparazione dei campioni per l'esame istologico**

Sei giorni dopo la pleuropneumonectomia sinistra e l'applicazione del trattamento intrapleurico, l'animale è stato sacrificato ed effettuata l'autopsia. La parete toracica, i reni, il fegato, il cuore e il polmone destro sono stati prelevati e fissati in una soluzione di formalina al 4% per almeno 2 giorni. La lunghezza, larghezza e lo spessore della recidiva tumorale sono stati misurati, così com'è stato calcolato il suo volume usando la formula $V=4/3\pi abc$ (a,b,c = semiassi del tumore) sulla base della misurazione macroscopica (lunghezza e larghezza, rispettivamente a e b nella formula) e microscopica (spessore, c) del nodulo neoplastico. Ogni campione è stato tagliato in fette di 4 mm, disidratato

e imbevuto di paraffina. Fette di 5 μ m di spessore sono state posizionate su di un vetrino Superfrost® e colorate con ematossilina-eosina. I reni sono stati valutati utilizzando anche la colorazione PAS (periodic acid schiff) per l'analisi immunoistochimica. La parete toracica, dopo la fissazione con formalina, è stata tagliata in varie fette in rapporto alla localizzazione del tumore.

Tabella VII Analisi previste

| | <u>ANALISI PREVISTE</u> |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ● PARETE TORACICA e NEOPLASIA ● RENE, FEGATO e CUORE ● TESSUTO TUMORALE e PERITUMORALE ● RESIDUI DI FILM | <ul style="list-style-type: none"> ● Caratteri microscopici del tumore (pattern di crescita, necrosi, infiammazione, infiltrazione delle strutture, colonizzazione batterica, ecc...). ● Ricerca di segni di tossicità mediante studio anatomopatologico. ● Grado e caratteri della flogosi indotta a livello locale dal tumore ed eventualmente dai film polimerici mediante analisi immunoistochimica (sottopopolazioni leucocitarie, espressione di citochine, attività metaboliche periferiche). ● Quota di farmaco rilasciato e grado di degradazione polimerica (anche a conferma delle curve di rilascio in vivo). |

- **Analisi statistica dei dati**

I dati sono stati analizzati mediante il programma statistico SPSS per Windows, versione 17.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois). I dati sono forniti in media e deviazione standard. Il test ANOVA è stato eseguito per comparare tutti i gruppi. La correzione di Bonferroni è stata applicata per il confronto fra tutti i gruppi. Il valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

La seconda parte del progetto ha riguardato la valutazione dell'efficacia della associazione di pemetrexed al film polimerico contenente cisplatino nel ridurre il volume della recidiva tumorale nel modello murino di MPM. Per questo, 25 ratti sono stati assegnati secondo randomizzazione, prima dell'inoculazione delle cellule tumorali mediante sorteggio con sequenze di numeri casuali, a diversi gruppi di trattamento così rinominati:

- A) HPx-HPt (ialuronato + pemetrexed e ialuronato + cisplatino) (ratti con dosaggio di 10mg/kg Px +3mg/kg CisPt e ratti con dosaggio 100 mg/kg Px + 3mg/kg CisPt)
- B) HPx (ialuronato + pemetrexed) (ratti con 10mg/kg di Px e ratti con 100mg/kg di Px)
- C) Px Ip (ratti al dosaggio di 10 mg/kg, ratti con dosaggio di 100 mg/kg)
- D) Px Ev (ratti con dosaggio di 10mg/kg e ratti con dosaggio 100 mg/kg)

2.36 Trattamento chirurgico e applicazione dei film polimerici

La procedura chirurgica è già stata riportata precedentemente precedentemente e in altri esperimenti ⁽²³⁾.

Brevemente, in anestesia generale, indotta da iniezione intraperitoneale di pentobarbitale sodico (10 mg/kg), con successiva intubazione oro-tracheale per mezzo di laringoscopio e introduzione di un piccolo catetere in polietilene da infusione (16Gauge = 1.7x45mm), connesso ad un ventilatore standard per

roditori, con *Tidal Volume* fissato a 10 ml/kg a cui è stata applicata una frequenza respiratoria di 75 colpi/min, una sospensione di 50 µl contenente 1×10^6 cellule tumorali veniva inoculata in sede sub-pleurica attraverso una toracotomia sinistra. La sospensione di cellule tumorali è stata iniettata con un ago sottile (30Gauge $\frac{1}{2}$) sotto visione diretta intorno al margine superiore dell'incisione toracotomia.

In questo modo, un nodulo tumorale del diametro di 5,5mm in media, si sviluppava a 6 giorni dal momento dell'inoculazione delle cellule.

Si procedeva così ad una resezione tumorale con pleuro-pneumonectomia sinistra e gli animali ricevevano il trattamento chemioterapico in base al gruppo di assegnazione.

Per i ratti appartenenti ai gruppi A e B, i film, venivano rimossi dalle loro confezioni e venivano posizionati all'interno della cavità pleurica in modo da ricoprirli e facendo in modo che la pleura parietale fosse in stretto contatto con la superficie della pellicola del film contenete il farmaco.

I ratti del gruppo C ricevevano il chemioterapico tramite somministrazione endopleurica del pemetrexed con una siringa da 1 ml al momento della richiusura della cavità pleurica per evitare dispersione del farmaco.

I ratti assegnati al gruppo D invece ricevevano il farmaco tramite somministrazione dello stesso per via endovenosa attraverso la vena della coda.

La breccia toracica era poi suturata tramite un punto costale con prolene 4.0 e con sutura cutanea continua con ethinbon 3.0.

2.37 Determinazione della concentrazione del farmaco

Campioni di sangue venivano prelevati al giorno 1, 2, 3, 6 (giorno dell'autopsia dell'animale), considerando il giorno 0 il giorno dell'intervento in cui veniva posizionato il dispositivo in sede intrapleurica post pleuro-pneumonectomia.

Ogni ratto veniva prelevato, posto sotto cappa, in un'apposita gabbia, dove riceveva una anestesia con etere; una volta anestetizzato veniva posizionato in decubito supino, e pungendo una delle vene della lingua venivano così prelevati 1,5 ml di sangue e posti in apposite provette.

0,5 ml di sangue venivano destinati all'analisi di emocromo standard, in cui si determinavo anche gli indici di funzionalità epatica e renale, mentre circa 1ml veniva centrifugato per 8 min alla velocità di 10000 g ed il siero era così prelevato per testare la concentrazione del farmaco che si liberava in circolo (rispettivamente cisplatino e pemetrexed) conservando i singoli campioni a -80°C fino al momento dell'analisi.

Dopo il prelievo ematico ai singoli ratti veniva somministrato 2 ml di soluzione fisiologica 0,9 % sottocute ed osservati per alcuni minuti nelle loro gabbie.

2.38 Preparazione dei campioni per l'analisi istologica

Sei giorni dopo il trattamento ricevuto, tutti gli animali venivano soppressi e subito dopo veniva eseguita una approfondita necropsia da cui si prelevavano i reni, la gabbia toracica in cui era eseguito l'inoculazione tumorale e il trattamento chemioterapico, il cuore, il fegato ed il polmone rimanente. Consegnati al Dipartimento di Anatomia Patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Parma, i campioni venivano fissati per 2 giorni con una soluzione di formalina al 4%.

Successivamente venivano misurati la lunghezza, la larghezza e lo spessore del nodulo tumorale (se presente) al fine di calcolare il volume della recidiva locale tramite la formula $V = 4/3\pi abc$ (a, b, c = semi-assi del tumore).

Ogni campione veniva ottenuto da una sezione di 4 mm di spessore, dopo deidratazione e fissaggio.

Sezioni di 5 μ m venivano poi colorate con ematossilina ed eosina (HE).

Per i reni si usava la colorazione all'acido periodico di Schiff (PAS) a cui seguiva una colorazione immunostochimica.

La parete toracica, dopo fissazione con formalina, veniva sezionata a diversi livelli in modo da poter eseguire le misurazioni del nodulo polmonare

2.4 RISULTATI

- **Film polimerici**

Tutti i film prodotti si sono dimostrati flessibili e resistenti, particolarmente adatti alla manipolazione durante l'applicazione chirurgica. I film di chitosano si sono rivelati maggiormente resistenti, mentre quelli a base di acido ialuronico maggiormente flessibili. In ogni caso si sono dimostrati facili da tagliare nella forma desiderata e la loro manipolazione e applicazione all'interno della parete toracica, durante l'intervento chirurgico, semplice e soddisfacente. Per quanto concerne il rilascio del farmaco quelli di ialuronato si sono dimostrati maggiormente rapidi, con un tempo massimo per il rilascio completo del cisplatino di 72 ore. Ciò è dovuto all'elevata solubilità in acqua dei polimeri di acido ialuronico. Al contrario il chitosano è insolubile in acqua e il rilascio del farmaco si è rivelato di conseguenza molto più lungo, con solo una piccola frazione di cisplatino rilasciata dopo 30 giorni.

- **Animali**

Ogni gruppo studiato è stato composto da 5 animali. Tutti hanno tollerato la procedura e il trattamento adiuvante bene. Non si sono registrate morti intraoperatorie. Quattro ratti sono morti entro il secondo giorno dall'intervento e sono stati rimpiazzati con altri animali. Non sono stati somministrati farmaci analgesici dopo il primo giorno postoperatorio.

Le analisi istologiche eseguite sul tumore coinvolgente la parete toracica hanno indicato la presenza di un mesotelioma pleurico maligno di tipo sarcomatoide.

Le misure del nodulo tumorale sono mostrate in tabella n.12.

Tabella VIII Dimensioni del tumore dopo l'intervento chirurgico in base ai differenti trattamenti adiuvanti praticati. È stato utilizzato il test ANOVA e applicata la correzione di Bonferroni. LUNGHEZZA: ialuronato-chitosano cisplatino vs gruppo di controllo, $p < 0,0001$; ialuronato-chitosano cisplatino vs soluzione di cisplatino, $p = 0,009$. LARGHEZZA: ialuronato-chitosano cisplatino vs gruppo di controllo, $p < 0,0001$; ialuronato-chitosano cisplatino vs soluzione di cisplatino, $p = 0,005$. SPESSORE: ialuronato-chitosano cisplatino vs gruppo di controllo, $p = 0,026$.

| | Controllo | Chitosano | Ialuronato | Soluzione di cisplatino | Ialuronato + cisplatino | Chitosano + cisplatino | Ialuronato-chitosano + cisplatino |
|-----------------------|-----------|-----------|------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| Lunghezza (mm) | 21,7±2.9 | 17.7±4.1 | 19.3±5.7 | 5.5±3.4 | 2.75±2.1 | 20.8±3.8 | 1.0±1.4 |
| Larghezza (mm) | 27.7±2.5 | 24.3±6.1 | 23.5±9.2 | 5.2±3.1 | 2.5±2.9 | 21±2.9 | 0.9±1.2 |
| Spessore (mm) | 7±6.1 | 3.9±1.1 | 6.1±3.1 | 2.1±1.0 | 1.8±1.7 | 5.3±3.3 | 0.9±0.7 |

Gli animali trattati con film di ialuronato-chitosano “caricati” con cisplatino hanno evidenziato lunghezza e larghezza della recidiva tumorale significativamente inferiore rispetto a quelli trattati con infusione intrapleurica di soluzione di cisplatino ($p = 0,009$ e $p = 0,005$ rispettivamente). Gli animali del gruppo di controllo hanno sviluppato un largo nodulo tumorale in confronto a quelli trattati con cisplatino (figura n.19). Il volume della recidiva tumorale si è dimostrato significativamente inferiore nei ratti trattati con film a doppio strato “caricati” con cisplatino rispetto a quelli del gruppo di controllo ($p < 0,0001$), a quelli trattati con soluzione di cisplatino applicata in sede intrapleurica ($p = 0,003$) e con film di ialuronato caricati con cisplatino ($p = 0,032$) (figura n.20). Queste ultime due strategie si sono dimostrate dunque ugualmente efficaci nella riduzione della recidiva tumorale. I film di chitosano “caricati” con cisplatino sono risultati non efficaci nel ridurre il volume della recidiva tumorale: durante l'autopsia si è osservato un largo nodulo tumorale e una forte reazione infiammatoria, con una grande quantità di tessuto fibrotico a circondare il film

polimerico. Inoltre questo tipo di supporto è sempre stato rinvenuto durante l'autopsia, mentre quelli a base di acido ialuronico si sono dissolti senza lasciare alcuna traccia.

Figura 16 Controllo (A e B) vs ialuronato-chitosano cisplatino (C e D). A) Immagine macroscopica di a una larga recidiva tumorale sei giorni dopo la resezione del tumore e polmonare, non seguita da alcun trattamento adiuvante. B) Immagine ottenuta alla microscopia ottica (HE x 2): il tumore ha una crescita incontrollata e infiltra il periostio costale (parete toracica sulla sinistra; cavità pleurica sulla destra). C) Immagine macroscopica della parete toracica sei giorni dopo la resezione tumorale e polmonare, seguite dall'applicazione intrapleurica di ialuronato-chitosano cisplatino: non vi è evidenza di tessuto tumorale macroscopicamente visibile. D) Immagine microscopica (HE x 4): assenza di crescita di tessuto tumorale; la superficie interna della parete toracica è rivestita da tessuto infiammatorio fibrinoso.

HE: colorazione ematossilina-eosina. F: tessuto infiammatorio fibrinoso. M: muscolo intercostale. R: costa. T: tessuto tumorale.

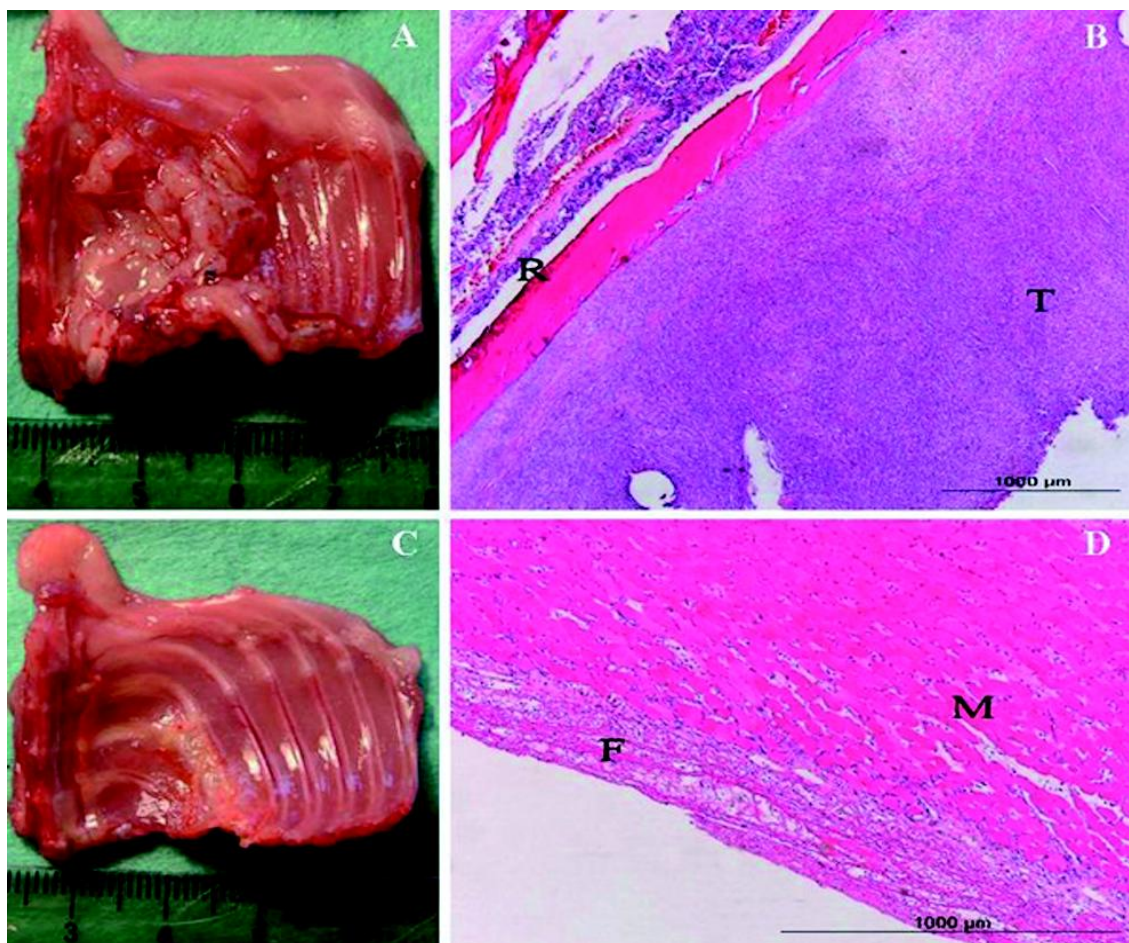
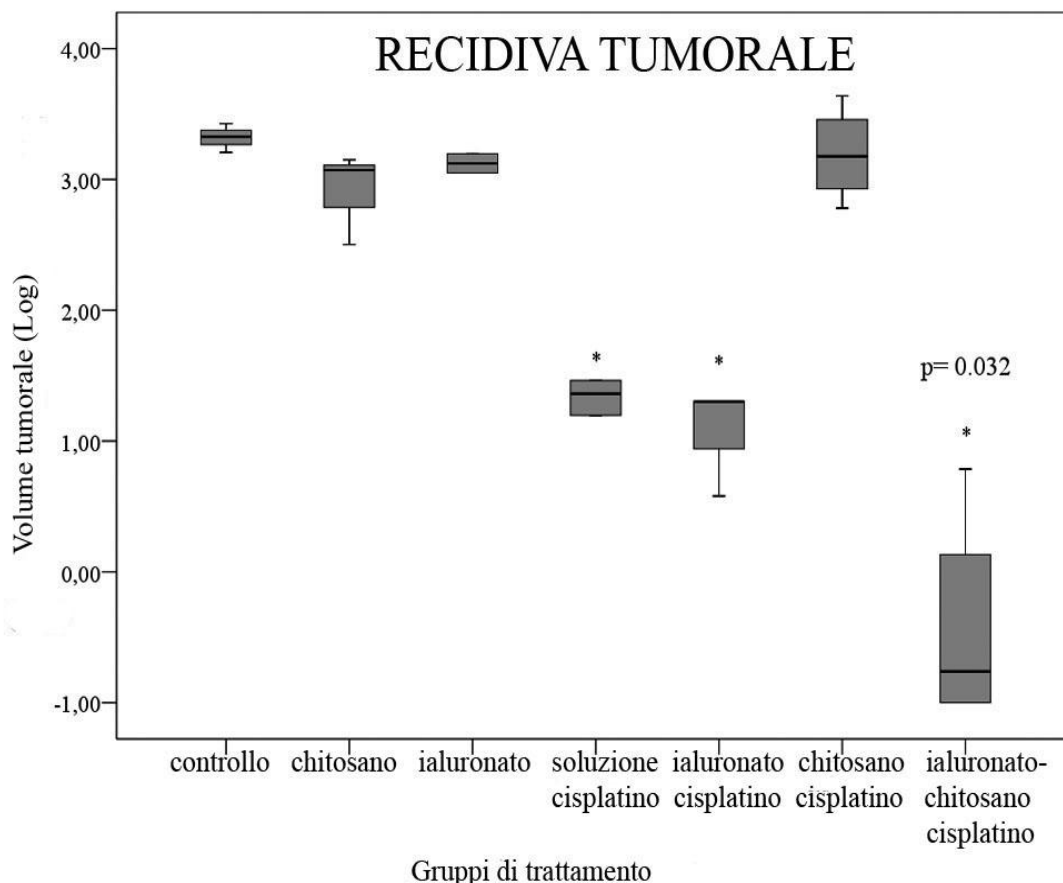


Figura 17 Il grafico mostra il volume tumorale nei differenti gruppi di trattamento. Gli animali trattati con soluzione di cisplatino, ialuronato "caricato" con cisplatino e ialuronato-chitosano "caricato" con cisplatino sviluppano una recidiva di volume molto inferiore rispetto al gruppo di controllo ($p=0,001$, $p=0,001$ e $p<0,0001$, rispettivamente). Nelle cavie che hanno ricevuto cisplatino "caricato" su ialuronato-chitosano la recidiva è significativamente ridotta rispetto a quelli trattati con soluzione di cisplatino ($p=0,003$) e ialuronato "caricato" con cisplatino ($p=0,032$). È stato applicato il test ANOVA con la correzione di Bonferroni.



La tossicità ematica non ha mostrato differenze statisticamente significative tra gli animali trattati con cisplatino e quelli del gruppo di controllo. In particolare globuli bianchi, emoglobina ed ematocrito si sono dimostrati stabili a prescindere dal trattamento.

Il siero è stato analizzato per valutare la funzionalità epatica e renale (tabella n.13). Nei ratti che abbiano ricevuto film di ialuronato (95% CI 0,0-0,51) e di ialuronato-chitosano (95% CI 0,0-0,78) un livello più alto di creatinina, rispetto a

quelli trattati con cisplatino in soluzione, è stato osservato il sesto giorno, ma la differenza non è stata statisticamente significativa ($p=0,9$ e $p=1,0$ rispettivamente). Se si considerano gli animali trattati con cisplatino non si è evidenziato alcun effetto tossico legato all'uso dei due differenti polimeri. A dispetto dei differenti trattamenti vi è stato un picco nei valori sierici delle transaminasi (tabella n.13) 24 ore dopo l'intervento, ma non sono state individuate differenze statisticamente significative tra i vari gruppi; successivamente i valori si sono riportati a livelli di normalità.

Tabella IX Valori plasmatici di creatinina, urea e transaminasi glutammico-ossalacetica (GOT). Sebbene sia stata osservata una moderata tossicità negli animali trattati con cisplatino, in modo non correlato ai differenti supporti polimerici, questa non è risultata statisticamente significativa.

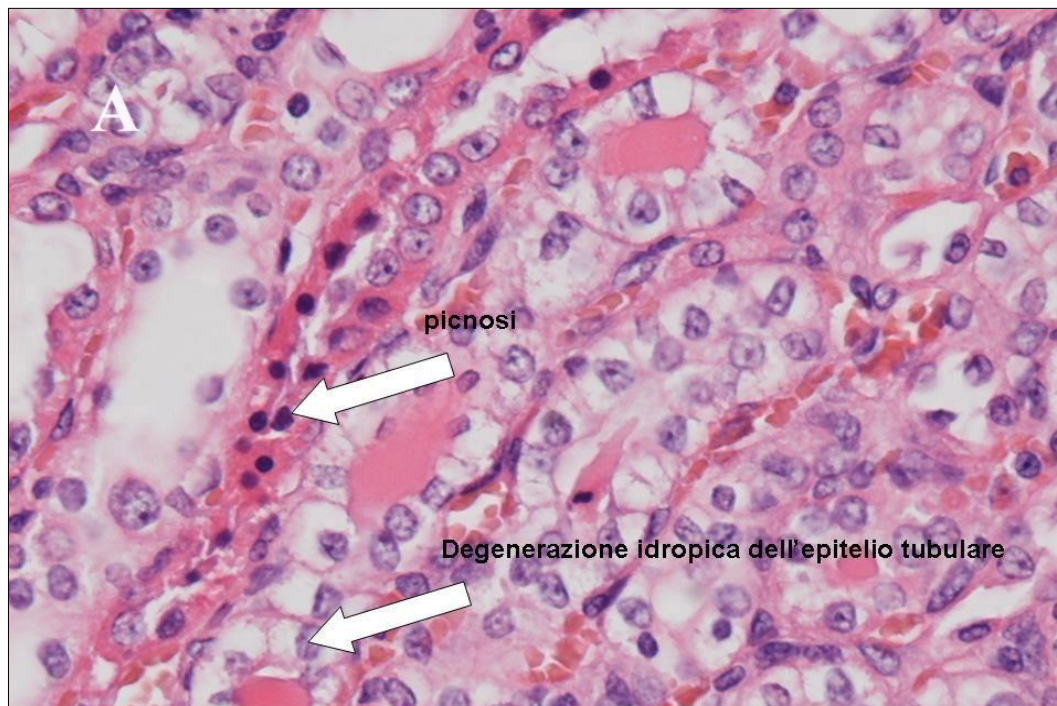
| | Controll o | Chitosan o | laluronat o | Soluzio ne di cisplatin o | laluronat o + cisplatin o | Chitosan o + cisplatin o | laluronat o- chitosano + cisplatin o |
|---------------------------|---------------|---------------|----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---|
| Creatinina (mg/dl) | | | | | | | |
| basale | 0.9±0.5 | 0.9±0.2 | 1.2±0.9 | 1.2±0.3 | 1.1±0.3 | 1.2±0.5 | 1.1±0.2 |
| giorno 1 | 1.2±0.4 | 0.9±0.9 | 1.2±0.8 | 1.1±0.2 | 1.7±0.2 | 1.4±0.5 | 1.5±0.4 |
| giorno 3 | 1.0±0.4 | 1.4±0.4 | 1.1±0.9 | 1.3±0.9 | 0.8±0.3 | 0.7±0.9 | 1.7±1.0 |
| giorno 6 | 1.0±0.3 | 1.4±0.5 | 2.4±1.1 | 3.2±1.4 | 5.6±0.5 | 1.4±0.5 | 5.3±0.7 |
| Urea (mg/dl) | | | | | | | |
| basale | 50.6±5.5 | 47.0±7.2 | 52.3±3.9 | 50.9±2.3 | 50.5±3.3 | 48.4±1.5 | 48.1±1.2 |
| giorno 1 | 46.5±3.4 | 31.7±4.9 | 49.7±2.8 | 57.8±4.2 | 56.9±2.2 | 88.4±2.5 | 115.1±9.4 |
| giorno 3 | 40.0±6.4 | 39.6±3.4 | 44.5±1.9 | 139.9±5.9 | 40.6±2.3 | 44.8±2.9 | 161.7±8.0 |
| giorno 6 | 41.0±5.3 | 44.7±4.5 | 49.8±2.1 | 344.0±4.4 | 408.3±6.2 | 48.4±4.5 | 305.7±3.4 |
| GOT (U/L) | | | | | | | |
| basale | 52.4±5.5 | 56.9±7.2 | 68.0±3.9 | 71.0±4.3 | 73.7±2.3 | 56.1±0.9 | 76.9±1.9 |
| giorno 1 | 181.0±3.4 | 212.0±2.9 | 65.7±1.8 | 171.7±2.2 | 262.0±4.2 | 248.1±4.5 | 340.1±3.4 |
| giorno 3 | 4 | 111.0±8.4 | 59.1±1.9 | 2 | 82.3±5.3 | 58.5±2.5 | 212.7±6.0 |
| giorno 6 | 53.9±4.4 | 45.5±4.5 | 78.8±3.1 | 95.1±8.9 | 86.9±4.2 | 52.7±4.1 | 84.4±4.1 |
| | 61.0±4.3 | | | 89.0±4.4 | | | |

- **Esami istologici**

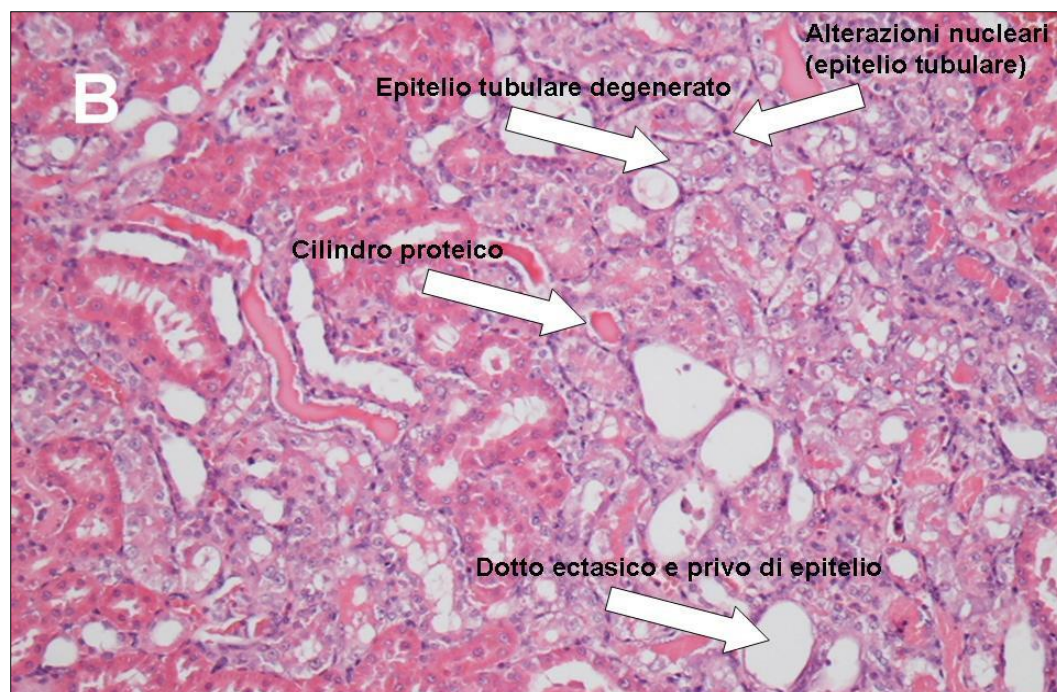
Si è visto che le cellule epiteliali che rivestono i tubuli prossimali renali di tutti i ratti del gruppo A (controllo), B (chitosano) e C (ialuronato) sono leggermente gonfie, con una moderata degenerazione vacuolare e picnosi dei nuclei. Le stesse lesioni si sono evidenziate in modo poco più accentuato nei ratti del gruppo E (chitosano + cisplatino) e più marcatamente in tutti i ratti del gruppo D (soluzione di cisplatino), F (ialuronato + cisplatino) e G (chitosano-ialuronato + cisplatino); sebbene la differenza non sia stata statisticamente significativa ($p=0,08$). I tubuli della midollare e le cellule della papilla renale di tutte le cavie trattate con cisplatino (gruppi D, E, F e G) si sono mostrati carichi di materiale eosinofilo omogeneo (corpi ialini). Rare cellule tubulari contenenti lo stesso materiale sono state osservate in animali dei gruppi B e C. Tubuli rivestiti da cellule epiteliali basofile con nuclei vescicolari e rotondeggianti, prominenti nucleoli (rigenerazione tubulare) ed ectasia tubulare, sono stati osservati nei gruppi D e G (soluzione di cisplatino e film combinati). Queste modificazioni si sono presentate, ma in forma molto leggera, anche nei gruppi C e F, mentre sono assenti negli altri. Necrosi tubulare da moderata a severa, con occasionale mineralizzazione tubulare, si è presentata solo nei ratti dei gruppi D, F, e G (trattamento a base di cisplatino), senza però alcuna evidenza statistica ($p=0,09$) (figura n.21: immagini ottenute alla microscopia ottica delle alterazioni del parenchima renale).

Gli esami istologici dei campioni epatici hanno mostrato una scarsa necrosi focale, indipendente dal trattamento adiuvante somministrato (figura n.22).

Figura 18 (A e B) Le due immagini, ottenute al microscopio ottico mediante colorazione ematossilina-eosina, mostrano le lesioni renali determinate dall' effetto citotossico del cisplatino.

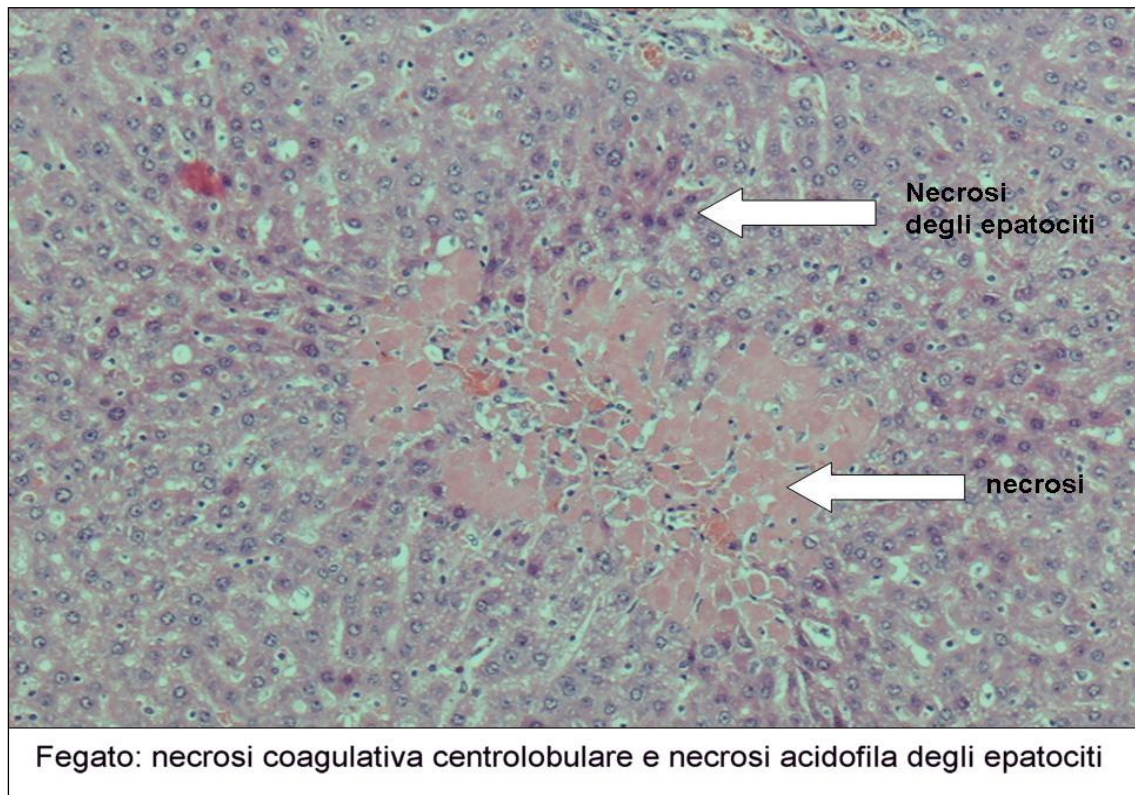


RENE (MIDOLLARE): PICNOSI E DEGENERAZIONE IDROPICA



RENE: ECTASIE DUTTALI, CILINDRI PROTEICI, ALTERAZIONI NUCLEARI E TUBULONEFROSI

Figura 19 L'immagine, ottenuta al microscopio ottico mediante colorazione PAS, mostra le alterazioni del parenchima epatico, che si sono evidenziate indipendente dal trattamento adiuvante somministrato.

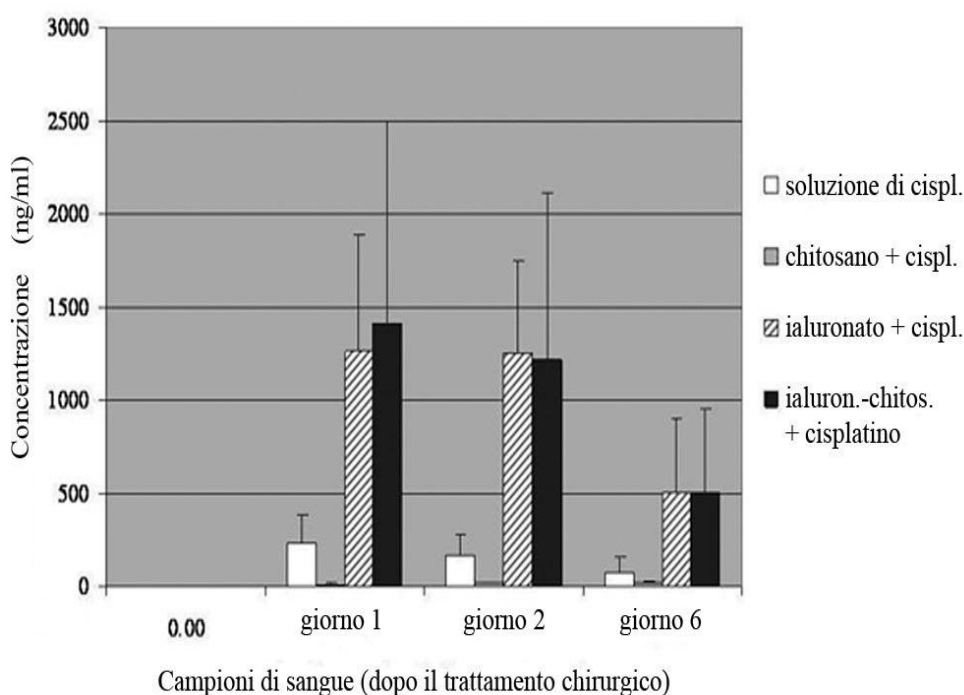


- **Livelli di cisplatino**

Nel 1° e 2° giorno postoperatorio i livelli di cisplatino sierici rilevati sono stati 6-7 volte superiori negli animali trattati con ialuronato + cisplatino e ialuronato-chitosano + cisplatino rispettivamente, se confrontati con quelli trattati con la soluzione di cisplatino (figura n.23). Questa differenza si è vista mantenersi nel tempo. All'autopsia sono stati rilevati 508,25 ng/ml per il gruppo ialuronato + cisplatino e 507,5 ng/ml per il gruppo ialuronato-chitosano + cisplatino, mentre solo 72,9 ng/ml per il gruppo trattato con soluzione di cisplatino. L'elevato dosaggio plasmatico del farmaco non si è però tradotto in una maggiore tossicità sistemica; le differenze non sono statisticamente significative.

Figura 20 Il grafico mostra la concentrazione plasmatica di cisplatino durante le varie fasi dello studio. I livelli riscontrati nel siero degli animali trattati con film di ialuronato "caricati" con cisplatino e di ialuronato-chitosano "caricati" con cisplatino sono significativamente più alti rispetto a quelli trattati con soluzione di cisplatino alle ore 24 ($p=0,005$ e $p=0,005$ rispettivamente) e alle ore 48 ($p=0,004$ e $p=0,005$ rispettivamente). La differenza è presente anche all'autopsia dell'animale al giorno 6 (ialuronato + cisplatino vs soluzione di cisplatino $p=0,032$ e ialuronato-chitosano + cisplatino $p=0,030$).

CONCENTRAZIONE PLASMATICA DI CISPLATINO



I livelli di concentrazione del farmaco sono inoltre stati misurati nei campioni di pleura parietale. Si sono dimostrati molto più alti per il gruppo ialuronato-chitosano + cisplatino, in confronto con tutti gli altri gruppi (figura n.24), in particolare sono stati rilevati 83,1 µg/g (microgrammi per grammo di tessuto) nei campioni di pleura dei ratti appartenenti a questo gruppo, mentre solo 14,5 µg/g e 4,14 µg/g in quelli trattati rispettivamente con soluzione di cisplatino e ialuronato + cisplatino. La differenza non è comunque statisticamente significativa.

Per la seconda parte dell'intervento, i dati da analizzare sono simili a quelli dell'esperimento precedente:

- a) la presenza/assenza di recidiva loco-regionale e le sue dimensioni successive al trattamento effettuato, macro e microscopicamente;
- b) le curve di decadimento del farmaco rilasciato dal vettore in sede vs il farmaco somministrato per via tradizionale sistemica o loco regionale;
- c) la tossicità a carico di fegato, rene, cuore e polmone controlaterale nei diversi gruppi di trattamento;

Bisogna specificare che il laboratorio dati e il dipartimento di anatomia patologica della sezione di medicina veterinaria analizzavano i campioni in cieco.

2.41 Recidiva locale della malattia

La determinazione volumetrica della recidiva della malattia si otteneva tramite calcolo secondo la formula $V = 4/3\pi abc$ (dove a, b, c sono i semi-assi del tumore), dopo aver determinato lunghezza, larghezza e profondità del nodulo tumorale.

Dei 9 ratti appartenenti al primo gruppo di lavoro (HPx-HPt), a livello macroscopico, 4 ratti non mostravano alcun segno di recidiva locale, mentre 2 ratti mostravano la presenza di un piccolo nodulo in sede di inoculo, le cui dimensioni erano mediamente di 2-3 mm.

All'analisi microscopica si è poi rilevato che nei ratti, descritti precedentemente, non si repertavano alcuna cellula tumorale, mentre i seguenti ratti presentavano sì un nodulo, ma di origine principalmente infiammatoria con la presenza di piccoli nidi di cellule tumorali il cui spessore variava tra gli 0,9 mm ed 1,6 mm.

Dei ratti appartenenti al secondo gruppo di lavoro (HPx) sia quelli trattati con una dose di pemetrexed di 10mg/kg sia quelli con una dose di 100 mg/kg presentavano una recidiva locale repertabile sia a livello macro che microscopico. Stranamente quelli trattati con una dose superiore di pemetrexed presentavano volumi tumorali maggiori rispetto a quelli trattati con dose minore.

I ratti appartenenti ai gruppi di lavoro C e D (rispettivamente Px ip e Px ev) mostravano noduli di recidiva locale molto più estesa sia a livello macro che

microscopica rispetto ai gruppi analizzati precedentemente. All'interno poi dei gruppi stessi non si notavano differenze statisticamente significative.

Di seguito sono riportati in tabella X i risultati delle misurazioni eseguite ed a seguire alcune foto fatte sul campo operatorio a dimostrazione dei quadri riscontrati.

| Px ip (10mg/kg) | L (mm) | W (mm) | T (mm) | V (mm ³) | Px ip (100mg/kg) | L (mm) | W (mm) | T (mm) | V (mm ³) |
|-----------------|------------|------------|------------|----------------------|------------------|-----------|-----------|-----------|----------------------|
| 1 | 15 | 19 | 2 | 282 | 1 | 20 | 20 | 5,9 | 1172 |
| 2 | 25 | 24 | 5,5 | 1695 | 2 | 12 | 15 | 2,9 | 357 |
| 3 | 15 | 12 | 2,7 | 339 | | | | | |
| Media | 18,33 | 18,33 | 3,4 | 772 | Media | 18 | 17,5 | 4,4 | 764 |
| Range | 15-25 | 12-24 | 2-5,5 | 282-1695 | Range | 12-20 | 15-20 | 2,9-5,9 | 357-1172 |
| STDdev | 5,77350269 | 6,02771377 | 1,85202592 | 799,849361 | STDdev | 5,6568542 | 3,5355339 | 2,1213203 | 576,29202 |

| Px ev (10mg/kg) | L (mm) | W (mm) | T (mm) | V (mm ³) | Px ev (100mg/kg) | L (mm) | W (mm) | T (mm) | V (mm ³) |
|-----------------|------------|------------|------------|----------------------|------------------|--------|-----------|-----------|----------------------|
| 1 | 20 | 20 | 5,3 | 1088 | 1 | 25 | 20 | 3,3 | 837 |
| 2 | 18 | 24 | 1,4 | 316 | 2 | 25 | 25 | 4,3 | 1406 |
| Media | 19 | 22 | 3,25 | 702 | Media | 25 | 22,5 | 3,8 | 1121 |
| Range | 18-20 | 20-24 | 1,4-5,3 | 316-1088 | Range | 25 | 20-25 | 3,3-4,3 | 837-1406 |
| STDdev | 1,41421356 | 2,82842712 | 2,75771645 | 545,886435 | STDdev | 0 | 3,5355339 | 0,7071067 | 402,34375 |

| HPx (10mg/kg) | L (mm) | W (mm) | T (mm) | V (mm ³) | HPx (100mg/kg) | L (mm) | W (mm) | T (mm) | V (mm ³) |
|------------------|-------------|------------|------------|----------------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|----------------------|
| 1 | 14 | 20 | 4,1 | 586 | 1 | 30 | 30 | 2,1 | 941 |
| 2 | 8 | 14 | 1,8 | 105 | 2 | 30 | 28 | 1,9 | 791 |
| 3 | 8 | 12 | 1,4 | 80 | 3 | 25 | 30 | 3,7 | 1412 |
| 4 | 12 | 6 | 2,1 | 75 | | | | | |
| Media | 10,5 | 13 | 2,35 | 211 | Media | 28,3 | 29,3 | 2,56 | 1048 |
| Range | 8-12 | 6-20 | 1,4 | 75-586 | Range | 25-30 | 28-30 | 1,9-3,7 | 791-1412 |
| STDdev | 3,577350269 | 5,77350269 | 1,20138809 | 250,011333 | STDdev | 2,8867513 | 1,1547005 | 0,9865765 | 324,03240 |

| HPx-HPt (10mg/kg + 3mg/kg) | L (mm) | W (mm) | T (mm) | V (mm ³) | HPx-HPt (100mg/kg + 3mg/kg) | L (mm) | W (mm) | T (mm) | V (mm ³) |
|----------------------------------|------------|------------|------------|----------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|----------------------|
| 1 | 0,5 | 0,5 | 1 | 0,13 | 1 | 1,5 | 2 | 0,6 | 3,8 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 4 | 3 | 1,6 | 10,1 | 3 | 0 | 0 | 0,1 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 5 | 0 | 0,1 | 0,1 | 0 | | | | | |
| 6 | 0 | 0,1 | 0,1 | 0 | | | | | |
| Media | 0,75 | 0,616 | 0,416 | 2,1 | Media | 0,5 | 0,6 | 0,23 | 1,3 |
| Range | 0-4 | 0-3 | 0-1,6 | 0-10,1 | Range | 0-1,5 | 0-2 | 0-0,6 | 0-3,8 |
| STDdev | 1,60468065 | 1,18222953 | 0,67428975 | 4,113022 | STDdev | 0,8660254 | 1,1547005 | 0,3214550 | 2,1939310 |

Legenda Tabella X: L = Length; W = Width; T = Thickness; V = Volume; Media = media aritmetica; Range = intervallo valori, STDdev = deviazione standard

Il volume della recidiva tumorale si è significativamente ridotto nei gruppi ialuronato cisplatino e ialuronato-chitosano cisplatino rispetto al gruppo di controllo ($p=0.001$ e $p<0.0001$ rispettivamente). Gli animali trattati con ialuronato-chitosano cisplatino avevano una recidiva tumorale significativamente minore rispetto agli animali che hanno ricevuto soluzione di cisplatino ($p=0.003$) e ialuronato cisplatino ($p=0.032$). L'associazione di pemetrexed (10-100mg/kg) ai film polimerici caricati con cisplatino non ha

mostrato un'ulteriore riduzione significativa della recidiva tumorale rispetto agli altri gruppi di trattamento.

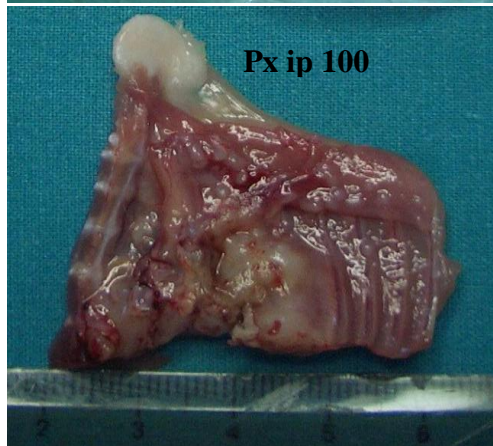
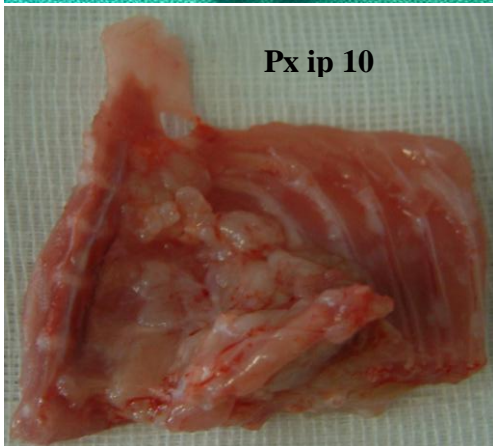
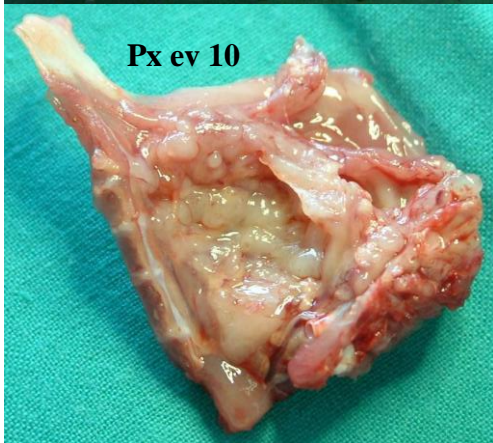
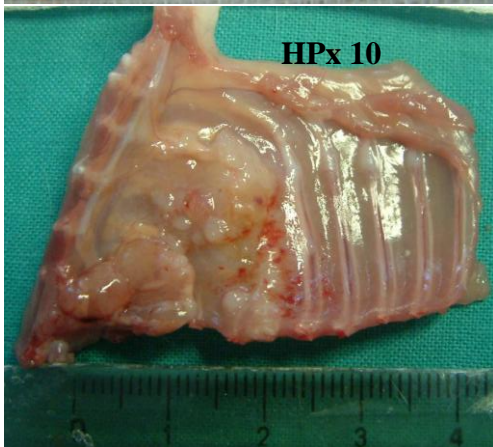
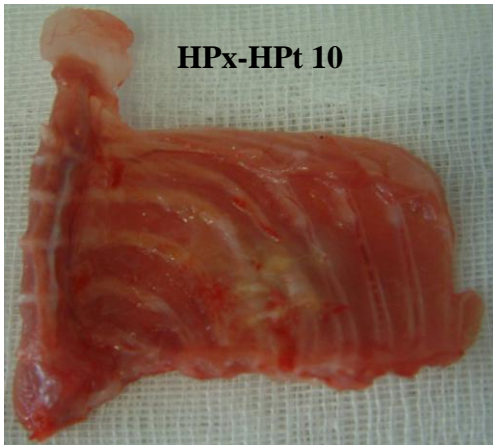


Figura 21 Aspetto macroscopico della recidiva tumorale nei diversi modelli di trattamento. Foto realizzate in sede di esame autoptico.

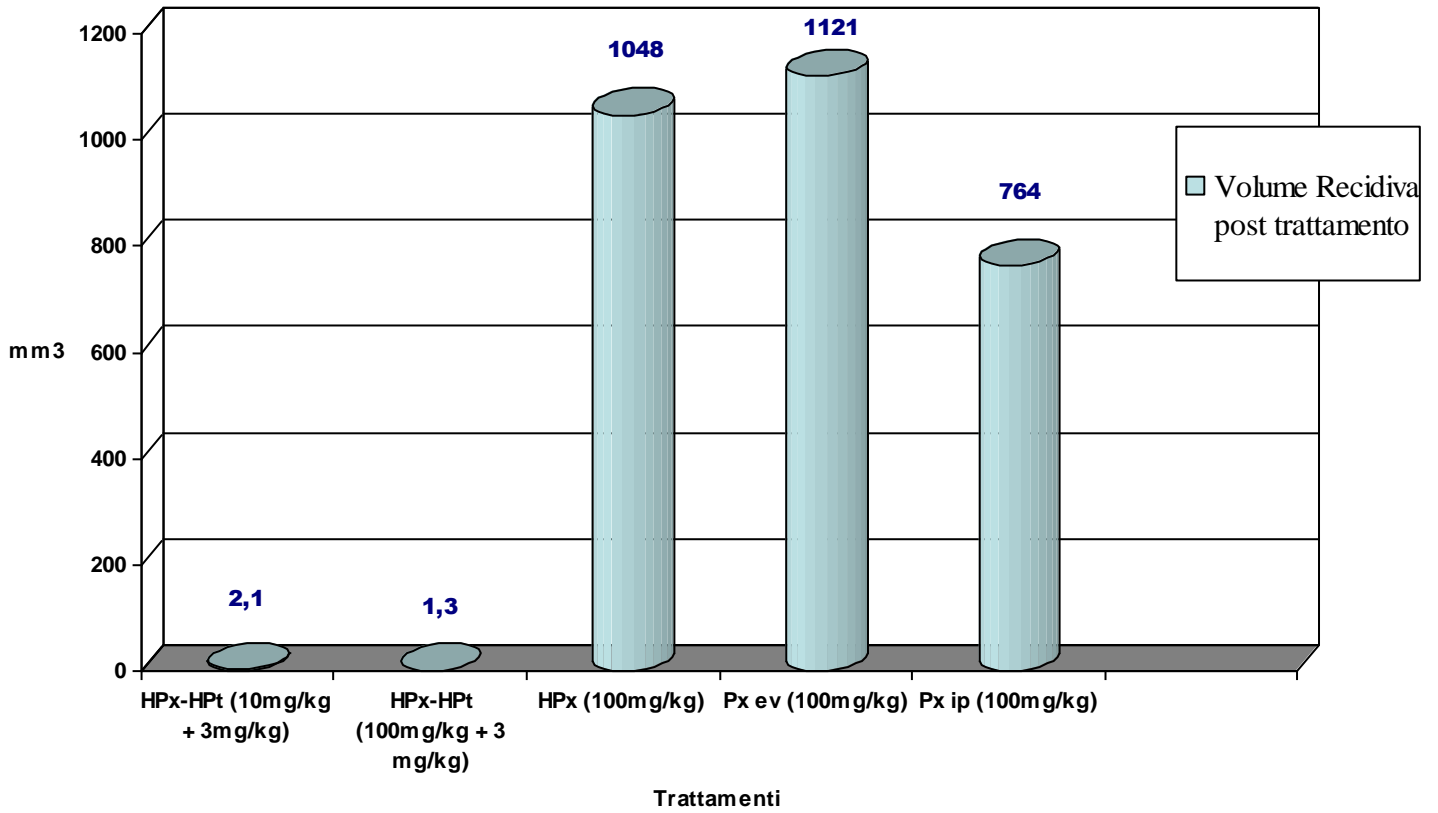


Grafico: Rappresentazione dei volumi di recidiva tumorale a 6 giorni dal trattamento eseguito. In ascissa sono rappresentati i trattamenti mentre in ordinata il volume tumorale in mm^3 calcolato tramite la formula $V = 4/3\pi abc$ (a, b, c = semi-assi del tumore).

2.42 Curve di decadimento del farmaco

Sebbene abbiamo documentato precedentemente che nei campioni in cui il farmaco era somministrato per via endovenosa ed per via intrapleurica, la sua concentrazione a livello plasmatico si riduceva a 0 rispettivamente dopo 8h (Px 10 mg/kg) e 24h (Px 100 mg/kg) anche nei campioni trattati con film polimerico dopo 24h dal posizionamento del vettore non erano riscontrabili tracce del farmaco a livello circolatorio. Nonostante questo la ridotta recidiva tumorale può far pensare che un maggior tempo di contatto in sede del farmaco abbia contribuito all'inibizione della crescita delle cellule tumorali.

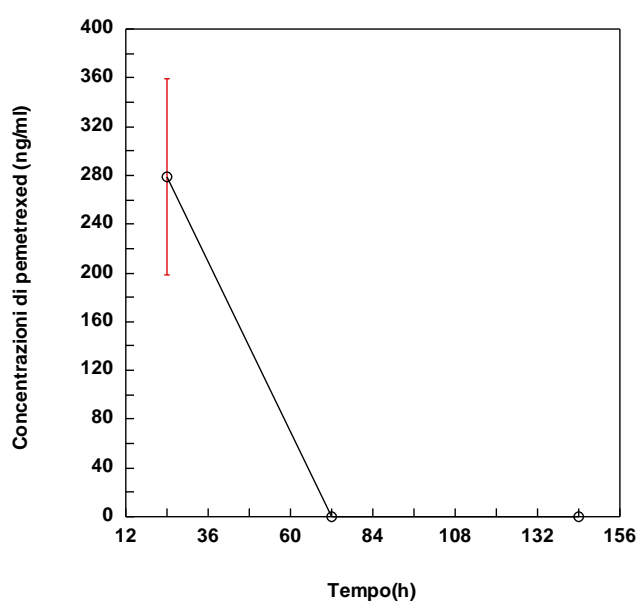


Figura 21 (sinistra): Concentrazioni plasmatiche di pemetrexed somministrato come HPx 10 mg/kg

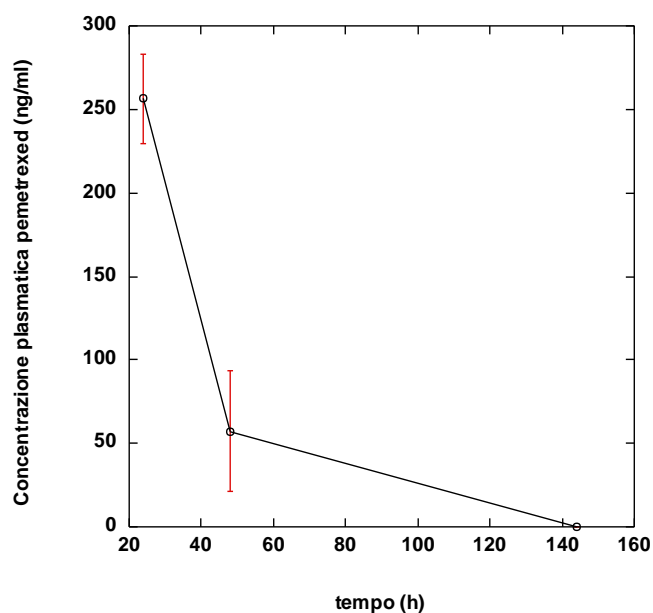


Figura 22 (destra): Profilo plasmatico del pemetrexed somministrato con HPx 100mg/kg

Dall'analisi delle concentrazioni plasmatiche del farmaco nel plasma dei ratti trattati, con HPx 10 mg/kg, come previsto dalle farmacocinetiche, alla ventiquattresima ora si evidenziano tracce di farmaco che si azzerano dopo la sessantesima ora. Nel caso di HPx 100mg/kg il farmaco rimane nel plasma leggermente più a lungo rispetto a quando somministrato a dosi 10 volte minori. In ogni caso la concentrazione plasmatica del farmaco si annulla verso la centoquarantaquattresima ora.

Per quanto riguarda le concentrazioni di farmaco rilasciate dal film doppio, si nota che il pemetrexed alla settantaduesima ora scompare dal plasma, mentre il cisplatino è ancora presente alla centoquarantaquattresima ora.

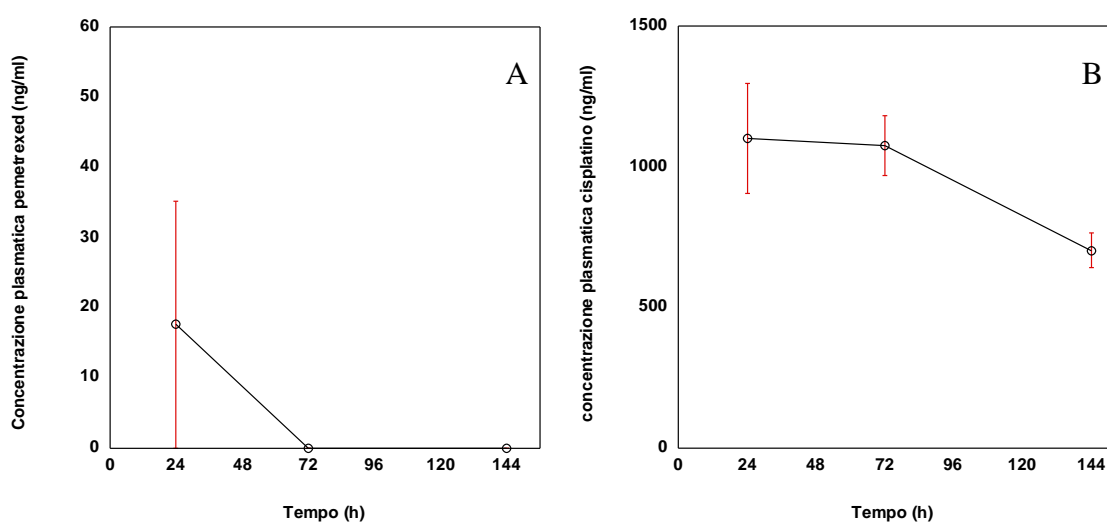


Figura 23 Profili plasmatici del pemetrexed (A) e del cisplatino (B) nel tempo dopo somministrazione del film doppio HPx-HPt

2.43 Tossicità

E' documentato in letteratura che un trattamento con cisplatino (a un dosaggio di 100 mg/m²) può dare i seguenti effetti collaterali:

| >10%: | |
|--------------------|---|
| SNC: | Neurotossicità: Neuropatia periferica dose e durata trattamento dipendente. |
| Dermatologiche: | Discreta alopecia |
| Gastrointestinali: | Nausea and vomito (76% - 100%) |
| Ematologiche: | Mielosoppressione (25% - 30%) |
| Epatiche: | Incremento degli enzimi epatici |
| Renali: | Nefrotossicità (IRA e IRC) |
| Otiche: | Ototossicità (10% - 30%) |
| 1% al 10%: | |
| Gastrointestinali: | Diarrea |
| Locali: | Dermatiti in sede di inoculo e prurito |
| <1%: | |
| Generali | Reazioni anafilattiche |
| Cardiologiche: | Aritmie, bradicardia, |
| Ematologiche: | Sanguinamenti cerebrali, anemia emolitica |
| Neurologiche: | Papilledema, disturbi visivi |

mentre per quello che riguarda il trattamento con dosi di pemetrexed pari a 500 mg/m² sono stati riportati in letteratura

| >10 % | |
|--------------------------------|---|
| SNC: | Fatica (25% - 34%; dose-dipendente) |
| Dermatologiche: | Rash / desquamazione (10% - 14%) |
| Gastrointestinali: | Nausea (19% - 31%), anoressia (19% - 22%), vomito (9% - 16%), stomatiti (7% - 15%), diarrea (5% - 13%) |
| Ematologiche: | Anemia (15% - 19%), leucopenia (6% - 12%), neutropenia (6% - 11%; ricovero: 12-17 giorni; dose-dipendente) |
| Respiratorie: | Faringiti (15%) |
| 1% al 10%: | |
| Cardiovascolari: | Edema (1%-5%) |
| SNC: | Febbre (1%-8%) |
| Dermatologiche: | Prurito (1%-7%), alopecia (1%-6%), eritema multiforme ($\leq 5\%$) |
| Gastrointestinali: | Costipazione (1%-6%), dimagrimento (1%), dolore addominale ($\leq 5\%$) |
| Ematologiche: | Trombocitopenia (1%-8%; dose-limitante), febbre neutropenica (2%) sanguinamenti cerebrali, anemia emolitica, |
| Epatiche: | Incremento ALT (8%-10%) e AST (7%-8%) |
| Neuromuscolari & Scheletriche: | Neuropatia sensoriale ($\leq 9\%$), neuropatia motoria ($\leq 5\%$) |
| Oculari: | Congiuntiviti ($\leq 5\%$), incremento della lacrimazione ($\leq 5\%$) |
| Renali: | IRA (1%-5%) |
| Miscellanea: | Reazioni allergiche /ipersensibilità ($\leq 5\%$), infezioni ($\leq 5\%$) |
| <1% | |
| Cardiologiche: | Aritmie sopraventricolari, tromboembolismo, dolore toracico, ipertensione |
| Gastrointestinali: | Coliti, disidratazione, incremento delle γ GT |
| Respiratorie: | Polmoniti interstiziali |
| Ematologiche: | Pancitopenia |

Dagli esperimenti eseguiti sui ratti sono state riscontrate le seguenti alterazioni microscopiche a carico di rene e fegato:

La valutazione delle tabelle qui sotto riportate si basa sull'utilizzo di una scala semi-quantitativa dove:

- 0 = danno d'organo non rilevabile;
- 1 = danno d'organo lieve;
- 2 = danno d'organo modesto;
- 3 = danno d'organo grave;
- DNV = dato non valutato;

| | | | | TOSSICITA' | EPATICA | | | | |
|---------|------------------------|----------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|------------------|----------|-----------------------------|-------------------------------------|
| Veicolo | Concentrazione farmaco | Rigoriamento torbido | Necrosi focale acidofila | Necrosi centrolobulari | Necrosi subcapsulare | Deg. vacuolare | Steatosi | Alt. dei nuclei epatocitari | Infiltrati infiammatori |
| HPx-HPt | 10 mg/kg + 3mg/kg | 2 | 1 | 0 | 0 | 0-1 | 0 | 1 | Tracce |
| HPx-HPt | 100 mg/kg + 3mg/kg | 1 | 1 | 0 | 0-1 | 0 | 0-1 | 1 | Periepatite focale |
| HPx | 10 mg/kg | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0-1 |
| HPx | 100 mg/kg | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Focali |
| Px EV | 10 mg/kg | 1-2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0-1 | 1 | Tracce |
| Px EV | 100 mg/kg | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 centrolobulare | 0 | 1 | Focali |
| Px IP | 10 mg/kg | 1-2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Px IP | 100 mg/kg | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0-1 | 1 | Areole di epatite sierofibrinosa ed |

| | | | | | | TOSSICITA' | RENALE | | | |
|---------|------------------------|-------------------------|----------------|-------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|------------------|--------------------|------------------------------|
| Veicolo | Concentrazione farmaco | Rigontifiamento torbido | Deg. Vacuolare | Picnosi e alt. Nucleari | Cilindri proteici | Glomerulo nefrosi | Rigenerazione epiteliale | Ectasia tubulari | Necrosi tub. Acuta | Parti coinvolte |
| HPx-HPt | 10 mg/kg + 3mg/kg | 2 | 2 | 2 | 3 | DNV | 2 | 1-2 | 1-2 | Corticale e Midollare |
| HPx-HPt | 100 mg/kg + 3mg/kg | 3 | 3 | 2 | 3 | 0 | 2 | 1 | 2 | Corticale e corticomidollare |
| HPx | 10 mg/kg | 2 | 0 | 2 Midollare | 1 | DNV | 1 | 0 | 0 | Midollare |
| HPx | 100 mg/kg | 1 | 1 | 0-1 Midollare | 1 | 0 | 0-1 | 0 | 0 | Corticale |
| Px EV | 10 mg/kg | 1-2 | 1 | 1-2 Midollare | 1 | DNV | 1 | 0 | 0 | Corticale e Midollare |
| Px EV | 100 mg/kg | 1 | 1 | 0-1 Midollare | 1 | 0-1 | 1 | 0 | 0 | Corticale |
| Px IP | 10 mg/kg | 2 | 0 | 1-2 Midollare | 1 | DNV | 1 | 0 | 0 | Corticale e Midollare |
| Px IP | 100 mg/kg | 2 | 2 | 0-1 Midollare | 3 | 0-1 | 0-1 | 0 | 0 | Corticale |

| TOSSICITA' EMATOLOGICA | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|-------------|----------------------|--------------|--------------|---------------|------------|-----------|
| | WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$) | | Hb (g/dL) | | Creatinina (g/dL) | | Urea (mg/dL) | | GOT (UI/L) | |
| Valori Normali | 6-18 $\times 10^3/\text{mm}^3$ | | 11-19.2 | | 0.5-1 | | 10-21 | | 28-140 | |
| | Post 24h | Post 144h | Post 24h | Post 144h | Post 24h | Post 144h | Post 24h | Post 144h | Post 24h | Post 144h |
| HPx-HPt (10 mg/kg + 3 mg/kg) | 13,00 | 8,62 | 16,18 | 11,90 | 0,406 | 2,861 | 44,12 | 284,56 | 58,66 | 97,22 |
| | ↓ - 4,38 | | ↓ - 4,28 | | ↑ +2,455 | | ↑ +240,44 | | ↑ +38,56 | |
| HPx-HPt (100 mg/kg + 3 mg/kg) | 7,8 | 10,85 | 15,1 | 11,9 | 0,345 | 2,511 | 43,5 | 266,5 | 147 | 50,95 |
| | ↑ +3,05 | | ↓ -3,2 | | ↑ +2,166 | | ↑ +223 | | ↓ - 96,05 | |
| HPx (10 mg/kg) | 10,50 | 9,30 | 14,75 | 11,90 | 0,531 | 0,364 | 52,60 | 44,75 | 83,50 | 66,35 |
| | ↓ - 1,2 | | ↓ - 2,85 | | ↓ - 0,167 | | ↓ - 7,85 | | ↓ - 17,15 | |
| HPx (100 mg/kg) | 12,9 | 13,5 | 16,8 | 12,2 | 0,444 | 0,440 | 39,6 | 33,8 | 87,8 | 48,5 |
| | ↑ +0,6 | | ↓ - 4,6 | | ↓ - 0,004 | | ↓ - 5,8 | | ↓ - 39,3 | |
| Px ev (10 mg/kg) | 11,85 | 9,70 | 14,25 | 12,25 | 0,543 | 0,399 | 43,10 | 36,25 | 95,20 | 32,30 |
| | ↓ - 2,15 | | ↓ - 2 | | ↓ - 0,144 | | ↓ - 6,85 | | ↓ - 62,9 | |
| Px ev (100 mg/kg) | 14,8 | 12,35 | 15,5 | 12,3 | 0,4 | 0,45 | 42,95 | 36,4 | 185 | 50,5 |
| | ↓ - 2,45 | | ↓ - 3,2 | | ↑ +0,05 | | ↓ - 6,55 | | ↓ - 134,5 | |
| Px ip (10 mg/kg) | 10,70 | 13,20 | 12,90 | 11,20 | 0,333 | 0,401 | 50,40 | 39,40 | 65,40 | 63,00 |
| | ↑ +2,50 | | ↓ - 1,70 | | ↑ +0,068 | | ↓ - 11 | | ↓ - 2,40 | |
| Px ip (100 mg/kg) | 12,4 | 14,1 | 14,7 | 10,5 | 0,4 | 0,46 | 34,4 | 33,55 | 123,5 | 50,05 |
| | ↑ +1,7 | | ↓ - 4,2 | | ↑ +0,06 | | ↓ - 0,85 | | ↓ - 73,45 | |

Legenda tabella XI in grassetto i valori alterati rispetto l'intervallo di riferimento; in blu ed in rosso gli andamenti complessivi dei valori in esame tra le 24 ore e le 144 ore.

2.5 CONCLUSIONI

1) La combinazione di cisplatino e pemetrexed veicolati tramite film di acido ialuronico è un valido trattamento nella prevenzione della recidiva locale nella malattia mesoteliale rispetto alle tradizionali vie di somministrazione di chemioterapici (endovena e intrapleurica) per la maggior durata di contatto e quindi di azione del farmaco sulla sede di recidiva, ma a differenza dei precedenti esperimenti eseguiti ⁽⁹³⁾ non sembra esserci un'ulteriore riduzione significativa rispetto al gruppo ialuronato cisplatino.

2) L'effetto antitumorale è ad appannaggio principalmente del cisplatino più che del pemetrexed. In questi esperimenti si è visto che il pemetrexed, nuovo agente chemioterapico, appartenente alla classe degli antifolati, da solo, pur veicolato dal dispositivo di acido ialuronico elaborato dal dipartimento di Chimica e Propedeutica Farmaceutica, non è in grado di garantire risultati sul trattamento della recidiva efficaci come nella sua combinazione con un altro chemioterapico.

3) Non si è rilevata tossicità ematica né renale statisticamente significativa nei diversi gruppi di lavoro eccetto per i livelli di transaminasi (GOT) a 24h dal trattamento nei ratti appartenenti al gruppo pemetrexed (100 mg/kg) endovena rispetto al gruppo ialuronato pemetrexed (100 mg/kg) ($p = 0.015$).

4) I risultati dello studio farmacocinetico attualmente in corso nel modello ovino, saranno molto utili per definire la possibilità di un eventuale studio clinico.

5) Un'idea interessante da sviluppare sarebbe quella di valutare anche altri chemioterapici - *in vitro* e successivamente *in vivo*, nella cura del mesotelioma,

in quanto potrebbero avere un effetto sinergico/complementare sullo sviluppo di recidiva tumorale se venissero veicolati dal nostro dispositivo. Tale film infatti non dimostra reazioni locali (tipo flogosi o fibrosi) e permetterebbe un maggior tempo di contatto tra chemioterapico e cellule tumorali.

3 APPENDICE

Indice di Karnofsky

| Categoria generale-Descrizione | Criteri specifici | Indice |
|--|--|--------|
| Capace di badare alle normali attività; non richiede nessuna assistenza | Normale; assenza di disturbi; nessuna manifestazione di patologia | 100 |
| | Capace di badare alle normali attività; segni e sintomi minori di patologia. | 90 |
| | Attività normale con fatica; qualche segno o sintomo di malattia. | 80 |
| Incapace di lavorare; in grado di badare alla maggior parte dei propri bisogni; richiede assistenza saltuaria | Incapace di lavorare ma autosufficiente | 70 |
| | Richiede assistenza occasionale ma è capace di badare alla maggior parte dei propri bisogni | 60 |
| | Richiede frequente e considerevole assistenza medica | 50 |
| Incapace di badare a se stesso; richiede ricovero in struttura, ospedale o equivalente; la malattia può essere ingravescente | Disabile, richiede cure speciali ed assistenza | 40 |
| | Gravemente disabile; è indicato il ricovero anche se la morte non è imminente | 30 |
| | Particolarmente disabile; necessario il ricovero; necessario un trattamento di supporto attivo | 20 |
| | Moribondo | 10 |
| | Deceduto | 0 |

4 BIBLIOGRAFIA

- 1) Jett J, Aubry M. **Malignant Pleural Mesothelioma.** *Clinical Respiratory Medicine.* Mosby 2nd edition. :735-741
- 2) **Filaberti R, Montanaro F. Epidemiology of pleural mesothelioma in Italy.** *Lung Cancer* 2004, 45S, S25-S27
- 3) Robinson BW, Lake RA: **Advances in malignant mesothelioma.** *N Engl J Med* 2005, 353:1591-1603
- 4) Teta MJ, Mink, PJ, Lau, E, et al. **US mesothelioma patterns 1973-2002: indicators of change and insights into background rates.** *Eur J Cancer Prev* 2008; 17:525
- 5) Carbone M, Bedrossian CW. **The pathogenesis of mesothelioma.** *Semin Diagn Pathol* 2006, 23:56-60
- 6) Howel D, Gibbs A, Arblaster L, Swinburne L, Schweiger M, Renvoize E, Hatton P, Pooley F. **Mineral fibre analysis and routes of exposure to asbestos in the development of mesothelioma in a English region.** *Occup Environ Med* 1999, 56:51-58
- 7) Stenton SC. **Asbestos, Simian virus 40 and malignant mesothelioma.** *Torax* 1997, 52 (suppl 3) : S52-57
- 8) Manfredi JJ, Dong J ,Liu WJ, Resnick-Silverman L, Qiao R, Chahinnian P, Saric M, Gibbs AR, Phillips JI, Murray , Axten CW, Nolan RP, Aaronson SA. **Evidence against a role for SV 40 in human mesothelioma.** *Cancer Res* 2005, 65:2602-2609
- 9) Hammar SP. **Macroscopic, histologic,histochemical, immunohistochemical and ultrastructural features of mesothelioma.** *Ultrastruct Pathol.* 2006; 30:3-17
- 10) Yaziji H, Battifora H, Barry TS, et al. **Evaluation of 12 antibodiesfor distinguishing epithelioid mesothelioma from adenocarcinoma: identification of a three-antibody immunohistochemical panel with maximal sensitivy and specificity.** *Mod Pathol.* 2006;19:514-523
- 11) Galloway ML, Murray D, Moffat DF. **The use of the monoclonal antibody mesothelin in the diagnosis of malignant mesothelioma in pleural biopsies.** *Histopathology* 2006; 48:767-769
- 12) Elmes PC, Simpson JC. **The clinical aspects of mesothelioma.** *Q J Med* 1976, 45:427-449
- 13) Testa JR, Pass HI, Carbone M. **Benign and malignant mesothelioma.** *In: Principles and Practice of Oncology, 6th Ed, 2001.* p.1937
- 14) Ordonez NG. **Value of mesothelin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma.** *Mod Pathol* 2003; 16:192
- 15) Chang K, Pai LH, Pass H, et al. **Monoclonal antibody K1 reacts with epithelial mesothelioma but not with lung adenocarcinoma.** *Am J Surg Pathol* 1992; 16:259
- 16) Hassan R, Remaley AT, Sampson ML, et al. **Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer.** *Clin Cancer Res* 2006; 12:447
- 17) Grigoriu BD, Scherpereel A, Devos P, et al. **Utility of osteopontin and serum mesothelin in malignant pleural mesothelioma diagnosis and prognosis assessment.** *Clin Cancer Res* 2007; 13:2928
- 18) Cristaudo A, Foddis R, Vivaldi A, et al. **Clinical significance of serum mesothelin in patients with mesothelioma and lung cancer.** *Clin Cancer Res* 2007; 13:5076

- 19) Schneider J, Hoffmann H, Dienemann H, et al. **Diagnostic and prognostic value of soluble mesothelin-related proteins in patients with malignant pleural mesothelioma in comparison with benign asbestosis and lung cancer.** *J Thorac Oncol* 2008; 3:1317
- 20) Scherpereel A, Grigoriu B, Conti M, et al. **Soluble mesothelin-related peptides in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:1155
- 21) Creaney J, Yeoman, D, Naumoff, LK, et al. **Soluble mesothelin in effusions: a useful tool for the diagnosis of malignant mesothelioma.** *Thorax* 2007; 62:569
- 22) Davies HE, Sadler, RS, Bielsa, S, et al. **Clinical impact and reliability of pleural fluid mesothelin in undiagnosed pleural effusions.** *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180:437
- 23) Lee YC. **Hunting for a pleural fluid test for mesothelioma: is soluble mesothelin the answer?.** *Thorax* 2007; 62:561
- 24) Pass HI, Lott, D, Lonardo, F, et al. **Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels.** *N Engl J Med* 2005; 353:1564
- 25) Hiraki A, Aoe, K, Ueoka H. **Asbestos exposure and serum osteopontin.** *N Engl J Med* 2006; 354:304
- 26) Munoz A, Barcelo R, Lopez-Vivanco G. **Malignant mesothelioma.** *N Engl J Med* 2006; 354:305
- 27) Kent M, Rice D, Flores R. **Diagnosis, Staging and surgical treatment of malignant pleural mesothelioma.** *Current Treatment Options in oncology* (2008) 9:158-170
- 28) Wang ZJ, Reddy GP, Gotway MB, Higgins CB, Jablons DM, Ramaswamy M, Hawkins RA, Webb WR. **Malignant Pleural Mesothelioma: Evaluation with CT, MR Imaging, and PET.** *RadioGraphics* (2004) January-February, volume 24, number 1
- 29) Veit-Haibacha P, Schaefera NG, Steinerta HC, Soykaa JD, Seifert B, Stahel RA. **Combined FDG-PET/CT in response evaluation of malignant pleural mesothelioma** *Lung Cancer* 2009
- 30) Subramaniam RM, Wilcox B, MC Aubry, Jett J, Peller PJ. **18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography and positron emission tomography/computed tomography imaging of malignant pleural mesothelioma.** *Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology* 53 (2009) 160–170
- 31) Gavenois PA, De Maertelaer V, Madami A, et al. **Asbestosis, pleural plaques and diffuse pleural thickening: three distinct benign responses to asbestos exposure** *Eur Respir J* 1998; 11:1021-1027
- 32) Boutin C, Rey F. **Thoracoscopy in pleural malignant mesothelioma : a prospective study of 188 consecutive patients. Part 1: Diagnosis** *Cancer* 1993 72: 389-393
- 33) Boutin C, Rey F, Gouvernet J et al. **Thoracoscopy in pleural malignant mesothelioma : a prospective study of 188 consecutive patients. Part 2: Prognosis and staging.** *Cancer* 1993 72: 394-404
- 34) Boutin C, Viallat JR, Aelony Y Practical. **Thoracoscopy** Springer 1991 Berlin
- 35) Casalini A, Cavaliere S, Configli GF et al. **Standard operativi e linee guida in endoscopia toracica. Rassegna di patologia dell'Apparato Respiratorio** 12:348-350
- 36) Sugarbaker, DJ, Jaklitsch, MT, Liptay, MJ. **Mesothelioma and radical multimodality therapy: who benefits?** *Chest* 1995; 107(Suppl):345
- 37) Rusch VW. **A proposed new international TNM staging system for malignant pleural mesothelioma.** From the International Mesothelioma Interested Group. *Chest* 1995 108: 1122-1128

- 38) Antman, KH. **Natural history and epidemiology of malignant mesothelioma.** *Chest* 1993; 103:373S
- 39) Antman, KH. **Malignant mesothelioma: prognostic variables in a registry of 180 patients. The Dana-Farber Cancer Institute and Brigham and Women's Hospital experience over two decades, 1965-1985.** *J Clin Oncol* 1988; 6:147
- 40) Curran, D, Sahmoud, T, Therasse, P, et al. **Prognostic factors in patients with pleural mesothelioma: The European Organization for Research and Treatment of Cancer experience.** *J Clin Oncol* 1998; 16:145
- 41) Herndon, JE, Green, MR, Chahinian, AP, et al. **Factors predictive of survival among 337 patients with mesothelioma treated between 1984 and 1994 by the Cancer and Leukemia Group B.** *Chest* 1998; 113:723
- 42) Flores, RM, Zakowski, M, Venkatraman, E, et al. **Prognostic factors in the treatment of malignant pleural mesothelioma at a large tertiary referral center.** *J Thorac Oncol* 2007; 2:957
- 43) Mikulski, SM, Costanzi, JJ, Vogelzang, NJ, et al. **Phase II Trial of a Single Weekly Intravenous Dose of Ranpirnase in Patients With Unresectable Malignant Mesothelioma.** *J Clin Oncol* 2002; 20:274
- 44) Bottomley, A, Coens, C, Efficace, F, et al. **Symptoms and patient-reported well-being: do they predict survival in malignant pleural mesothelioma? A prognostic factor analysis of EORTC-NCIC 08983: Randomized phase III study of cisplatin with or without raltitrexid in patients with malignant pleural mesothelioma.** *J Clin Oncol* 2007; 25:5770
- 45) Raja M. Flores, Harvey I. Pass, Venkatraman E. Seshan, Joseph Dycoco, Maureen Zakowski, Michele Carbone, Manjit S. Bains, and Valerie W. Rusch. **Extrapleural pneumonectomy versus pleurectomy/ decortication in the surgical management of malignant pleural mesothelioma: Results in 663 patients.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135:620-6
- 46) Yildirim, H, Metintas, M, Ak, G, et al. **Predictors of talc pleurodesis outcome in patients with malignant pleural effusions.** *Lung Cancer* 2008; 62:139
- 47) Robinson, LA, Fleming, WH, Galbraith, TA. **Intrapleural doxycycline control of malignant pleural effusions.** *Ann Thorac Surg* 1993; 55:1115
- 48) Tassi GF, Vitacca E, Vitrone G. **Pleurodesi.** Editoriale Delfo, 2000, Brescia
- 49) LoddenKemper R. **Medical Thoracoscopy.** In: Light RW, Lee YCG. *Textbook of pleural disease.* (2003) Arnold Press, London, pp 498-512
- 50) Rodriguez-Panadero F. **Pleurodesis & pleural disease.** 2004 Marcel Dekker, New York pp 459-503
- 51) Read CA, Wohlrab JL, Szwed TW, Anderson ED. **Thoracoscopy with talc pleurodesis shortens hospitalization.** *J Bronchol* 2002 9:281-285
- 52) Walker-Renard P, Vaughan LM, Sahn SA. **Chemical pleurodesis for malignant pleural effusion.** *Ann Intern Med* 1994 120:56-64
- 53) Antony VB, Loddenkemper R, Austol P et Al. **Management of malignant pleural effusions.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000 162:1987-2001
- 54) Shaw P, Agarwal R. **Pleurodesis for malignant pleural effusions.** *Cochrane Database Syst Rev* 2004 CD002916
- 55) Sahn S. **Talc should be used for pleurodesis.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000 162:2023-2024
- 56) Sahn S. **Is talc indicated for pleurodesis? Pro: talc should be used for pleurodesis.** *J Bronchol* 2002 9:223-227

- 57) Antunes G, Neville E, Duffy J, Ali N. **Management of malignant pleural effusions.** *Thorax* 58[Suppl 2] : ii29-ii38
- 58) Mathur PN, Austoul P, Boutin C. **Medical thoracoscopy. Technical detail.** *Clin Chest Med* 1995 16:479-486
- 59) Apostolos Nakas, Delphine Sophie Trousse, Antonio E. Martin-Ucar and David A. Waller **Open lung-sparing surgery for malignant pleural mesothelioma: the benefits of a radical approach within multimodality therapy.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;34:886-891
- 60) Walker-Renard P, Vaughan LM, Sahn SA. **Chemical pleurodesis for malignant pleural effusion.** *Ann Intern Med* 1994 120:56-64
- 61) Spiegler, PA, Hurewitz, AN, Groth, ML. **Rapid pleurodesis for malignant pleural effusions.** *Chest* 2003 ; 123 :1895
- 62) Shaw P, Agarwal R. **Pleurodesis for malignant pleural effusions.** *Cochrane Database Syst Rev* 2004 CD002916
- 63) Ho L, Sugarbaker DJ, Skarin AT. **Malignant pleural mesothelioma.** *Cancer Treat Res* 2001;105:327-73
- 64) Ball DL, Cruickshank DG. **The treatment of malignant mesothelioma of the pleura: review of a 5-year experience, with special reference to radiotherapy.** *Am J Clin Oncol* 1990;13:4-9
- 65) Gordon Jr W, Antman KH, Greenberger JS, Weichselbaum RR, Chaffey JT. **Radiation therapy in the management of patients with mesothelioma.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982;8:19-25
- 66) Krug, LM, Pass, HI, Rusch, VW, et al. **Multicenter phase II trial of neoadjuvant pemetrexed plus cisplatin followed by extrapleural pneumonectomy and radiation for malignant pleural mesothelioma.** *J Clin Oncol* 2009; 27:3007
- 67) Weder, W, Stahel, RA, Bernhard, J, et al. **Multicenter trial of neo-adjuvant chemotherapy followed by extrapleural pneumonectomy in malignant pleural mesothelioma.** *Ann Oncol* 2007; 18:1196
- 68) Sugarbaker, DJ, Flores, RM, Jaklitsch, MT, et al. **Resection margins, extrapleural nodal status, and cell type determine postoperative long-term survival in trimodality therapy of malignant pleural mesothelioma: results in 183 patients.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117:54
- 69) Tilleman, TR, Richards, WG, Zellos, L, et al. **Extrapleural pneumonectomy followed by intracavitary intraoperative hyperthermic cisplatin with pharmacologic cytoprotection for treatment of malignant pleural mesothelioma: a phase II prospective study.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 138:405
- 70) Vogelzang, NJ. **Chemotherapy for malignant pleural mesothelioma.** *Lancet* 2008; 371:1640
- 71) Muers, MF, Stephens, RJ, Fisher, P, et al. **Active symptom control with or without chemotherapy in the treatment of patients with malignant pleural mesothelioma (MS01): a multicentre randomised trial.** *Lancet* 2008; 371:1685
- 72) Van Meerbeeck, JP, Gaafar, R, Manegold, C, et al. **Randomized phase III study of cisplatin with or without raltitrexed in patients with malignant pleural mesothelioma: an intergroup study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group and the National Cancer Institute of Canada.** *J Clin Oncol* 2005; 23:6881
- 73) Solheim OP, Saeter G, Finnanger AM, Stenwig AE. **High-dose methotrexate in the treatment of malignant mesothelioma of the pleura. A phase II study.** *Br J Cancer* 1992;65:956-60

- 74) Bass P. **Chemotherapy for malignant mesothelioma: from doxorubicin to vinorelbine.** *Semin Oncol* 2002;29:62-9
- 75) Chahinian AP, Antman K, Goutsou M, Corson JM, Suzuki Y, Modeas C, Herndon II JE, Aisner J, Ellison RR, Leone L. **Randomized phase II trial of cisplatin with mitomycin or doxorubicin for malignant mesothelioma by the Cancer and Leukemia Group B.** *J Clin Oncol* 1993;11:1559-65
- 76) Byrne MJ, Davidson JA, Musk AW, Dewar J, van Hazel G, Buck M, de Klerk NH, Robinson BW. **Cisplatin and gemcitabine treatment for malignant mesothelioma: a phase II study.** *J Clin Oncol* 1999;17:25-30
- 77) Parra HS, Tixi L, Latteri F, Bretti S, Alloisio M, Gravina A, Lionetto R, Bruzzi P, Dani C, Rosso R, Cosso M, Balzarini L, Santoro A, Ardizzoni A. **Combined regimen of cisplatin, doxorubicin, and alpha-2b interferon in the treatment of advanced malignant pleural mesothelioma: a Phase II multicenter trial of the Italian Group on Rare Tumors (GITR) and the Italian Lung Cancer Task Force (FONICAP).** *Cancer* 2001;92:650-6
- 78) Scagliotti GV, Shin DM, Kindler HL, Vasconcelles MJ, Keppler U, Manegold C, Burris H, Gatzemeier U, Blatter J, Symanowski JT, Rusthoven JJ. **Phase II study of pemetrexed with and without folic acid and vitamin B12 as front-line therapy in malignant pleural mesothelioma.** *J Clin Oncol* 2003; 21:1556-61
- 79) Van Meerbeeck JP, Baas P, Debruyne C, Smit EF, van Klaveren RJ, Galdermans D, Lentz MA, Manegold C, Giaccone G. **A phase II EORTC study of temozolomide in patients with malignant pleural mesothelioma.** *Eur J Cancer* 2002;38:779-83
- 80) Hughes A, Calvert P, Azzabi A, Plummer R, Johnson R, Rusthoven J, Griffin M, Fishwick K, Boddy AV, Verrill M, Calvert H. **Phase I clinical and pharmacokinetic study of pemetrexed and carboplatin in patients with malignant pleural mesothelioma.** *J Clin Oncol* 2002;20:3533-44
- 81) Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, Gatzemeier U, Boyer M, Emri S, Manegold C, Niyikiza C, Paoletti P. **Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma.** *J Clin Oncol* 2003; 21:2636-44
- 82) Ceresoli GL, Zucali PA, Gianoncelli L, Lorenzi E, Santoro A. **Second-line treatment for malignant pleural mesothelioma.** *Cancer Treatment Reviews* 36 (2010) 24–32
- 83) Janne PA, Wang XF, Krug LM, Hodgson L, Vokes EE, Kindler HL. **Sorafenib in malignant pleural mesothelioma (MM): a phase II trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 30307).** In: **2007 ASCO annual meeting proceedings Part I,** *J Clin Oncol* 2007;25(18S (June 20 Supplement)):7707
- 84) Nowak A, Millward M, Francis R, et al. **Phase II study of sunitinib as second-line therapy in malignant pleural mesothelioma (MPM).** In: *Proceedings of the IX international conference of the IMIG (International Mesothelioma Interest Group), Amsterdam (The Netherlands)* 2008;abstr. 116
- 85) Garland LL, Chansky K, Wozniak A, et al. **SWOG S0509: a phase II study of novel oral antiangiogenic agent AZD2171 (NSC-732208) in malignant pleural mesothelioma.** *J Clin Oncol* 2009;27:15s (Suppl; abstr. 7511)
- 86) Garland LL, Chansky K, Wozniak A, et al. **SWOG S0509: a phase II study of novel oral antiangiogenic agent AZD2171 (NSC-732208) in malignant pleural mesothelioma.** *J Clin Oncol* 2009;27:15s (Suppl; abstr. 7511)
- 87) Zucali PA, Gregorc V, Ceresoli GL, et al. **NGR-hTNF, a novel vascular targeting agent (VTA), as second-line therapy in malignant pleural mesothelioma (MPM): preliminary results of a multicenter phase II trial.** In: *Proceedings of the IX international conference of the IMIG (International Mesothelioma Interest Group), Amsterdam (The Netherlands)* 2008;abstr. 10

- 88) Jackman DM, Kindler HL, Yeap BY, et al. **Erlotinib plus bevacizumab in previously treated patients with malignant pleural mesothelioma.** *Cancer* 2008;113:808–14
- 89) Ramalingam SS, Belani CP, Ruel C, et al. **Phase II study of belinostat (PXD101), a histone deacetylase inhibitor, for second line therapy of advanced malignant pleural mesothelioma.** *J Thorac Oncol* 2009;4:97–101
- 90) Prewitt TW, Lubensky IA, Pogrebniak HW, Pass HI. **Orthotopic implantation of mesothelioma in the pneumonectomized immune-deficient rat: a model for innovative therapies.** *Int J Cancer* 1993;55(5):877-80
- 91) Kane AB. **Animal models of malignant mesothelioma.** *Inhal Toxicol* 2006;18(12):1001-4
- 92) Opitz I, Lardinois D, Arni S, Hillinger S, Vogt P, Odermatt B, Rousson V, Weder W. **Local recurrence model of malignant pleural mesothelioma for investigation of intrapleural treatment.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;31:772-8
- 93) L. Ampollini, F. Sonvico, E. Barocelli, A. Cavazzoni, R. Bilancia, C. Mucchino, A.M. Cantoni, P. Carbognani **Intrapleural polymeric films containing cisplatin for malignant pleural mesothelioma in a rat tumour model: a preliminary study** *Eur J Cardiothoracic Surg* 2009; 1010-7940/5
- 94) Astoul P, Picat-Joossen D, Viallat JR, Boutin C. **Intrapleural administration of interleukin-2 for the treatment of patients with malignant pleural mesothelioma: a Phase II study.** *Cancer* 1998;83(10):2099-104
- 95) Ampollini L, Soltermann A, Felley-Bosco E, Lardinois D, Arni S, Speck RF, Weder W, Opitz I. **Immuno-chemotherapy reduces recurrence of malignant pleural mesothelioma: an experimental setting.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2009;35(3):457-6
- 96) Laurent Greillier, Suzanne Monjanel-Mouterde, Anne Fraticelli, Bénédicte Devictor-Pierre, Julien Bouvenot, Nicolas Coltel, Gérald Lamarche, Philippe Astoul. **Intrapleural Administration of Pemetrexed: A Pharmacokinetic Study in an Animal Model.** *J Thorac Oncol* 2009;4: 404–408