



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

Scuola di Dottorato: BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE

Indirizzo: INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI

Ciclo: XXII

“Ruolo dei Farmaci Antinfiammatori e Antileucotrienici nel prevenire la Fibrosi Capsulare Periprotesica nella Ricostruzione Mammaria post oncologica”

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pierpaolo Parnigotto

Coordinatore d'indirizzo: Ch.ma Prof.ssa Mariateresa Conconi

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Roberta Cortivo

Dottorando: Dr. Antonio Tambuscio

ABSTRACT

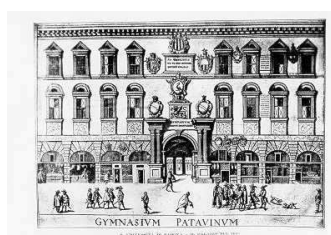
La capsula, tessuto neoformato attorno agli impianti mammari in gel di silicone (espansori tessutali e protesi), costituisce una reazione fibrotica da corpo estraneo. Il risultato finale della ricostruzione mammaria, a distanza di tempo, è esteticamente naturale e ben tollerato dalla paziente in misura inversamente proporzionale all'entità di tale reazione (e quindi all'ipertrofia della capsula stessa). Una selezione di pazienti sottoposte a mastectomia per motivi oncologici e a ricostruzione mammaria con protesi, previa espansione cutanea con espansore riempito di soluzione salina, è stata suddivisa in 3 gruppi di studio. Di essi i primi due sono stati sottoposti rispettivamente a trattamento farmacologico (durante tutta la fase di espansione) con farmaci antinfiammatori Cox2ib (etoricoxib) e antileucotrienici anti-LTC₄, LTD₄, LTE₄ (zafirlukast). Il terzo gruppo (di controllo) non è stato sottoposto ad alcuna terapia. Durante l'espansione cutanea sono stati eseguiti prelievi ematici per il dosaggio sierologico dei marcatori indice di reazione fibrotica in particolare le metalloproteinasi MMP e i loro inibitori tissutali TIMP1 e TIMP2. Sono stati inoltre misurati strumentalmente i trend pressori di espansione per quantificare il grado di resistenza e la compliance del tessuto capsulare. Al termine dell'espansione è stato eseguito un prelievo di tessuto capsulare per analisi istologiche quali la misurazione degli spessori (massimo, minimo e medio) e lo studio delle componenti indice di reazione fibrotica (collagene I e IV, fibroblasti, macrofagi, miofibroblasti). Sono state inoltre dosate l'espressione genica tissutale di TGFβ e IL-2. I dati raccolti sono stati inseriti in un algoritmo valutativo per capire se e quale principio farmacologico fosse maggiormente efficace nell'inibire la fibrosi capsulare periprotetica.

L'etoricoxib e lo zafirlukast si sono dimostrati complessivamente efficaci nel prevenire e ridurre la contrattura capsulare periprotetica. L'attività dei cox2 inibitori è risultata maggiore rispetto agli inibitori dei leucotrieni. Tuttavia la potenziale cardiotoxicità dei primi, contrapposta ai bassissimi effetti collaterali dei secondi fanno preferire lo zafirlukast come farmaco di prima scelta nella ricostruzione mammaria post oncologica con materiali protesici.

Capsular tissue around silicone breast implants is a normal inflammatory reaction versus a foreign body. Capsular hypertrophy and contraction is an abnormal scar reaction to the implant and it is actually the main factor causing a poor aesthetic results of mammary reconstruction after oncologic surgery. We evaluated the efficiency of new NSAD (cox2 inhibitors - etoricoxib) and anti-leucotriene drugs (zafirlukast) in preventing capsular contraction around silicone breast implants. A selection of women scheduled for mastectomy and immediate reconstruction with tissue expander has been randomized in three groups. Group A has been treated with etoricoxib during inflating period. Group B has been treated with zafirlukast in the same period. Group C didn't take any drug (control group). After expansion we evaluated histologically the capsular tissue (thickness, cells, structural proteins), local cytokine expression (IL2- TGF Beta) and systemic concentrations of MMP and TIMP. We also assessed expansion velocity and inflating volumes during expansion. Etoricoxib and zafirlukast has been proved to be efficient in preventing capsular contraction around breast implants. The less collateral effects of zafirlukast make the drug of choice in mammary reconstruction.

INDICE

1. PREMESSE	5
Il carcinoma della mammella e il suo trattamento	5
La ricostruzione mammaria post oncologica	6
La reazione capsulare peri-protesica	7
2. SCOPO DELLO STUDIO	8
3. MATERIALI E METODI.....	8
Selezione delle pazienti.....	8
Fase chirurgica iniziale	9
Fase clinica	10
Fase farmacologica	11
Fase ematologica.....	12
Fase chirurgica finale.....	12
Fase istologica.....	13
Raccolta dei dati.....	14
4. RISULTATI.....	15
Pressioni.....	15
Istologia	16
Espressione genica	20
Siero.....	20
5. DISCUSSIONE.....	23
6. CONCLUSIONI.....	28
7. SEDI DELLA RICERCA E COLLABORATORI.....	30
8. SCHEDE	32
9. BIBLIOGRAFIA.....	41
10. ALLEGATI.....	43



1. PREMESSE

Il carcinoma della mammella e il suo trattamento

Il carcinoma della mammella è la più comune neoplasia delle donne nel mondo occidentale ed è superato solo da quello del polmone come causa di morte per tumore. La sua incidenza è andata molto aumentando negli ultimi vent'anni e il rischio medio per una donna di sviluppare una neoplasia della mammella è del 9.3%. La notevole diffusione dell'autopalpazione e dello screening oncologico per mezzo della mammografia ha portato, negli anni, a diagnosi sempre più precoci consentendo terapie chirurgiche meno demolitive che in passato.

Allo stato attuale, i tumori della mammella possono essere trattati con due tecniche fondamentali. La prima di esse è la **quadrantectomia** (asportazione selettiva della massa tumorale) con successiva ricomposizione della mammella tramite il rimodellamento del tessuto preservato. Questa procedura è spesso seguita, per motivi oncologici, da un ciclo di radioterapia e chemioterapia adiuvanti. La seconda tecnica di trattamento è la **mastectomia radicale modificata** che comporta l'asportazione completa della mammella preservando quanta più cute possibile. Questa procedura richiede una successiva ricostruzione mammaria (immediata o differita) in genere con materiale protesico ma necessita solo di un ciclo chemioterapico post operatorio e, generalmente, non di radioterapia.

Nonostante molti studi internazionali pongano sullo stesso piano i due approcci (quello più conservativo della quadrantectomia e quello radicale della mastectomia) in termini di efficacia, oltre il 70% delle pazienti affette da cancro della mammella è sottoposta a mastectomia radicale. Questa prevalenza è dovuta principalmente a quattro fattori. 1) Non tutte le pazienti hanno una neoplasia mammaria in stadio iniziale e quindi l'elevata estensione della resezione necessaria per asportare il tumore impedirebbe un accettabile esito estetico, specie nelle mammelle piccole. 2) La radioterapia post chirurgica necessaria in caso di quadrantectomia è fastidiosa ed impegnativa. 3) Molte donne temono il rischio (non dimostrato) di insorgenza di altri tumori causati dall'associazione radio-chemioterapica. 4) Il personale vissuto delle pazienti della loro malattia rende indispensabile la rimozione completa dell'"organo malato" per convincersi di un trattamento completo.

La ricostruzione mammaria post oncologica

Per l'aumentata conoscenza delle possibilità offerte dalla chirurgia ricostruttiva della mammella e per la sempre maggiore consapevolezza dei benefici fisici e psichici che la ricostruzione mammaria permette, la maggior parte delle pazienti affette da cancro al seno sceglie di sottoporsi a ricostruzione mammaria dopo mastectomia radicale.

Una delle tecniche ricostruttive più utilizzate e codificate è l'impianto protesico sotto il muscolo pettorale, dopo espansione cutanea. La tecnica prevede un primo tempo chirurgico, che coincide con quello demolitivo, nel quale viene posizionato un **espansore mammario** sotto il muscolo grande pettorale. Nei 2-4 mesi successivi, tramite il progressivo gonfiaggio percutaneo dell'impianto con soluzione salina, si ottiene l'espansione cutanea (Fig. 1).

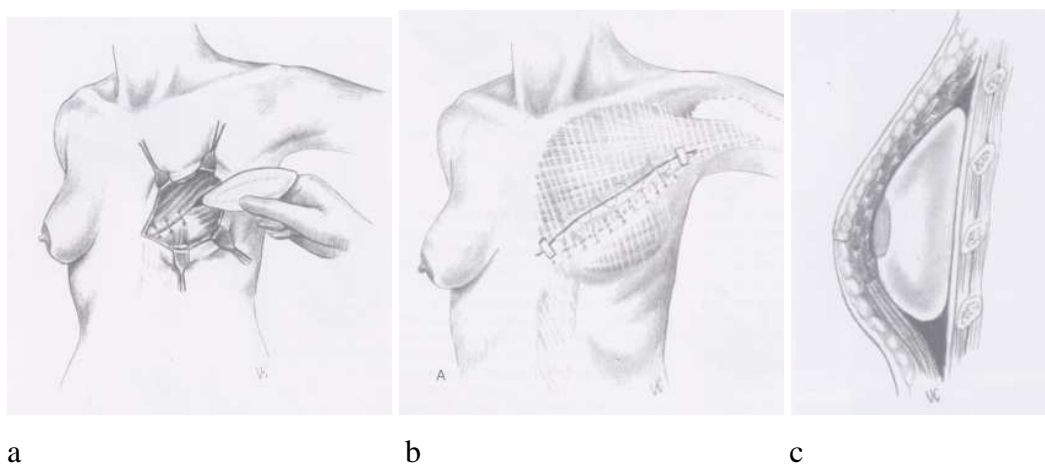
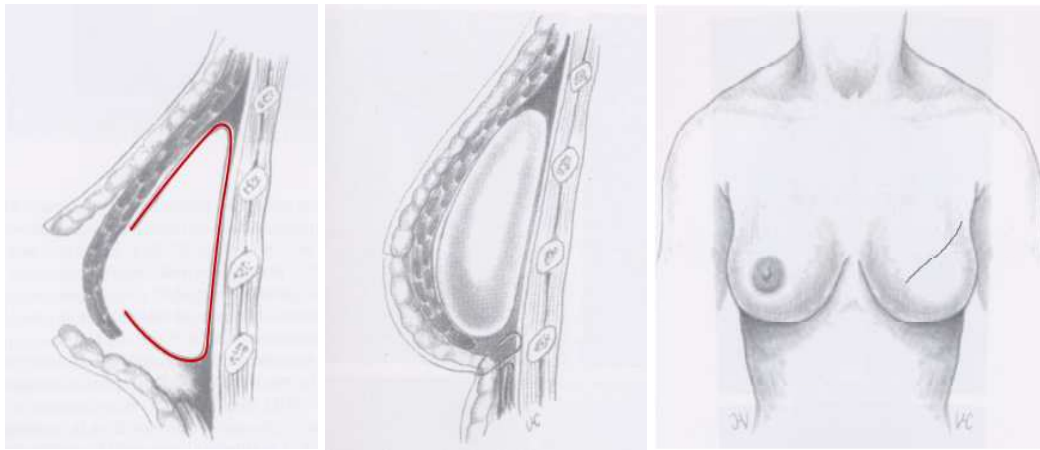


Fig. 1 – Inserimento dell'espansore mammario sotto il muscolo pettorale subito dopo la mastectomia radicale oncologica (a, b). Gonfiaggio dell'espansore mammario (c).

Il successivo tempo chirurgico consiste nel posizionare all'interno della tasca protesica una **protesi definitiva** più anatomica che sostituisca l'espansore e si adatti il più possibile alle caratteristiche della mammella sana (Fig. 2). In un terzo tempo la procedura viene completata con la ricostruzione del complesso areola-capezzolo tramite lembi locali e innesti cutanei o tatuaggio.



a b c

Fig. 2– Rimozione dell'espansore mammario al termine della fase di espansione con evidenziata in rosso la capsula peri-protesica sviluppatasi e parzialmente asportata (a). Inserimento della protesi mammaria definitiva (b). Risultato finale prima della ricostruzione del complesso areola-capezzolo (c).

La reazione capsulare peri-protesica

La **reazione capsulare** rappresenta la fisiologica risposta dell'organismo all'impianto di materiale protesico non riassorbibile. Essa è una reazione infiammatoria cronica da corpo estraneo con produzione di tessuto fibroso ricco di fibre collagene e cellule dell'infiammazione cronica, all'interfaccia tra impianto e ospite^{4, 5, 6, 8}. Il tessuto capsulare tende, nel tempo, ad aumentare di spessore e a contrarsi per circoscrivere l'impianto con una velocità che dipende in parte dal tipo di impianto utilizzato ed in parte dalla reattività individuale e dall'efficacia del sistema immunitario.

La **fibrosi capsulare periprotetica** rappresenta una delle reazioni avverse a medio e lungo termine più frequenti in chirurgia plastica sia in campo estetico che ricostruttivo¹⁵. Determinando dislocamento, visibilità dell'impianto, senso di tensione/dolore e durezza alla palpazione, essa è causa di più del 30% di tutte le revisioni chirurgiche a distanza di tempo delle protesi mammarie definitive. In tali casi le pazienti si devono sottoporre ad un ulteriore intervento di espianto, revisione della tasca protesica con asportazione della capsula e reimpianto di una nuova protesi. Ciò, ovviamente, comporta disagi notevoli e rischi non trascurabili per le pazienti nonché, grava economicamente sul Sistema Sanitario.

L'evoluzione nel tempo dei materiali e delle tecniche utilizzate per la chirurgia protesica mammaria ha consentito di diminuire significativamente il fenomeno della retrazione capsulare. L'esecuzione di interventi accurati e ben codificati che

diminuiscano il rischio di ematomi, sieromi e infezioni post operatori ha costituito un primo passo avanti^{9, 15}. L'avvento delle protesi testurizzate, che meglio si integrano con i tessuti dell'ospite, ha costituito un altro notevole miglioramento rispetto ai precedenti impianti lisci di silicone polimerizzato^{11, 19, 20, 21}. Altri presidi molto utilizzati nel ridurre la fibrosi capsulare sono i **farmaci antinfiammatori** e, soprattutto, i derivati del **cortisone**, utilizzati sia intra operatoriamente che nel periodo post operatorio a breve e medio termine^{1, 3, 14}. Infine, a partire dai primi anni duemila, un notevole fermento si è creato attorno all'utilizzo di farmaci antiastmatici **antagonisti dei leucotrieni** (Zafirlukast-Accoleit®) che hanno dimostrato, in studi minori, promettenti effetti di prevenzione delle capsuliti^{16, 18, 23} e che sono routinariamente utilizzati da molti chirurghi, soprattutto in campo estetico. Tali farmaci, sebbene ancora non esistano approfonditi studi sulla loro efficacia e meccanismo d'azione, rappresentano attualmente l'approccio alla fibrosi capsulare periprotetica più diffuso e promettente, sia a livello preventivo che come trattamento conservativo.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Il presente studio è stato impostato come uno studio di fase 2 randomizzato in aperto. Gli obiettivi sono:

1. Valutare quantitativamente e qualitativamente l'efficacia dei nuovi FANS-cox₂ib (*etoricoxib*) e dei farmaci antileucotrienici (*zafirlukast*) nel prevenire e/o ridurre la fibrosi capsulare periprotetica, identificarne i principali meccanismi di azione/inibizione e definirne l'indicazione all'utilizzo.
2. Valutare, oltre all'efficacia, il livello di "safety" dell'utilizzo "off label" dei farmaci antileucotrienici.

3. MATERIALI E METODI

Selezione delle pazienti

Una selezione di pazienti candidate a mastectomia radicale per motivi oncologici e successiva ricostruzione mammaria con espansore cutaneo e protesi definitiva è stata suddivisa randomicamente in tre gruppi di studio numericamente identici (8 per gruppo). Le pazienti selezionate appartenevano alla medesima fascia d'età 18-

65 anni e sono libere da gravi malattie concomitanti. Anche i protocolli chemioterapici adiuvanti adottati sono stati identici. I tre gruppi sono stati sottoposti a terapia domiciliare orale con i farmaci oggetto dello studio durante tutto il periodo di impianto dell'espansore mammario.

La selezione delle candidate e la loro suddivisione in gruppi omogenei di trattamento ha tenuto conto dei criteri elencati di seguito.

Criteri di inclusione

1. Pazienti affette da carcinoma mammario e con indicazione ad intervento di mastectomia radicale e ricostruzione immediata con espansore e protesi
2. Età compresa tra 18-65 anni e capacità di intendere e volere
3. Buon livello di collaboratività e affidabilità nel seguire le indicazioni
4. Pazienti che abbiano espresso in forma scritta il proprio consenso informato al trattamento (vedi Allegato A)

Criteri di esclusione

1. Gravi patologie sistemiche concomitanti o pregresse: diabete mellito grave, ipertensione arteriosa non compensata (PA>110/160), cardiopatie, vasculopatie ostruttive, insufficienza epatica o renale.
2. Scarso livello di collaboratività e affidabilità
3. Donne in stato di gravidanza o in allattamento. Un test di gravidanza è stato eseguito, ove indicato, al momento dell'arruolamento
4. Controindicazioni specifiche relativamente all'assunzione dei farmaci oggetto dello studio

Fase chirurgica iniziale

L'iter di studio del singolo paziente è iniziato con la fase chirurgica demolitiva consistita in una mastectomia sottocutanea skin sparing seguita dall'impianto, nello stesso atto operatorio, di un espansore mammario testurizzato completamente sottomuscolare modello Allergan Style 133 (LV-MV-FV). Tutti gli interventi demolitivi sono stati eseguiti dallo stesso operatore (Dott. Papaccio, chirurgia generale). L'inserimento dell'espansore mammario e tutte le successive fasi clinica e chirurgica finale sono state affidate sempre ad un unico sanitario (Dott. Tambuscio, chirurgia plastica). Dopo l'intervento demolitivo e il primo step

ricostruttivo tutte le pazienti sono state dimesse tra la 2° e la 3° giornata, in buone condizioni generali, alla rimozione dei drenaggi.



Fig. 3 – Situazione di partenza post mastectomia sinistra, prima dell’inserimento dell’espansore. A solo scopo esplicativo viene riportato un caso di ricostruzione differita in cui la paziente ha eseguito la mastectomia in un tempo precedente al primo step ricostruttivo di inserimento dell’espansore cutaneo.



Fig. 4 – Primo tempo ricostruttivo, usualmente eseguito al termine della mastectomia. Inserimento dell’espansore cutaneo e successivi gonfiaggi settimanali. La foto mostra la situazione al termine dell’espansione.

Fase clinica

Nel post operatorio le pazienti sono state sottoposte al normale protocollo di espansione mammaria con controlli ambulatoriali settimanali fino al raggiungimento del volume desiderato. Il tempo previsto per l’espansione cutanea è stato 2-4 mesi. La pressione endoprotesica raggiunta al termine di ogni seduta di gonfiaggio è stata standardizzata attraverso la misurazione non invasiva con un trasduttore di pressione. Più precisamente è stata messa a punto una procedura affidabile e facilmente riproducibile per la misurazione della pressione con un semplice monitor multifunzione della serie Propaq® (cfr. Scheda 1). Con questo metodo si sono ridotte al minimo le variazioni di spessore della capsula dovute all’atrofia da compressione. E’ stata inoltre calcolata la velocità di espansione per un volume medio e la massima espansione media per singola seduta come misura indiretta della compliance tissutale.

Fase farmacologica

Durante l'espansione (durata stimata 2-4 mesi) e quindi per tutta la durata della fase clinica, le pazienti sono state sottoposte a terapia orale con uno dei farmaci oggetto di studio secondo lo schema seguente:

- **GRUPPO A:** *Etoricoxib* 60mg/die
- **GRUPPO B:** *Zafirlukast* 40mg/die
- **GRUPPO C:** Nessuna assunzione (gruppo di controllo)

L'assunzione dei farmaci è stata bifasica. Il primo periodo è consistito in una terapia continuativa d'attacco a partire dal 7° giorno post operatorio fino al 28° giorno. Come noto infatti, buona parte della capsula fibrosa periprotesica si forma entro un mese dall'introduzione dell'impianto. Terminato il primo mese è stato prelevato un campione di sangue dalle pazienti per eseguire le prime indagini di laboratorio. Nel secondo periodo di terapia farmacologica si è alternata una settimana di assunzione a due di non assunzione fino alla rimozione dell'impianto, ciò al fine di mantenere un'azione farmacologica basale. Il protocollo di assunzione dei farmaci è schematizzato in Fig. 5.

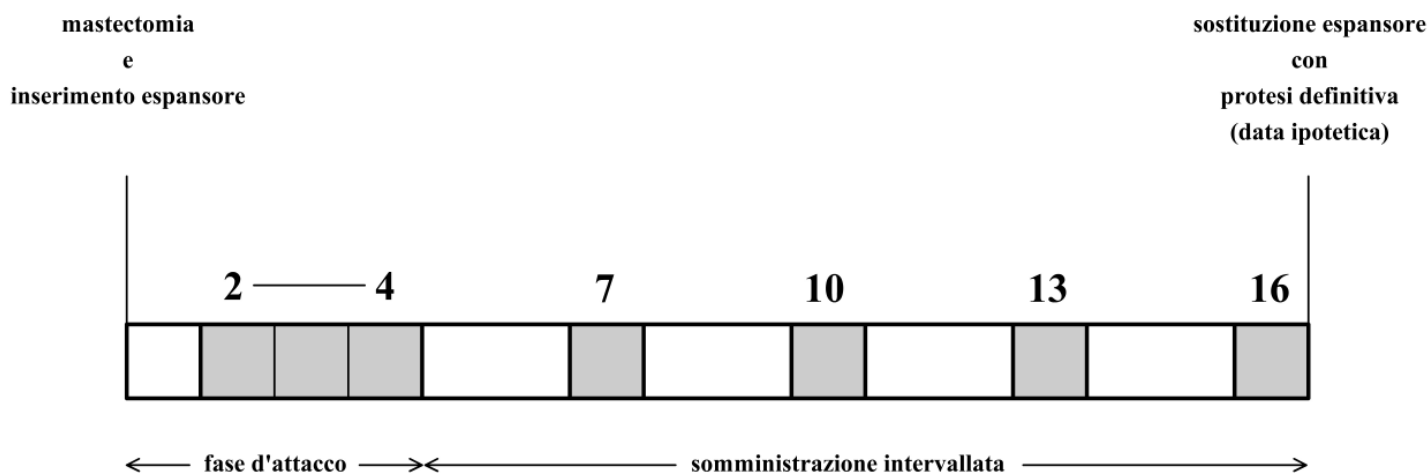


Fig. 5 – Protocollo farmacologico. Le settimane di assunzione della terapia sono segnate in grigio.

Fase ematologica

La fase ematologica è iniziata con un *prelievo sanguino* (basale) al primo ricovero per l'intervento di mastectomia. Al termine del primo periodo di terapia farmacologia continuativa è stato eseguito il secondo prelievo sanguigno. Un terzo campione è stato preso, ad espansione ultimata, durante il ricovero per eseguire l'intervento di sostituzione dell'espansore cutaneo con la protesi mammaria definitiva. I prelievi eseguiti sono stati processati e stoccati secondo un preciso protocollo (Scheda 2) ed inviate al laboratorio competente per le analisi del caso. Su tutte le provette raccolte è stato eseguito il dosaggio di:

- Metallo Proteinasi della Matrice tissutale e loro inibitori (MMP e TIMP)

E' noto infatti che sussiste uno squilibrio del rapporto TIMP/MMP nelle pazienti affette da fibrosi capsulare, con un forte aumento di TIMP₁ e TIMP₂¹⁰. La tempistica della fase di laboratorio è illustrata nella Fig. 6.

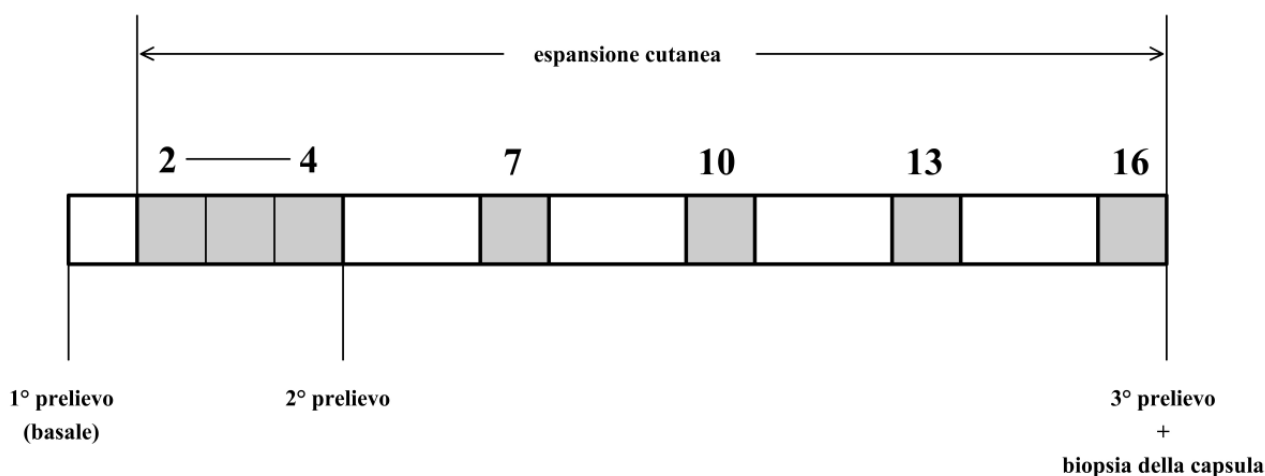


Fig. 6 – Tempistica della fase di ematologica

Le metodiche utilizzate per i dosaggi TIMP e MMP sono indicate nella Scheda 3 e nella Scheda 4.

Fase chirurgica finale

L'intervento chirurgico di sostituzione protesica prevede normalmente la rimozione totale o subtotale della capsula fibrosa formatasi attorno all'espansore per adattare la tasca mammaria alla protesi definitiva e per meglio definire il solco

sottomammario. Al termine del gonfiaggio sono stati quindi rimossi gli espansori, ne è stata controllata l'integrità ed è stato inserito al loro posto una protesi mammaria definitiva della serie Allergan Natrelle Style 410 di volume idoneo. E' stato inoltre prelevato un campione di tessuto capsulare dal polo superiore, parete anteriore, non in corrispondenza della valvola di gonfiaggio.



Fig. 7 - Secondo tempo ricostruttivo di sostituzione dell'espansore mammario con la protesi anatomica definitiva, situazione preoperatoria.



Fig. 8 - Secondo tempo ricostruttivo, 3 mesi post operatori: E' stato eseguito l'inserimento di una protesi anatomica a sinistra ed è stata eseguita una mastopessi additiva adeguativa con una seconda protesi a destra.



Fig. 9 - Terzo tempo ricostruttivo. Ricostruzione del complesso areola capezzolo di sinistra

Fase istologica

Il tessuto capsulare prelevato nella precedente fase è stato suddiviso in 5 parti di morfologia regolare delle dimensioni di 1x1 cm circa. Di esse, una è stata

immediatamente fissata in formalina ed inviata al laboratorio competente per le analisi istometriche (misurazione dello spessore della capsula).

Altri due pezzi sono stati fissati in formalina ed inviati ad altro laboratorio per le valutazioni istologiche al microscopio ottico. Più precisamente si è quantificato con conta cellulare diretta e con tecniche di marcatura immunocitochimica i seguenti parametri:

- Fibrosi e flogosi cronica (Macrofagi, PMN, CD4+, Fibroblasti e Miofibroblasti)
- Collagene (tipo I e III)

Gli ultimi due frammenti sono stati conservati a secco, immediatamente congelati a -80 ed inviati al laboratorio competente per lo studio dell'espressione genica dei seguenti marker.

- IL-2
- TGF- β
- Collagene (tipo I e III)

Il TGF- β e l'IL-2 sono citochine implicate nella maggior parte delle reazioni cicatriziali e fibrotiche^{12, 17} e pertanto si accumulano nelle capsule ipertrofiche. Altri studi sperimentali hanno concordemente dimostrato che gli inibitori del TGF- β possono ostacolare la fibrosi capsulare⁷.

Le Schede 5, 6, 7, 8 e 9 illustrano in dettaglio materiali e metodi utilizzati in questa fase.

Raccolta dei dati

I dati relativi a ciascun paziente, i risultati delle valutazioni cliniche ed istologiche e gli eventuali eventi avversi riscontrati nel corso dello studio sono stati riportati in apposite schede di raccolta dei dati (vedi Allegato D e Allegato E). Tutti i documenti sono stati custoditi in condizioni di sicurezza nella sede dello studio, nel periodo del suo svolgimento.

4. RISULTATI

Nel periodo di studio compreso tra il novembre 2007 e l'ottobre 2009 sono state arruolate e randomizzate 31 pazienti che soddisfacevano i criteri di inclusione. Nel corso dello studio sono però state escluse 16 pazienti per i seguenti motivi:

- 5 pz: necessità di eseguire radioterapia adiuvante
- 4 pz: esposizione dell'espansore o complicanze infettive locali
- 2 pz: insorgenza di concomitanti gravi patologie e/o metastasi
- 2 pz: scarsa partecipazione o inaffidabilità della paziente
- 2 pz: variazione del protocollo chemioterapico rispetto allo standard di inclusione
- 1 pz: uscita dallo studio per scelta della paziente

Le pazienti che hanno pertanto completato l'iter di ricerca sono state 15, equamente divise nei tre gruppi di indagine. Il ciclo completo di studio comprendente tutte le fasi chirurgiche (demolitiva e ricostruttive) è durato da 3 a 4 mesi.

Pressioni

Dopo alcune prove eseguite prima dell'inizio dello studio è stato stabilito arbitrariamente un valore pressorio che consentisse con buon riempimento per ogni singola seduta senza indurre eccessiva sensazione di tensione. Il valore della pressione di riempimento da raggiungere per ogni singola seduta è stato perciò fissato in 30 mmHg.

A partire dal settimo giorno post operatorio si è iniziato a gonfiare l'espansore tissutale con cadenza settimanale (fase clinica). Ad ogni seduta si è preso nota del valore pressorio di partenza, cioè non appena introdotto il catetere percutaneo dentro la valvola, si è poi proceduto al riempimento dell'espansore con soluzione fisiologica fino al raggiungimento della pressione finale di riempimento annotando il volume inserito di volta in volta. I dati raccolti sono riassunti nella Tabella 1. Sono indicati due tipi di valori. Il volume medio a 30 mmHg indica quanta soluzione fisiologica in cc si è riuscito mediamente ad inserire in ogni paziente durante le sedute settimanali di riempimento per arrivare alla pressione di riferimento. Più questo dato è alto e minore è la resistenza dei tessuti molli e della capsula alla distensione (inversamente proporzionale). Il secondo dato indica

il numero di giorni trascorsi dall'inizio del gonfiaggio per raggiungere un volume medio di riempimento comune a tutte le pazienti e stabilito essere 200cc. Minore è questo dato e minore è la resistenza offerta dai tessuti molli e dalla capsula (direttamente proporzionale). Le differenze nei dati si suppone siano determinate dall'azione farmacologica dei principi studiati in ogni gruppo.

	ID	volume medio a 30 mmHg (cc)	velocità di riempimento di 200 cc (gg)	settimane per raggiungere 200 cc	
GRUPPO A etoricoxib	8	28	50	7,1	
	9	48	29	4,1	
	11	31	45	6,4	
	15	28	50	7,1	
	17	36	45	6,4	
	media	34	±DS 8	44	±DS 9
GRUPPO B zafirlukast	2	27	52	7,4	
	6	25	55	7,9	
	21	23	62	8,9	
	32	25	56	8,0	
	36	23	60	8,6	
	media	25	±DS 2	57	±DS 4
GRUPPO C controllo	1	19	72	10,3	
	3	15	92	13,1	
	14	17	82	11,7	
	24	18	80	11,4	
	26	18	78	11,1	
	media	17	±DS 2	81	±DS 7

Tabella 1 – Pressioni interne agli espansori misurate durante le sedute di gonfiaggio. Valori medi per ogni paziente.

Istologia

Lo spessore delle capsule prelevate è stato misurato con micrometro al microscopio ottico. Sono state fatte 5 misurazioni in punti diversi ottenendo lo spessore minimo, massimo e quello medio. I risultati ottenuti suddivisi per gruppi

di studio sono riassunti nella Tabella 2. Più sottile è lo spessore della capsula e più è verosimile che il farmaco studiato sia stato efficace nel ridurre la reazione infiammatoria e la fibrosi cicatriziale.

		minimo	massimo	medio		
GRUPPO A	8	0,22	0,45	0,34		
etoricoxib	9	0,29	0,45	0,37		
	11	0,30	0,48	0,39		
	15	0,11	0,36	0,24		
	17	0,35	0,49	0,42		
					overall	0,35
GRUPPO B	2	0,75	0,87	0,81		
zafirlukast	6	0,8	1,05	0,84		
	21	0,60	0,91	0,76		
	32	0,90	1,20	1,05		
	36	0,85	0,98	0,92		
					overall	0,87
GRUPPO C	1	0,93	2,34	1,64		
controllo	3	0,85	1,70	1,28		
	14	0,93	2,34	1,64		
	24	1,10	1,42	1,26		
	26	0,67	0,80	0,74		
					overall	1,308

Tabella 2 – Spessori delle capsule misurati in millimetri

Un secondo laboratorio si è occupato della valutazione istologica quantitativa delle popolazioni cellulari d'interesse (cellule infiammatorie, fibroblasti, miofibroblasti). Il referto comune a tutti i preparati è stato “tessuto fibrotico con reazione infiammatoria da corpo estraneo e aree di metaplasia sinoviale”. Da ogni campione di tessuto sono state ricavate 6 fette e in ognuna di esse si è proceduto alla conta cellulare in quattro diversi campi facendo poi una media dei valori ottenuti. Con la stessa procedura è stata fatta una valutazione preliminare approssimativa sul livello di rappresentazione delle fibre collagene in preparati istologici con specifiche colorazioni immunoistochimiche. I dati in Tabella 3 mostrano i risultati suddivisi per gruppi di studio. Minore sono le cellule

infiammatoria e la quantità di collagene osservata e maggiore è stata la compliance della capsula.

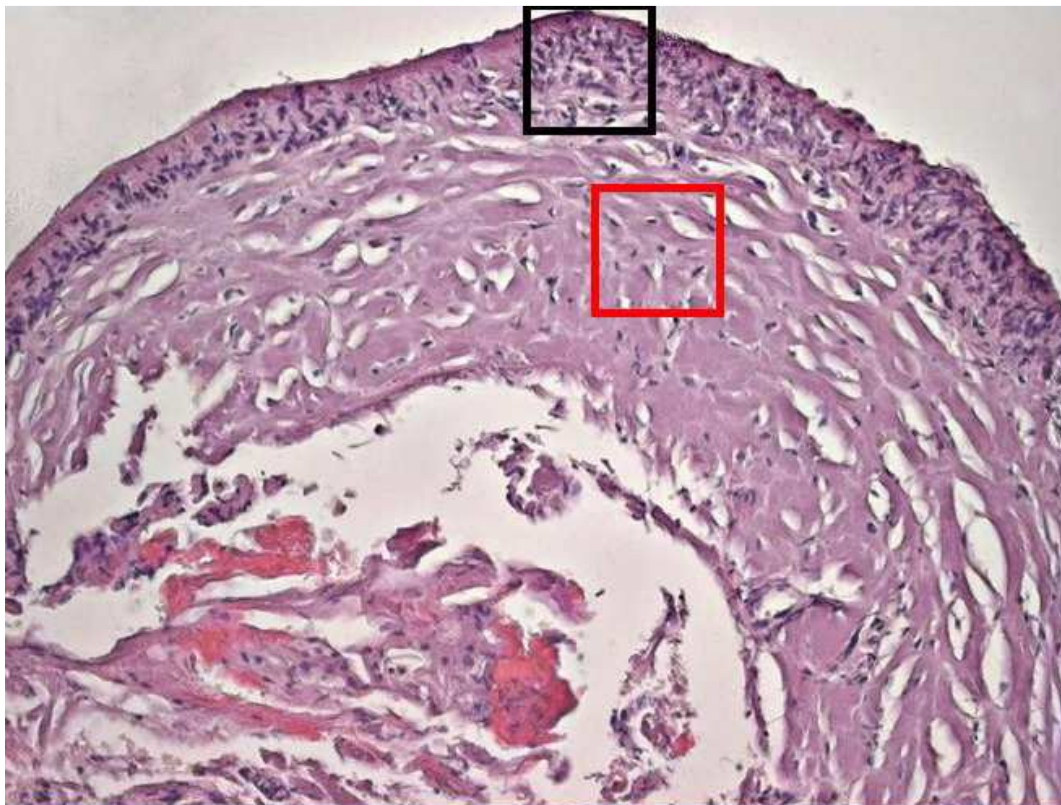


Fig. 10 – Conta cellulare. Nel quadrato nero sono indicate le cellule infiammatorie. Nel quadrato rosso i fibroblasti e miofibroblasti.

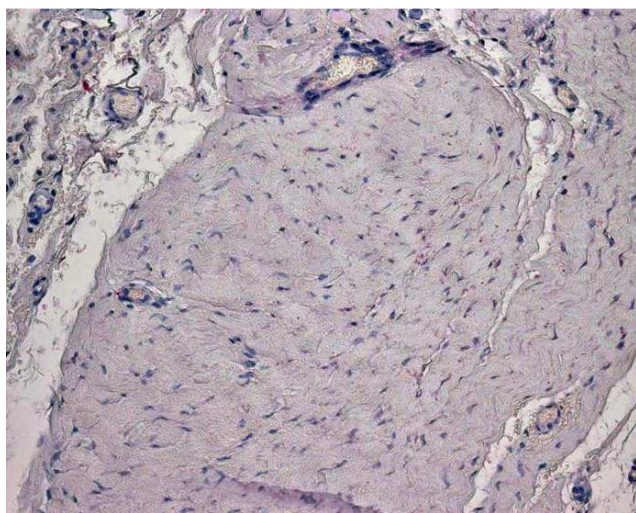


Fig. 11 – Immunoistochimica per collagene, reazione debole (+)

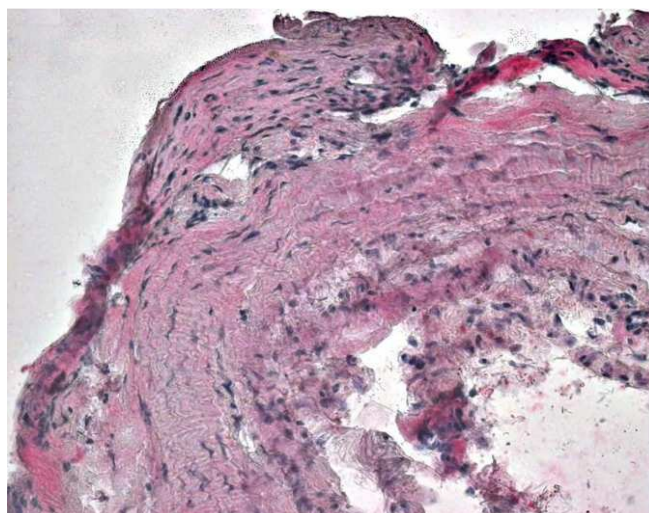


Fig. 12 – Immunoistochimica per collagene, reazione forte (++)

		Cell infiammatorie	Miofibrobl/fibroblasti	Coll I	Coll III
GRUPPO A	8	++	+	+	+
etoricoxib	9	++	++	+	+
	11	++	++	+	+
	15	++	+	+	+
	17	+	+	+	+
GRUPPO B	2	++	+	+	+
zafirlukast	6	+	+	+	+
	21	++	+	+	+
	32	+	+	+	+
	36	+	+	+	+
GRUPPO C	1	+++	++	++	++
controllo	3	++	+++	++	++
	14	+++	++	++	++
	24	+++	+++	++	++
	26	+++	++	++	++
		Cellule per campo quadrato			
Cellule		+	++	+++	
Cellule infiammatorie		0-9	10-19	Oltre 20	
Fibroblasti/miofibroblasti		0-5	6-10	Oltre 10	
Collagene		poco rappresentato	ben rappresentato		

Tabella 3 – Conte cellulari

Espressione genica

E' stata valutata l'espressione genica nei tessuti prelevati di IL2 e TGF Beta (citochine indice di flogosi e fibrosi) e del Collagene I e III (proteine strutturali responsabili della retrazione capsulare e della sua bassa compliance). I dati relativi al collagene definiscono in modo inequivocabilmente oggettivo la rappresentazione di tale molecola nei tessuti rispetto a quanto rilevato otticamente (essendo quest'ultima valutazione soggettiva e operatore dipendente). Il valore di riferimento (100%) è stato ottenuto facendo una media di tutti i valori ricavati nel gruppo di controllo. I valori indicati nella Tabella 4 sono variazioni percentuali rispetto al valore di riferimento e sono tutti direttamente proporzionali alla fibrosi capsulare

	ID	IL-2	TGF BETA	coll I	coll III
GRUPPO A	8	74	85	81	81
etoricoxib	9	75	85	67	82
	11	76	84	71	75
	15	71	81	81	71
	17	78	84	82	83
	media	74,8	83,8	76,4	78,4
GRUPPO B	2	91	93	93	92
zafirlukast	6	93	94	94	91
	21	90	92	91	90
	32	92	91	93	91
	36	93	92	95	94
	media	91,8	92,4	93,2	91,6
GRUPPO C	unico	100	100	100	100
controllo					

Tabella 4 – Espressione genica di citochine e collagene.

Siero

Con le procedure descritte è stato eseguito il dosaggio nel siero delle pazienti delle MMP e TIMP. In Tabella 5 e Tabella 6 sono riportati i valori rilevati nei dosaggi basale e a 1 mese, tempistiche di rilevamento ritenute utili al fine di poter valutare l'effetto farmacologico dal siero.

TIMP 1 - 1 BASALE						MMP 1 - 1 BASALE					
GRUPPO A (etoricoxib)		GRUPPO B (zafirlukast)		GRUPPO C (controllo)		GRUPPO A (etoricoxib)		GRUPPO B (zafirlukast)		GRUPPO C (controllo)	
8	164,06	2	177,73	1	150,74	8	5,08	2	5,44	1	2,11
9	135,51	6	103,17	3	130,50	9	3,20	6	3,66	3	5,38
11	172,93	21	169,52	14	185,53	11	3,49	21	1,78	14	3,78
15	122,61	32	133,28	24	150,74	15	3,35	32	2,73	24	4,03
17	148,21	36	155,47	26	148,05	17	3,82	36	6,33	26	2,48
media	148,7	± DS	20,5	media	147,8	± DS	30,1	media	153,1	± DS	20,0
media	3,8	± DS	0,8	media	4,0	± DS	1,9	media	3,6	± DS	1,3
TIMP 2 - 1 BASALE						MMP 2 - BASALE					
GRUPPO A (etoricoxib)		GRUPPO B (zafirlukast)		GRUPPO C (controllo)		GRUPPO A (etoricoxib)		GRUPPO B (zafirlukast)		GRUPPO C (controllo)	
8	98,74	2	119,11	1	94,86	8	147,66	2	169,54	1	184,33
9	105,47	6	88,11	3	96,20	9	188,86	6	168,61	3	175,20
11	79,69	21	92,21	14	125,83	11	145,45	21	180,44	14	218,58
15	88,11	32	106,70	24	97,32	15	161,40	32	154,43	24	119,16
17	94,21	36	118,91	26	96,50	17	164,20	36	186,51	26	149,46
media	93,2	± DS	9,9	media	105,0	± DS	14,5	media	102,1	± DS	13,3
media	161,5	± DS	17,4	media	171,9	± DS	12,3	media	169,3	± DS	37,4
MMP 9 - 1 BASALE											
GRUPPO A (etoricoxib)		GRUPPO B (zafirlukast)		GRUPPO C (controllo)							
8	190,50	2	123,26	1	75,89						
9	165,51	6	133,90	3	125,80						
11	118,53	21	160,22	14	167,79						
15	149,70	32	138,51	24	63,67						
17	141,12	36	190,50	26	285,36						
media	153,1	± DS	26,9	media	149,3	± DS	26,7	media	143,7	± DS	89,4

Tabella 5 – Dosaggi basali delle TIMP e MMP

TIMP 1 - 1 MESE									MMP 1 - 1 MESE								
GRUPPO A (etoricoxib)			GRUPPO B (zafirlukast)			GRUPPO C (controllo)			GRUPPO A (etoricoxib)			GRUPPO B (zafirlukast)			GRUPPO C (controllo)		
8	176,13		2	150,00		1	147,37		8	5,21		2	5,14		1	2,63	
9	156,37		6	104,05		3	187,71		9	3,84		6	4,51		3	4,53	
11	137,97		21	175,90		14	195,68		11	4,65		21	2,16		14	5,46	
15	134,62		32	141,77		24	180,93		15	4,07		32	2,87		24	7,31	
17	152,20		36	156,37		26	187,37		17	5,12		36	9,15		26	3,70	
media	151,5	± DS 16,6	media	145,6	± DS 26,4	media	179,8	± DS 18,9	media	4,6	± DS 0,6	media	4,8	± DS 2,7	media	4,7	± DS 1,8
TIMP 2 - 1 MESE									MMP 2 - 1 MESE								
GRUPPO A (etoricoxib)			GRUPPO B (zafirlukast)			GRUPPO C (controllo)			GRUPPO A (etoricoxib)			GRUPPO B (zafirlukast)			GRUPPO C (controllo)		
8	132,54		2	106,70		1	97,72		8	225,77		2	189,36		1	181,56	
9	120,33		6	94,25		3	101,64		9	203,35		6	190,25		3	175,25	
11	86,68		21	93,23		14	104,45		11	158,23		21	166,65		14	206,58	
15	107,71		32	117,69		24	107,31		15	221,20		32	244,97		24	159,17	
17	104,20		36	114,23		26	97,11		17	198,53		36	189,11		26	153,67	
media	110,3	± DS 17,3	media	105,2	± DS 11,2	media	101,6	± DS 4,4	media	201,4	± DS 26,7	media	196,1	± DS 29,1	media	175,2	± DS 20,9
									MMP 9 - 1 MESE								
GRUPPO A (etoricoxib)			GRUPPO B (zafirlukast)			GRUPPO C (controllo)			GRUPPO A (etoricoxib)			GRUPPO B (zafirlukast)			GRUPPO C (controllo)		
8	160,00		2	261,76		1	104,74		8	160,00		2	261,76		1	104,74	
9	256,54		6	162,43		3	125,80		9	256,54		6	162,43		3	125,80	
11	300,27		21	163,88		14	136,03		11	300,27		21	163,88		14	136,03	
15	142,47		32	154,65		24	140,20		15	142,47		32	154,65		24	140,20	
17	192,34		36	256,42		26	175,94		17	192,34		36	256,42		26	175,94	
media	210,3	± DS 66,5	media	199,8	± DS 54,2	media	136,5	± DS 25,9	media	210,3	± DS 66,5	media	199,8	± DS 54,2	media	136,5	± DS 25,9

Tabella 6 – Dosaggi a 1 mese delle TIMP e MMP

5. DISCUSSIONE

La ricostruzione mammaria post oncologica rappresenta sempre una sfida impegnativa e dal risultato talora incerto soprattutto per il frequente mutare in corso d'opera delle strategie terapeutiche oncologiche (adiuvanti) post chirurgiche. Il chirurgo ricostruttivo si trova spesso a intraprendere strade ricostruttive sulla base di dati ancora incompleti che si definiranno solo molti giorni dopo la prima fase demolitiva, una volta chiarito il quadro istologico della singola neoplasia, la stadiazione, la chemio-ormono sensibilità e, soprattutto, l'indicazione alla radioterapia. Quest'ultima, per gli effetti cronici flogistici e distrofici sui tessuti molli, rappresenta il principale fattore di insuccesso nella ricostruzione mammaria con materiale protesico portando a risultati mediamente di bassa qualità e non raramente a complicanze di natura infettiva e meccanica che rendono necessaria la rimozione degli impianti. Così può accadere che una paziente buona candidata ad una ricostruzione mammaria con una tecnica rapida e relativamente semplice, ossia tramite l'inserimento di una protesi mammaria dopo espansione cutanea, abbia alla fine dell'iter ricostruttivo un risultato esteticamente poco soddisfacente perché rovinato da una sovrapposta radioterapia, resasi necessaria solo in un secondo tempo per completare l'iter terapeutico. In questi casi è sovente mandatorio ripiegare, in corso d'opera o al termine del primo tentativo ricostruttivo, verso opzioni ricostruttive completamente diverse ricorrendo all'utilizzo di lembi locali o microchirurgici che, sebbene diano spesso risultati soddisfacenti sul piano estetico, sono gravati da maggiori difficoltà tecniche e rischi di complicanze chirurgiche a breve termine (es. necrosi del lembo). Premessi questi fattori di incertezza, talora molto frustranti per il medico e il paziente, è prioritario aumentare il tasso di successo post ricostruzione mammaria con materiali protesici. Fatte salve appunto complicanze di ordine "terapeutico", la contrattura capsulare è la principale causa di un risultato estetico poco soddisfacente. Con il presente studio si è cercato, tra i nuovi farmaci, di individuare un principio in grado di ridurre l'insorgenza della contrattura capsulare.

Si sono valutati gli effetti inibitori dei cox2ib (etoricoxib) e degli inibitori dei leucotrieni (zafirlukast) rispetto ad un gruppo di controllo sulla formazione della capsula attorno ad impianti mammari testurizzati. Sono stati valutati diversi aspetti e precisamente:

- 1) volumi e velocità di gonfiaggio degli espansori
- 2) spessore delle capsule al termine dell'espansione
- 3) tipologia e numero di cellule presenti nelle capsule
- 4) componente strutturale delle capsule (collagene I e III)
- 5) espressione genica locale di fattori di flogosi e fibrosi (IL2 e TGF Beta) e delle proteine strutturali (collagene I e III)
- 6) attività sistemica delle metalloproteinasi e dei loro inibitori (MMP e TIMP)

La misurazione dei volumi di espansione e delle velocità di gonfiaggio ha messo in evidenza interessanti differenze. Il volume di gonfiaggio per singola seduta a 30mmHg è risultato essere rispettivamente di 34cc e 25cc nei gruppi A (etoricoxib) e B (zafirlukast) e quindi significativamente più alto di quanto rilevato nel gruppo C di controllo (17cc; $p<0.05$). E' emersa altresì una differenza significativa tra i gruppi A e B con volumi di gonfiaggio maggiori nelle pazienti trattate con etoricoxib ($p<0.05$) (Tabella 7).

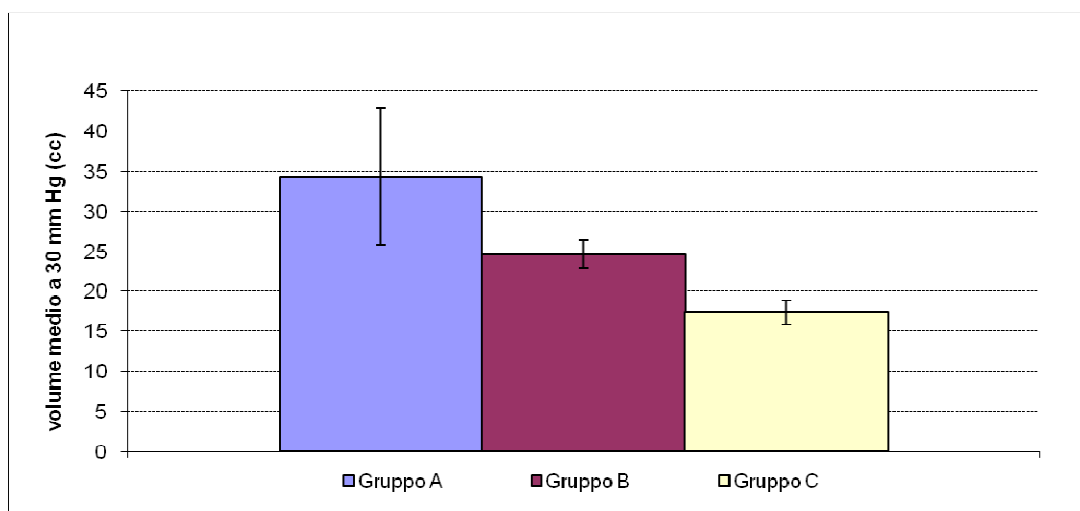


Tabella 7 – Volume medio a 30 mmHg (\pm DS)

La velocità di riempimento a 200cc è stata anch'essa significativamente diversa fra i gruppi ed inversamente proporzionale a quanto rilevato per i volumi ($p<0.05$). Le velocità riscontrate sono state 44gg, 57gg e 87gg rispettivamente nei gruppi A, B e C (Tabella 8).

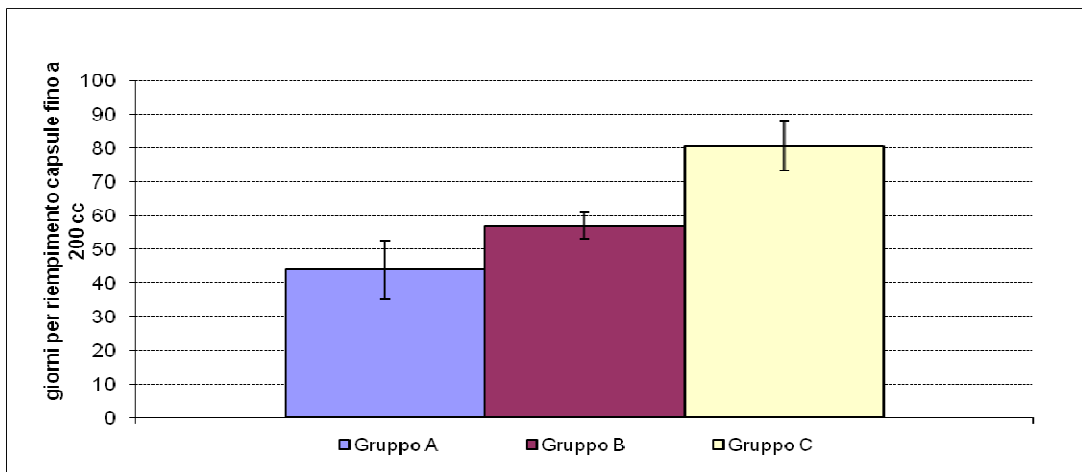


Tabella 8 – Velocità di riempimento a 200cc espressa in giorni (\pm DS)

I dati relativi agli spessori delle capsule misurati al termine dell'espansione hanno messo in evidenza differenze significative tra i vari gruppi di studio (Tabella 9).

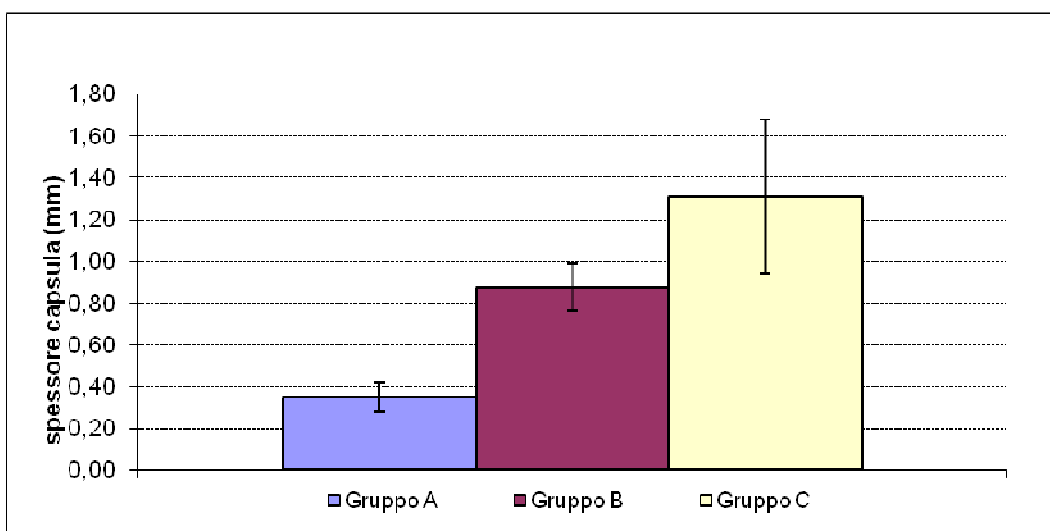


Tabella 9 - Spessori medi delle capsule (\pm DS)

Lo spessore medio delle capsule nelle pazienti trattate con etoricoxib e zafirlukast è stato rispettivamente di 0.35 e 0.87 mm, significativamente più basso di quanto rilevato nel gruppo di controllo (1,30mm; $p < 0.05$). Sono inoltre emersi spessori più sottili nel gruppo dell'etoricoxib rispetto a quello dello zafirlukast ($p < 0.05$).

La tipologia e il numero delle cellule presenti nelle capsule è stata stimata otticamente al microscopio. Le cellule infiammatorie e i fibroblasti/miofibroblasti contati nelle capsule dei gruppi A e B, pur senza una precisa valutazione statistica, risultano chiaramente minori rispetto a quanto rilevato nel gruppo C di

controllo. Le valutazioni della componente strutturale fatte sulle sezioni con colorazioni specifiche per il collagene tipo I e III, sono concordi (Tabella 3).

L'espressione genica locale è stata misurata e comparata fra i gruppi di studio per ognuna delle quattro molecole studiate. I dati ottenuti sono riportati come variazione percentuale rispetto ad un valore di riferimento (100%) ottenuto facendo una media dei valori del gruppo di controllo (Tabella 10). Per ognuna delle quattro molecole analizzate (IL2, TGF Beta, Collagene I e III) i risultati sono stati concordi e hanno mostrato un'espressione minore nei gruppi A e B rispetto al gruppo C con differenze significative anche tra l'etoricoxib e lo zafirlukast ($p < 0.05$).

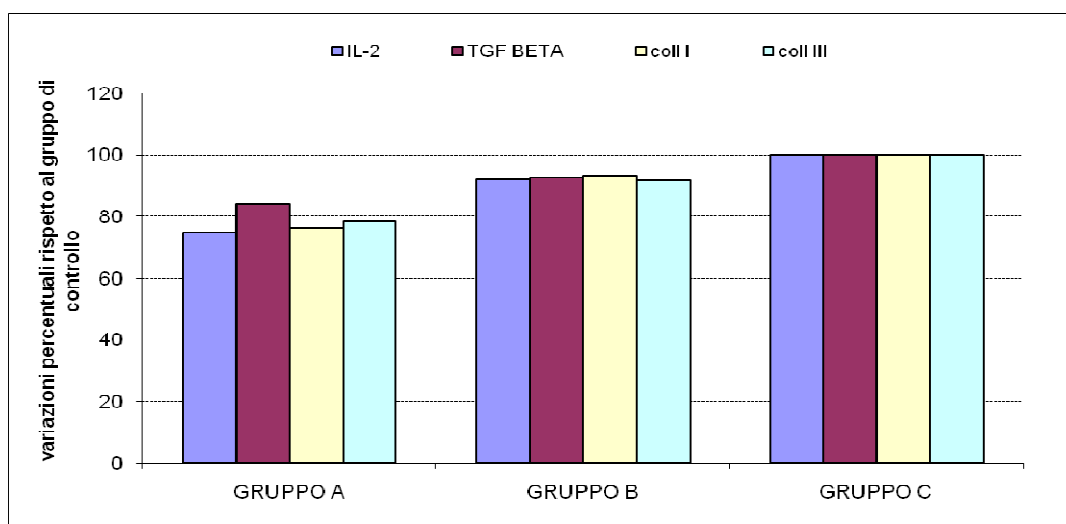


Tabella 10 – Espressione genica di IL2, TGF Beta, Collagene I e III come variazioni percentuali rispetto al gruppo di controllo.

Le concentrazioni sieriche delle metalloproteinasi e dei loro inibitori sono state misurate prima del trattamento chirurgico (prelievo basale), ad un mese dall'intervento (ossia al termine della terapia farmacologica continuativa) e al termine dell'espansione. Al fine della valutazione dell'effetto sierico dei farmaci studiati si sono valutati i valori basali e quelli ad 1 mese.

Le concentrazioni basali di tutte le molecole non hanno evidenziato differenze significative tra i diversi gruppi di studio. I valori ad un mese hanno messo invece in evidenza un'espressione significativamente più alta di TIMP1 (179.8 ng/ml \pm DS) nel gruppo di controllo rispetto ai gruppi A e B (rispettivamente 151.5 ng/ml \pm DS e 153.0 ng/ml \pm DS; $p < 0.05$) con differenze non significative tra questi ultimi due (Tabella 11).

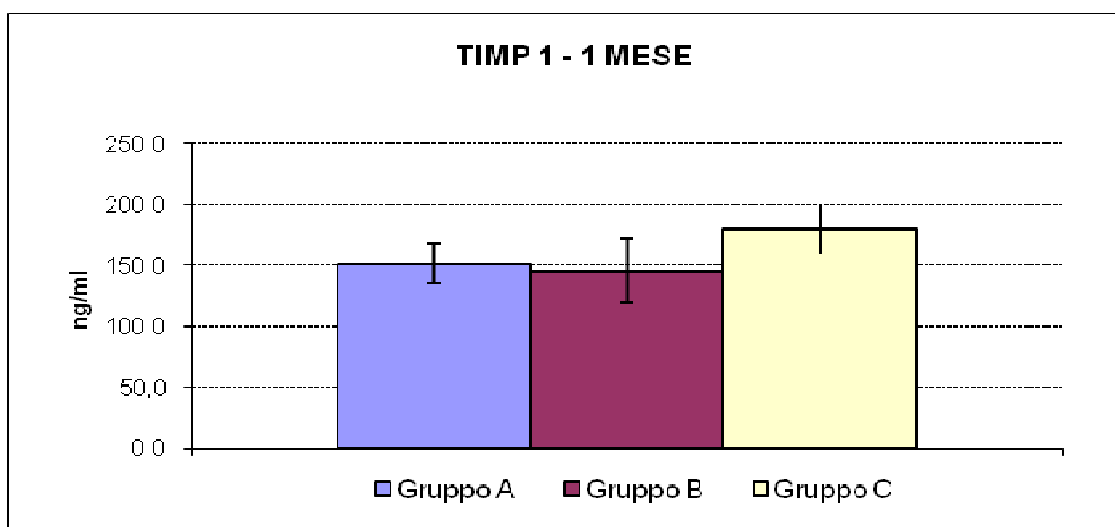


Tabella 11 – Concentrazione sierica di TIMP1 a 1 mese (±DS).

Nessuna differenza significativa è stata rilevata per TIMP2 ed MMP1 ad 1 mese. La MMP2 ad 1 mese è risultata invece significativamente meno concentrata nel gruppo di controllo C (175.2 ng/ml ±DS) rispetto ai gruppi farmacologici A e B (rispettivamente 201.4 ng/ml ±DS e 196.1 ng/ml ±DS; $p < 0.05$) senza differenze significative tra questi ultimi due (Tabella 12).

Analogamente la MMP9 ad 1 mese è stata meno concentrata nelle pazienti non trattate farmacologicamente (136.5 ng/ml ±DS) rispetto a quelle che hanno assunto etoricoxib e zafirlucast (204.6 ng/ml ±DS e 199.8 ng/ml ±DS; $p < 0.05$). Nessuna differenza significativa è stata invece rilevata tra i gruppi A e B (Tabella 13).

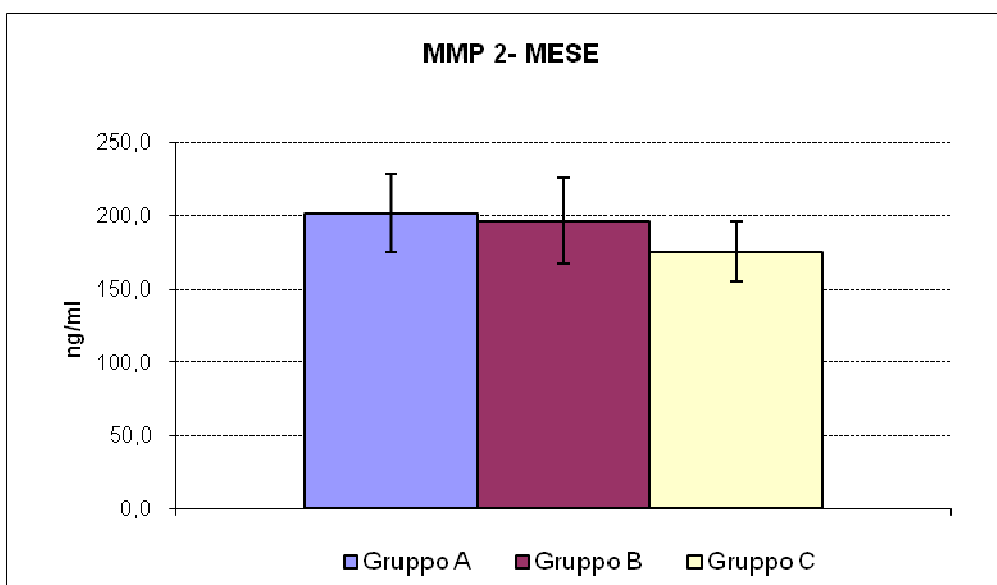


Tabella 12 – Concentrazione sierica di MM2 a 1 mese (±DS).

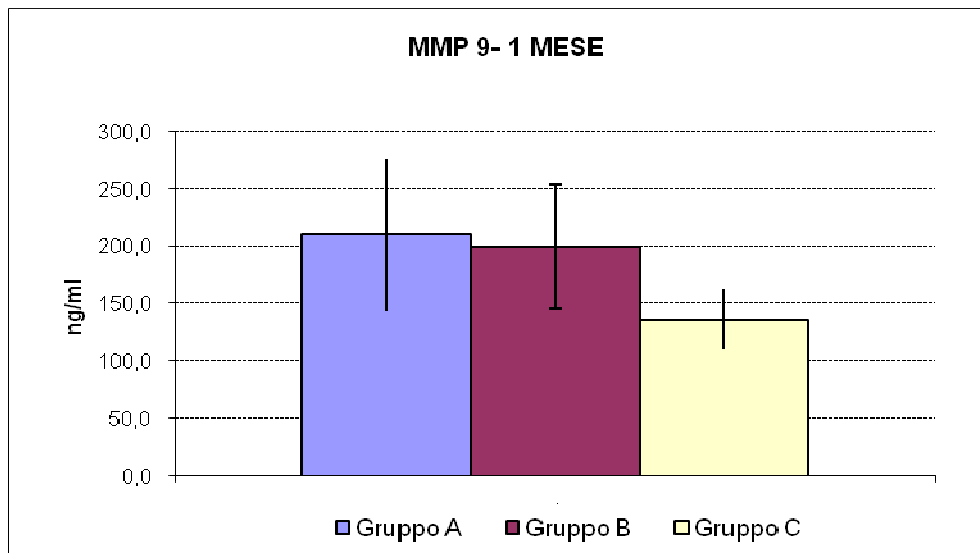


Tabella 13 – Concentrazione sierica di MMP9 a 1 mese (\pm DS).

6. CONCLUSIONI

Il presente studio, fra i tanti presenti in letteratura svolti con l'intento di studiare la reazione capsulare periprotetica e capirne i meccanismi farmacologici di inibizione, è il primo ad aver incrociato dati sistemici (sierologici), locali (istologici e di espressione genica) e misurazioni più squisitamente fisiche (volumi e pressioni).

Le misurazioni cliniche dei trend pressori e di volume hanno messo in evidenza differenze significative tra i gruppi farmacologici e il gruppo di controllo. Le espansioni cutanee delle pazienti trattate con etoricoxib e zafirlukast sono procedute più velocemente rispetto alle pazienti non trattate farmacologicamente. Sono risultati infatti significativamente più alti i volumi medi inseriti per arrivare a 30 mmHg ad ogni seduta (34cc, 25cc rispettivamente nei gruppi farmacologici e 17cc nel gruppo di controllo) e, analogamente, la velocità di espansione tissutale per un volume prefissato è stata maggiore nei gruppi A e B rispetto a C (44gg, 57gg, 84gg rispettivamente). Sebbene i dati rilevati non possano essere considerati come esclusivo indice della compliance capsulare, poiché anche i restanti tessuti molli sovrastanti influiscono sull'espandibilità (muscolo gran pettorale, sottocute, cute, etc..) va comunque detto che il tessuto capsulare neoformato è la principale componente di resistenza. Le pazienti trattate farmacologicamente hanno quindi formato capsule dalle caratteristiche meccaniche migliori in termini di elasticità, ed espandibilità. Sono state

riscontrate anche differenze significative tra le pazienti trattate con etoricoxib e zafirlukast, con una maggiore efficacia del primo.

I dati “fisici” hanno mostrato una correlazione con gli spessori capsulari. Le capsule dei gruppi A e B sono risultate mediamente più sottili rispetto al gruppo C (rispettivamente 0,33mm, 0,87mm, 1,30mm) e quelle delle pazienti trattate con etoricoxib significativamente più sottili anche di quelle che hanno assunto zafirlukast. Poiché i valori pressori sono stati omogeneizzati durante tutta la fase di espansione attraverso il raggiungimento di una pressione “target” alla fine di ogni seduta e le sedute di riempimento si sono svolte con cadenza settimanale in tutte le pazienti, si può ragionevolmente escludere un effetto atrofico da compressione sulle capsule. E’ invece ipotizzabile un meccanismo di inibizione dell’ipertrofia su base farmacologica. Le conte cellulari sui preparati istologici hanno evidenziato una minore componente infiammatoria e fibrotica nelle capsule dei gruppi farmacologici rispetto alle pazienti che non hanno assunto farmaci. Non si sono riscontrate invece differenze cellulari quantitative tra i gruppi A e B. Ciò può essere suggestivo di una minore “attività” delle capsule delle pazienti trattate con etoricoxib rispetto allo zafirlukast. A conferma di questa ipotesi ci sarebbero i risultati di espressione genica locale dei fattori di infiammazione e fibrosi (IL2, TGF Beta) e delle proteine strutturali (collagene I e III). Le capsule dei gruppi A e B hanno mostrato un’espressione locale minore di tali molecole con differenze significative anche tra etoricoxib e zafirlukast. I tessuti prelevati dalle pazienti del gruppo A sono risultati in assoluto meno “attivi” dal punto di vista infiammatorio e fibrotico.

Il dosaggio sierico delle metalloproteinasi ha consentito di avere una visione più sistemica degli effetti farmacologici. I valori basali di TIMP1, TIMP2, MMP1, MMP2, MMP9 non hanno mostrato differenze fra i gruppi, ciò a dimostrazione di una uniformità di base tra le pazienti prima dei trattamenti farmacologici. Le misurazioni effettuate ad un mese, al termine quindi della terapia farmacologica continuativa, non hanno mostrato differenze fra i gruppi per TIMP2 e MMP1 ma hanno dato risultati interessanti per le altre molecole. Le concentrazioni medie di TIMP1 ad 1 mese sono state significativamente più alte nel gruppo di controllo rispetto ai due gruppi farmacologici. Tra questi ultimi due non si sono riscontrate differenze significative. I dati ad un mese relativi a MMP2 e MMP9 hanno analogamente mostrato differenze significative tra i gruppi A e B ed il gruppo di controllo C con una minore espressione delle due molecole nel gruppo di

controllo rispetto ai due gruppi farmacologici. Nessuna differenza significativa invece tra questi ultimi due gruppi. L'analisi dei dati suggerisce che gli effetti farmacologici sulle capsule possano essere in parte mediati dal rapporto tra il catabolismo delle proteine strutturali (collagene, elastina) favorito dalle MMP controbilanciate dai loro inibitori tissutali, le TIMP. L'assenza di differenze significative nelle concentrazioni di TIMP e MMP ad un mese tra i due gruppi farmacologici suggerisce che il meccanismo attraverso il quale l'etoricoxib ha generato capsule migliori rispetto allo zafirlukast non si basi esclusivamente sul semplice bilancio tra metalloproteinasi e loro inibitori. Ulteriori ricerche sono necessarie per approfondire la conoscenza di tali complesse dinamiche.

L'*etoricoxib* e lo *zafirlukast* si sono dimostrati complessivamente efficaci nel prevenire e ridurre la contrattura capsulare periprotetica. L'attività dei *cox2* inibitori è risultata maggiore rispetto agli inibitori dei leucotrieni. Tuttavia la potenziale cardiotossicità dei primi, contrapposta ai bassissimi effetti collaterali dei secondi fanno preferire lo zafirlukast come farmaco di prima scelta nella ricostruzione mammaria post oncologica con materiali protesici. Tutte le pazienti trattate con Accoleit®-zafirlukast non hanno manifestato intolleranza o reazione avversa alcuna al farmaco, ciò a supporto della relativa sicurezza di un suo utilizzo off label.

7. SEDI DELLA RICERCA E COLLABORATORI

La fase chirurgica iniziale è stata svolta per la parte demolitiva dal Dott. *Guido Papaccio* dell'U.O. di Chirurgia d'Urgenza dell'Ospedale dell'Angelo di Mestre (VE) e per il primo tempo ricostruttivo dal Dott. *Antonio Tambuscio* dell'U.O. di Chirurgia Plastica (ricercatore principale). La supervisione della parte ricostruttiva è stata svolta dal Dott. *Marco Lorenzini*, primario dell'U.O. di Chirurgia Plastica di Mestre.

Le fasi clinica, farmacologica e chirurgica finale sono state svolte dal ricercatore principale.

La fase istologica, per quanto attinente alla misurazione degli spessori delle capsule, è stata svolta dal Dott. *Bruno Murer*, responsabile del servizio di Anatomia Patologica dell'Ospedale dell'Angelo di Mestre (VE). Per quanto riguarda la quantificazione delle espressioni geniche e le conte cellulari il lavoro è

stato svolto dalla Dott.ssa *Barbara Zavan* dell'Istituto di Istologia ed Embriologia dell'Università degli Studi di Padova con la supervisione della Prof.ssa *Roberta Cortivo*.

La fase ematologica è stata svolta dalla Dott.sse *Aline S.C. Fabricio* ed *Elisa Squarcina* presso il laboratorio ABO/Centro Regionale Specializzato per i Biomarcatori Diagnostici e Predittivi (ex Centro Regionale Indicatori Biochimici di Tumore – CRIBT) sotto la direzione del Dott. *Massimo Gion*, direttore del Dipartimento di Patologia Clinica dell'AULSS 12 Veneziana.

8. SCHEDE

Scheda 1: PROCEDURA PER MISURAZIONE PRESSIONE ESPANSORI (con PROPAQ)

Montaggio del sistema:

Montare il trasduttore di pressione collegando il secondo rubinetto a valle ed in serie con il primo. Montare la sacca di fisiologica e assicurarsi che tutto il circuito (comprese le uscite laterali) sia pieno d'acqua e non ci siano bolle d'aria. Agire sui vari rubinetti e sulla valvolina di gomma presente sul traduttore per far uscire l'aria. Collegare una siringa da 50cc luer lock per il riempimento (già piena e senz'aria) alla presa laterale del rubinetto inferiore. Tenere il rubinetto inizialmente in verticale, escludendo la siringa. Montare un'agocannula rosa da 20g sul terminale del circuito e rimuovere la cannula di plastica tenendo solo l'ago.

N.B. Prima di iniziare accertarsi che il trasduttore di pressione sia saldamente montato sulla piantana e sia collocato esattamente all'altezza della valvola sull'espansore da riempire.



Inserimento dell'agocannula:

1. Posizionare entrambi i rubinetti in verticale escludendo le uscite laterali. Agendo sulla valvolina di gomma del trasduttore far uscire alcune gocce di fisiologica dall'agocannula (fig 1).
2. Inserire l'ago nell'espansore verificando che il punto di entrata sia alla stessa altezza del trasduttore fissato alla piantana (fig 2)

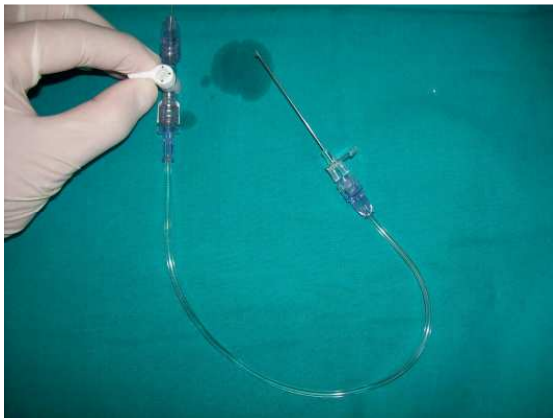


Fig 1

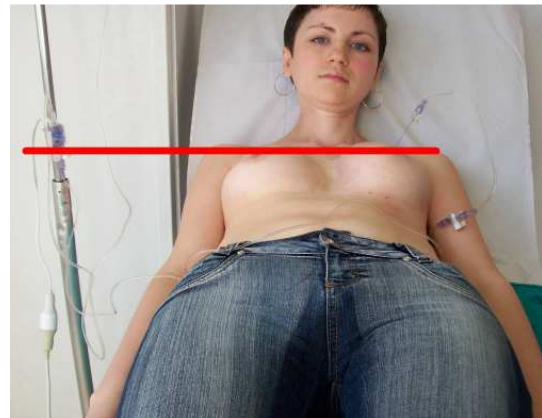


Fig 2

Azzeramento e lettura basale:

1. Accendere il monitor PROPAQ e ruotare di traverso il rubinetto alto (posto sul trasduttore) mettendo così il trasduttore di pressione in aria ambiente ed escludendo il circuito inferiore.
2. Agendo sulla valvolina di gomma del trasduttore far uscire alcune gocce dall'uscita laterale del rubinetto (fig 3).
3. Premere il primo pulsante con la scritta ZERO P1 sulla sinistra del monitor per avviare l'azzeramento dello strumento. Attendere qualche secondo finchè non compare la scritta "zeroed" sul display
4. Posizionare il rubinetto superiore in posizione verticale escludendo l'uscita laterale e attendere alcuni secondi la lettura della pressione basale dentro l'espansore (fig 4).



Fig 3



Fig 4

Gonfiaggio e lettura:

Per il gonfiaggio e le letture si agisce esclusivamente sul rubinetto inferiore (si manovra il rubinetto superiore solo per ri azzerare il sistema)

1. Posizionare il rubinetto inferiore di traverso escludendo il circuito superiore e gonfiare l'espansore (fig 5).
2. Posizionare il rubinetto inferiore in verticale escludendo la siringa di riempimento per leggere la pressione dentro l'espansore (fig 6).



Fig 5



Fig 6

Ripetere il punto 1 e 2 fino al raggiungimento della pressione di riempimento desiderata. Estrarre l'agocannula e sostituirla per il paziente successivo.

Scheda 2: PROCESSAZIONE ED INVIO DEI CAMPIONI EMATICI

Chirurgia Plastica – Policlino Umberto I, Mestre

PROTOCOLLO DI PREPARAZIONE DI SIERO (A) ROSSA

- Lasciare la provetta a temperatura ambiente (20-25°C) per 30 min prima della centrifugazione.
- Centrifugare la provetta a 1200g per 10 min. a temperatura ambiente (20-25°C).
- I campioni lipemici o che presentano emolisi o coaguli vanno scartati.
- Stoccare il siero così ottenuto in 4 aliquote da 0,5ml in provette tipo Nalgene Cryo Vials con tappo a vite (2ml cod. n°BSM 5355, Biosigma) o provette Sarsted con tappo a vite (1.5ml cod. 72692.005) etichettate come “AI”, “AII”, “AIII”, “AIV”.
- Congelare immediatamente i campioni a -20°C.
- Congelare i campioni in posizione verticale.
- I campioni devono essere inviati al Laboratorio Analisi di Venezia.
- **I campioni devono pervenire al laboratorio entro 24 ore.**

PROTOCOLLO DI PREPARAZIONE DI SANGUE INTERO (B) VIOLA

- Congelare immediatamente i campioni a -20°C.
- Congelare i campioni in posizione verticale.
- I campioni devono essere inviati al Laboratorio Analisi di Venezia.
- **I campioni devono pervenire al laboratorio entro 24 ore.**

PROTOCOLLO PREPARAZIONE DI PLASMA CTAD (C) AZZURRA

- Subito dopo il prelievo, la provetta viene **messa in ghiaccio** fino ad essere processata
- **Entro 1 ora dal prelievo**, centrifugare la provetta a 1500 g per 20 min a +4°C.
- Raccogliere attentamente il surnatante, avendo cura di non toccare e non prelevare la fase coagulata sottostante.
- Stoccare in 4 aliquote da 0,5 ml in provette tipo Nalgene Cryo Vials con tappo a vite etichettate come “CI”, “CII”, “CIII” e “CIV”.
- Congelare immediatamente i campioni a -20°C.
- Congelare i campioni in posizione verticale.
- I campioni devono essere inviati al Laboratorio Analisi di Venezia.
- **I campioni devono pervenire al laboratorio entro 24 ore.**

PROTOCOLLO DI TRASPORTO

- I campioni devono essere **refrigerati** durante il trasporto.
- Il giorno successivo alla raccolta, inviare i campioni tramite trasporto interno ULSS all’ACETTAZIONE del Laboratorio Analisi di Venezia all’attenzione del **Sig. Michele Criscolo** e della **Dott.ssa Aline Fabricio**.

Scheda 3: DOSAGGIO TIMP-1 e TIMP 2 con metodo la ELISA

Per il dosaggio degli inibitori TIMP-1 e TIMP-2 è stata utilizzata la metodica ELISA seguendo le indicazioni del produttore del kit Quantikine® Human TIMP-1 e Quantikine® Human TIMP-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Lo standard liofilizzato è stato ricostituito con acqua distillata, così da ottenere una soluzione stock di 10 ng/ml. A partire da tale soluzione è stata costruita la curva standard a 7 punti effettuando diluizioni seriali 1:2 con l'apposito diluente (range compreso tra 10 pg/ml e 0,156 ng/ml). In ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl del tampone di dosaggio (assay diluent RD1X) e successivamente sono stati caricati sulla piastra in duplicato 50 µl del bianco, degli standard o dei campioni previamente diluiti (diluizione 1:100 in calibrator diluent RD5P per il dosaggio di TIMP-1; diluizione 1:50 per il dosaggio di TIMP-2). E' stata poi effettuata una prima incubazione di 2 ore a temperatura ambiente in agitazione per permettere il legame dell'analita all'anticorpo primario immobilizzato sulla piastra. Tutto ciò che non si è legato è stato eliminato attraverso una serie di lavaggi con l'apposito tampone. Sono stati aggiunti 200 µl di anticorpo secondario coniugato con perossidasi a ciascun pozzetto, e la piastra è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente nel caso del dosaggio di TIMP-1 e per 2 ore durante il dosaggio di TIMP-2, sempre in agitazione. In seguito ad ulteriori lavaggi, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 200 µl del substrato (cromogeno tetrametilbenzidina attivato da perossido di idrogeno). È stata quindi effettuata un'incubazione di 30 minuti al riparo dalla luce. La reazione colorimetrica è stata bloccata dall'aggiunta, ad ogni pozzetto, di 50 µl di acido solforico 2 N, che determina il viraggio del colore da azzurro a giallo. La lettura della piastra è stata eseguita allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 450 nm e corretti con una lettura alla lunghezza d'onda di 540 nm. Le concentrazioni di TIMP-1 o di TIMP-2 sono state ottenute per interpolazione dei valori di densità ottica rilevati sulla curva standard, sono state corrette tenendo conto del fattore di diluizione ed espresse in ng/ml.

Scheda 4: MISURAZIONE delle MMP-1, MMP-2 e MMP-9 con metodo MULTIPLEXING

La tecnologia multiplexing (x-MAP) sviluppata dalla ditta Luminex., è un sistema di dosaggio in sospensione che si serve di microsferi in polistirene del diametro di 5,6 micrometri come fase solida. Tali microsferi sono marcate internamente con differenti proporzioni di due fluorofori differenti (rosso e infrarosso) e ogni fluoroforo può avere 10 possibili livelli di intensità di fluorescenza (10 intensità di rosso e 10 intensità di infrarosso) creando così un set di 100 microsferi spettralmente distinguibili. Ciascuna di tali 100 microsferi è coniugata covalentemente con un anticorpo monoclonale di cattura specifico per un unico analita come ad esempio una citochina. Tali microsferi coniugate reagiscono in un pozzetto di una micropiastra con il campione in analisi contenente una quantità sconosciuta di proteina (citochina) da dosare, la quale sarà catturata dall'anticorpo monoclonale. Successivamente viene aggiunto alla reazione un anticorpo secondario, di rilevazione, che è biotinilato e solitamente policlonale e si lega ad un diverso epitopo dell'analita rispetto all'anticorpo primario monoclonale andando a formare un sandwich di anticorpi attorno alla proteina. Si possono così creare dosaggi multipli miscelando in un unico pozzetto set di microsferi coniugate a diversi anticorpi per testare simultaneamente più analiti in un unico campione. L'aggiunta alla miscela di reazione di una soluzione di streptavidina-ficoeritrina, che si legano all'anticorpo biotinilato, permette infine la quantificazione delle reazioni avvenute.

Nel presente studio, i campioni di siero sono stati prelevati dal congelatore (-80°C) e sono stati dosati per la quantificazione delle MMP usando i diversi kit necessari per il dosaggio multiplexing di MMP-1, MMP-2 e MMP-9 (Fluorokine® MAP Human MMP-1 Kit; Fluorokine® MAP Human MMP-2 Kit; Fluorokine® MAP Human MMP-9 Kit; Fluorokine® MAP MultiAnalyte profiling, Human MMP Base kit; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Prima di iniziare il dosaggio, i campioni di siero sono stati diluiti 1:10 per il dosaggio di MMP-1 e MMP-2 e 1:100 per il dosaggio di MMP-9 con il diluente raccomandato (calibrator diluent RD5-37) e centrifugati a 3000 g per 10 minuti a 4°C al fine di precipitare eventuali coaguli di fibrina o detriti che potrebbero inefficiare il dosaggio per problemi di occlusione della fluidica dello strumento. Per costruire la curva standard, lo standard liofilizzato è stato ricostituito con l'apposito diluente e incubato in ghiaccio per 30 minuti. I 7 punti della curva standard sono stati preparati attraverso diluizioni seriali 1:3. Per effettuare il dosaggio è stata utilizzata una filter-plate a 96 pozzetti. Questa permette il filtraggio dei fluidi di lavaggio quando collegata allo strumento di lavaggio automatizzato Bio-Plex Pro II Wash Station. In ogni pozzetto sono stati caricati 50 µl della soluzione di microsferi di polistirene coniugate con lo specifico anticorpo di cattura, ottenuta attraverso diluizione dello stock con lo specifico tampone (microparticle diluent). In seguito, 50 µl del bianco (diluente), degli standard o dei campioni sono stati caricati in duplicato. E' stata poi effettuata una prima incubazione di 2 ore a temperatura ambiente in agitazione per permettere il legame dell'analita all'anticorpo primario immobilizzato sulla microsfera. Sono stati quindi eseguiti 3 cicli di lavaggi della piastra con tampone di lavaggio e successivi filtraggi utilizzando il Bio-Plex Pro II Wash Station. In seguito, sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 25 µl di soluzione di anticorpo secondario diluito secondo la scheda tecnica del kit e la piastra è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione. Dopo un ulteriore lavaggio, 50 µl di fluoroforo costituito dal complesso streptavidina-ficoeritrina, diluito con il tampone di lavaggio sono stati aggiunti a ciascun pozzetto. In questa fase, l'incubazione è stata effettuata per 30 minuti e successivamente sono stati effettuati altri 3 cicli di lavaggi e relativi filtraggi. Durante tutto il dosaggio, si è prestata speciale attenzione a mantenere le microsferi al buio poiché queste sono fotosensibili. Infine a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di tampone di lavaggio per risospendere le microsferi e la piastra è stata letta con lo strumento Bio-Plex (Bio-Plex Suspension Array System, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). L'analisi dei dati è stata eseguita per mezzo del software BioPlex Manager 4.0

(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) che effettua una completa analisi delle informazioni ricavate dalle microsfere. I risultati vengono espressi come mediana dell'intensità di fluorescenza per ogni classe di microsfere. Tutti i segnali sono stati normalizzati sottraendo la fluorescenza del bianco. Le curve standard sono state calcolate con un modello di regressione logistica a 5 parametri. Le concentrazioni delle MMP sono state ottenute per interpolazione dei valori di fluorescenza sulla curva standard, sono state corrette tenendo conto del fattore di diluizione ed espresse in ng/ml.

Scheda 5: INCLUSIONE IN PARAFFINA

- Formalina 10% overnight (a 4°C)
- Etanolo 50% per 1ora (2 passaggi)
- Etanolo 70% per 1ora (3 passaggi)
- Etanolo 96% per 1ora (2 passaggi)
- Etanolo 100% per 30min (2 passaggi)
- Etanolo 100% per 2-3min (1 passaggio)
- Xilene fino a diafanazione
- Paraffina pura liquida in stufa a 60°C per 1ora (2 passaggi)
- Taglio al microtomo.

Scheda 6: COLORAZIONE EMATOSSILINA – EOSINA

Xilene	5 min. (finchè non si scioglie tutta la paraffina)
Alcool etilico assoluto	(passaggio veloce)
Alcool 95%	(passaggio veloce)
Alcool 70 %	(passaggio veloce)
Alcool 50%	(passaggio veloce)
Acqua distillata	(passaggio veloce)
Ematossilina	4 minuti
Acqua distillata	5 min.
Acqua di fonte	5 min
Eosina	1 min
Acqua distillata	5 min.
Acqua di fonte	5 min
Alcool 50%	(passaggio veloce)
Alcool 70 %	(passaggio veloce)
Alcool 95%	(passaggio veloce)
Alcool etilico assoluto	(passaggio veloce)
Xilene	(finchè non si monta il vetrino per non farlo seccare)

Montare il vetrino con Pertex

Scheda 7: IMMUNOISTOCHEMICA Ab II MOUSE→APAAP

REAGENTI

- PBS
- PAP PEN (Dako) (code S2002)
- Normal *rabbit serum* (Dako 1:20) (code X0902)
- Ab I *mouse* anti-human (anti-collagene I/III e anti-fibroblasti)
- Ab II: Ig *rabbit* anti-mouse (Dako 1:25) (code Z0259)
- APAAP (Dako 1:50) (code D0651)
- Substrato (Sigma FAST RED)
- Ematossilina
- Glycergel (Dako code C0563)

PROCEDIMENTO

- sparaffinare con la scala discendente degli alcoli
- Identificare le sezioni e circondarle con la PAP PEN.
- Nella cameretta umida incubare il siero di RABBIT per 20 minuti (diluito 1:20 in PBS)
- Togliere il siero e incubare l'Ab I isolato in MOUSE alla concentrazione e per un tempo dipendente dal tipo di proteina da identificare. In genere l'incubazione dura 1 h nella cameretta umida.
- Lavare i vetrini con PBS.
- Incubare Ig RABBIT anti-mouse per 30 minuti (diluite 1:25 in PBS).
- Lavare i vetrini con PBS.
- Incubare con APAAP per 30 minuti.
- Lavare i vetrini con PBS (delicatamente per evitare che si stacchi l'enzima)
- Incubare il substrato FAST RED (sciogliere le due compresse in 1 ml di H₂O milliQ) per 20 minuti (finchè non si osserva la colorazione rosa)
- Lavare i vetrini con H₂O milliQ
- Controcolorare i nuclei delle sezioni con Ematossilina (per 4 minuti)
- Lavare l'eccesso di colorante con H₂O milliQ e fissare con H₂O di fonte.
- Montare i vetrini utilizzando un montante acquoso (Glycergel).

**Scheda 8: SINTESI DI cDNA MEDIANTE M-MLV RT
(kit Invitrogen)**

Per 20 μL di volume di reazione utilizzare 1 ng-5 μg di RNA totale o 1–500 ng di mRNA.

In un'eppendorf nucleasi-free mescolare:

- 1 μL di Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- 1 ng – 5 μg di RNA totale (di solito 500 ng di RNA totale)
- 1 μL di dNTP Mix 10 mM
- H₂O distillata nucleasi-free fino a 12 μL

Scaldare la mix a 65°C per 5 min, poi trasferire velocemente in ghiaccio.

Centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto sul fondo del tubo e successivamente aggiungere:

- 4 μL di First-Strand Buffer 5X
- 2 μL di DTT 0,1 M
- 1 μL di RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μL)

Mescolare delicatamente la mix e incubare a 37°C per 2 min.

Aggiungere 1 μL di M-MLV RT (200 U/ μL) e mescolare spipettando delicatamente.

Incubare a 37°C per 50 min.

Inattivare la reazione riscaldando a 70°C per 15 min.

Il cDNA così ottenuto può essere utilizzato come template per l'amplificazione in PCR.

Scheda 9: REAL-TIME PCR
(con FastStart Taqman Probe Master - Roche)

PROTOCOLLO:

In un'epENDORF da 200 µL preparare una mix per 25 µL di reazione, aggiungendo nell'ordine i seguenti componenti:

Componente	Volume (µL)	Conc finale
FastStart TaqMan Probe Master (2X)	12.5	1X
Universal Probe Library (10 µM)	0.25	100 nM
Primer FOR (20 µM)	0.5	400 nM
Primer REV (20 µM)	0.5	400 nM
H ₂ O RNase-DNase free (GIBCO)	8.75	
Volume finale	22.5	

Mescolare delicatamente (non vortexare) e spinnare

Aggiungere 2.5 µL di cDNA e mescolare delicatamente.

CICLO di PCR:

Numero cicli	Step	Temperatura	Tempo
1	hold	95°C	10 min
35-45	denaturazione	95°C	10 sec
	annealing	60°C	30 sec
	allungamento	72°C	6 sec
1	hold	40°C	30 sec

NOTE:

- 1 Assemblare la reazione nel blocco congelato utilizzando eppENDORF da 200 µL.
- 2 Le UPL sono sensibili alla luce, quindi tenerle il più possibile al buio.
- 3 I prodotti di amplificazione dovrebbero essere corti (ca 150 bp) e la temperatura di annealing di 60°C.
- 4 La concentrazione finale dei primers dovrebbe essere compresa tra 50-600 nM; la concentrazione iniziale raccomandata è di 200 nM.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Peterson HD, Burt GB Jr. The role of steroids in prevention of circumferential capsular scarring in augmentation mammoplasty *Plast Reconstr Surg* 1974 Jul; 54 (1): 28-30
2. Spear SL, Baker JL Jr. Classification of capsular contracture after prosthetic breast reconstruction *Plast Reconstr Surg* 1995 Oct; 96 (5): 1119-23
3. Caffee HH, Rotatori DS Intracapsular injection of triamcinolone for prevention of contracture *Plast Reconstr Surg* 1993 Nov; 92 (6): 1073-7
4. Domanskis E, Owsley JQ Jr. Histological investigation on the etiology of capsule contracture following augmentation mammoplasty *Plast Reconstr Surg* 1976 Dec; 58 (6): 689-93
5. Mc Coy BJ, Person P, Cohen IK Collagen production and types in fibrous capsules around breast implants *Plast Reconstr Surg* 1984 Jun; 73 (6): 924-7
6. Prantl L, Poppl N, Horvat N, Heine N, Eisenman-Klein M Serologic and histologic findings in patients with capsular contracture after breast augmentation with smooth silicone gel implants: is serum hyaluronan a potential predictor? *Aesthetic Plast Surg* 2005 Nov-Dec; 29 (6):510-8
7. Ruiz-de-Erenchun R, Doctor de las Herrerias J, Hontanilla B Use of the transforming growth factor-beta1 inhibitor peptide in periprosthetic capsular fibrosis: experimental model with tetraglycerol dipalmitate *Plast Reconstr Surg* 2005 Oct; 116 (5): 1370-8
8. Coleman DJ, Sharpe DT, Naylor IL, Chander CL, Cross SE The role of the contractile fibroblast in the capsules around expanders and implants *Br J Plast Surg* 1993 Oct; 46 (7): 547-56
9. Becker H, Springer R Prevention of capsular contracture *Plast Reconstr Surg* 1999 May; 103 (6): 1766-8
10. Ulrich D, Lichtenegger F, Eblenkamp M, Repper D, Paulla N Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, aminoterminal propetide of procollagen type III, and hyaluronan in sera and tissue of patients with capsular contracture after augmentation with Trilucent breast implants *Plast Reconstr Surg* 2004 Jul; 114 (1): 229-36
11. Brohim RM, Foresman PA, Grant GM, Merickel MB, Rodeheaver GT Quantitative monitoring of capsular contraction around smooth and textured implants *Ann Plast Surg* 1993 May; 30 (5): 424-34
12. Kuhn A, Singh S, Smith PD, Ko F, Falcone R, Lyle WG, Maggi SP, Wells KE, Robson MC Periprosthetic breast capsules contain the fibrogenic cytokines TGF-beta1 and TGF-beta2, suggesting possible new treatment approaches *Ann Plast Surg* 2000 Apr; 44 (4): 387-91
13. Wells AF, Daniels S, Gunasekaran S, Wells KE Local increase in hyaluronic acid and interleukin-2 in the capsules surrounding silicone breast implants *Ann Plast Surg* 1994 Jul; 33 (1): 1-5
14. Lemperle G, Exner K Effect of cortisone on capsular contracture in double-lumen breast implants: ten years' experience *aesthetic Plast Surg* 1993 Fall; 17 (4): 317-23

15. Henriksen TF, Fryzek JP, Holmich LR, McLaughlin JK, Kjoller K, Hoyer AP, Olsen JH, Friis S Surgical intervention and capsular contracture after breast augmentation: a prospective study of risk factors *Ann Plast Surg* 2005 Apr; 54 (4): 343-51
16. Schlesinger SL, Ellenbogen R, Desvigne MN, Svehlak S, Heck R Zafirlukast (Accolate): a new treatment for capsular contracture *Aest Surg J* 2002 Jul; 22 (4): 329-36
17. Shah M, Rorison P, Ferguson MW Jr The role of transforming growth factors-beta in cutaneous scarring *Scarless Wound Healing* New York: Marcel Dekker 2000: 213
18. Reid RR, Greve SD, RN, BSN, Casas LA Effect of zafirlukast (Accolate) on early capsular contracture in submuscular saline augmentation mammoplasty: a single surgeon's experience Poster from Plastic Surgery 2003 Oct 25-29, San Diego, CA
19. Coleman DJ, Foo ITH, Sharpe DT Textured or smooth implants for breast augmentation? A prospective controlled trial *Br J Plast Surg* 1991; 44: 44
20. Asplund O, Gylbert L, Jurell G, Ward C Textured or smooth implants for submuscular breast augmentation: a controlled study *Plast Reconstr Surg* 1996; 97: 1200
21. Barnsley GP, Sigurdson LJ, Barnsley SE Textured surface breast implants in the prevention of capsular contracture among breast augmentation patients: a meta-analysis of randomized controlled trials *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jun;117(7):2182-90
22. Prantl L, Angele P, Schreml S, Ulrich D, Poppl N, Eisenmann-Klein M Determination of serum fibrosis indexes in patients with capsular contracture after augmentation with smooth silicone gel implants *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jul;118(1):224-9
23. Scuderi N, Mazzocchi M, Fioramonti P, Bistoni G The effects of zafirlukast on capsular contracture: preliminary report *Aesthetic Plast Surg*. 2006 Sep-Oct; 30(5): 513-20

10. ALLEGATI

Allegato A

INFORMATIVA PER LA PAZIENTE

Gentile paziente, le moderne tecniche di ricostruzione mammaria hanno consentito di migliorare notevolmente la qualità di vita delle pazienti sottoposte a mastectomia. Una delle tecniche ricostruttive più utilizzate è l'impianto protesico sotto il muscolo pettorale dopo espansione cutanea. La tecnica prevede una prima fase nella quale viene posizionato un espansore mammario sotto il muscolo grande pettorale. Nei 2-4 mesi successivi, tramite il suo progressivo gonfiaggio, si ottiene l'espansione cutanea. La fase successiva consiste nel posizionare all'interno della tasca protesica una protesi definitiva anatomica che sostituisca l'espansore e si adatti il più possibile alle caratteristiche della mammella sana.

L'inserimento di materiale protesico determina la formazione di una *capsula*, un involucro fibroso (una specie di sacchetto) attorno alla protesi. Essa rappresenta la normale risposta dell'organismo all'impianto. Purtroppo talvolta, dopo alcuni anni, questo involucro fibroso diviene eccessivamente rigido e si restringe comportando la deformazione della protesi e l'insorgenza di altri disturbi tra i quali sensazione di tensione e dolore. Il problema può essere risolto chirurgicamente rimuovendo la capsula e sostituendo la protesi. Tuttavia, talvolta, la sintomatologia può essere prevenuta, alleviata o risolta con una semplice terapia farmacologica a base di farmaci anti infiammatori di comune impiego clinico per moltissimi altri disturbi. A fronte della loro evidente validità clinica non è ancora sufficientemente chiaro il meccanismo d'azione di questi farmaci nel risolvere lo specifico problema della retrazione capsulare.

La ricerca che stiamo conducendo studia, per l'appunto, i meccanismi farmacologici di inibizione della retrazione capsulare peri-protesica nella ricostruzione mammaria. La sua adesione a tale ricerca potrà fornirci preziosi elementi di studio per ottimizzare la terapia farmacologica in tale ambito e, auspicabilmente, ridurre la necessità di un ulteriore intervento chirurgico per molte pazienti sottoposte a ricostruzione del seno. In ogni caso, il suo eventuale rifiuto non graverà in alcun modo sul normale iter ricostruttivo che abbiamo concordato.

Cordiali saluti

CONSENSO INFORMATO

La sottoscritta _____ nata a _____ il _____ con la presente acconsente ad essere inserita nel protocollo di ricerca dell'Unità Operativa di Chirurgia Plastica di questo Ospedale volto a studiare i meccanismi farmacologici di inibizione della reazione di fibrosi capsulare peri protesica nella ricostruzione mammaria. Tale ricerca non ha finalità di lucro. I pazienti inseriti nel protocollo sono totalmente esenti da ogni tipo di spesa relativamente all'approvvigionamento di farmaci o altri presidi medici. I farmaci oggetto di studio sono di comune impiego clinico e approvati dal Servizio Sanitario Nazionale. Durante lo studio alcuni campioni del suo sangue verranno analizzati presso i nostri laboratori, così come una porzione del tessuto capsulare formatosi attorno all'espansore. I campioni di sangue che lei generosamente ci donerà verranno utilizzati conformemente alle disposizioni vigenti in materia di protezione dei dati personali (D.LGS. n.196 del 30/6/2003). Qualunque informazione a lei utile giunta a nostra disposizione nel corso dello studio le verrà tempestivamente comunicata.

Premesso quanto sopra, la sottoscritta dichiara, per quanto di sua conoscenza, quanto segue:

- Di non soffrire di malattie dell'apparato digerente quali gastriti, reflusso gastro-esofageo, ulcera gastro-duodenale
- Di non soffrire di malattie renali o epatiche
- Di non essere in gravidanza o in allattamento
- Di non aver manifestato in passato reazioni allergiche ai farmaci _____, _____

Dichiara inoltre quanto segue:

- Di aver compreso bene gli intenti e le modalità della ricerca e di aver soddisfatto ogni eventuale dubbio o curiosità, dopo lettura della lettera informativa (ALLEGATO A) e colloquio con il medico curante
- Di essere a conoscenza di avere la facoltà di potersi ritirare in qualsiasi momento dallo studio
- Di non avere intenzione di intraprendere gravidanze nei sei mesi successivi alla sua inclusione nello studio e di prendere le precauzioni contraccettive necessarie

Si impegna inoltre a fare quanto segue:

- Attenersi rigorosamente alle indicazioni fornite dal medico curante circa le modalità di assunzione dei farmaci secondo la prescrizione farmacologica
- Comunicare tempestivamente al medico curante l'insorgenza di eventuali effetti indesiderati durante il periodo di studio
- Comunicare tempestivamente l'inizio di un'eventuale gravidanza

Mestre, li _____

IL MEDICO CURANTE

LA PAZIENTE

LETTERA INFORMATIVA AL MEDICO CURANTE

Dott: _____

Egregio collega, la informo che la sua assistita Sig.ra _____, portatrice di esiti di mastectomia DX/SX, in data _____ ha iniziato/inizierà la procedura di ricostruzione mammaria con materiale protesico. E' stato/verrà inserito un espansore mammario per l'espansione tissutale in preparazione all'impianto protesico definitivo. La paziente ha liberamente acconsentito ad essere inserita in uno studio randomizzato di fase 2 volto ad approfondire i meccanismi farmacologici di inibizione della reazione di fibrosi capsulare peri protesica nella ricostruzione mammaria. Tale ricerca è svolta da questa Unità Operativa di Chirurgia Plastica in collaborazione con l'Università degli Studi di Padova. La paziente è attualmente in terapia ciclica con i seguenti farmaci:

- _____
- _____

- Nessun farmaco (gruppo di controllo)

La sua assistita verrà seguita con cadenza settimanale presso il nostro Ambulatorio di Ricostruzione Mammaria al fine di completare la normale procedura di espansione tissutale e per i controlli clinici del caso. Al termine dell'espansione (2-4 mesi) la ricostruzione verrà completata, come prassi, con la sostituzione dell'espansore con una protesi mammaria definitiva. In tale occasione lo studio avrà termine, la terapia farmacologia in esame verrà sospesa e verranno eseguite delle analisi ematochimiche. Nel caso in cui dovessero insorgere reazioni indesiderate ai farmaci assunti o, in ogni caso, qualora la paziente lo ritenga opportuno, la terapia verrà immediatamente sospesa, la paziente verrà esclusa dallo studio e completerà il normale iter ricostruttivo. Restando a disposizione per ogni eventuale chiarimento le porgo i più cordiali saluti.

IL MEDICO DI REPARTO

SCHEDA DATI GENERALI

COGNOME _____ NOME _____

DATA DI NASCITA _____ LUOGO _____

PATOLOGIE REMOTE:

ALLERGIE _____

TERAPIE FARMACOLOGICHE:

MASTECTOMIA SX DX DATA _____ TIPO: _____

CHEMIOTERAPIA ADIUVANTE NO SI tipo _____

RICOSTRUZIONE IMMEDIATA DIFFERITA data _____

ESPANSORE Tipo _____ cc _____

PROTESI DEFINITIVA Tipo _____ data _____

GRUPPO DI STUDIO DI APPARTENENZA

A	B	C
---	---	---

SCHEDA AMBULATORIALE

COGNOME _____ NOME _____

ESPANSORE Tipo _____ cc _____ PRERIEMPITO cc _____

DATA	mmHg iniziali	CM ³ RIEMPIMENTO	mmHG finali	CM ³ TOTALI
-----	_____	-----	_____	-----
-----	_____	-----	_____	-----
-----	_____	-----	_____	-----
-----	_____	-----	_____	-----
-----	_____	-----	_____	-----
-----	_____	-----	_____	-----
-----	_____	-----	_____	-----
-----	_____	-----	_____	-----
-----	_____	-----	_____	-----
-----	_____	-----	_____	-----
-----	_____	-----	_____	-----
-----	_____	-----	_____	-----
-----	_____	-----	_____	-----
-----	_____	-----	_____	-----
-----	_____	-----	_____	-----

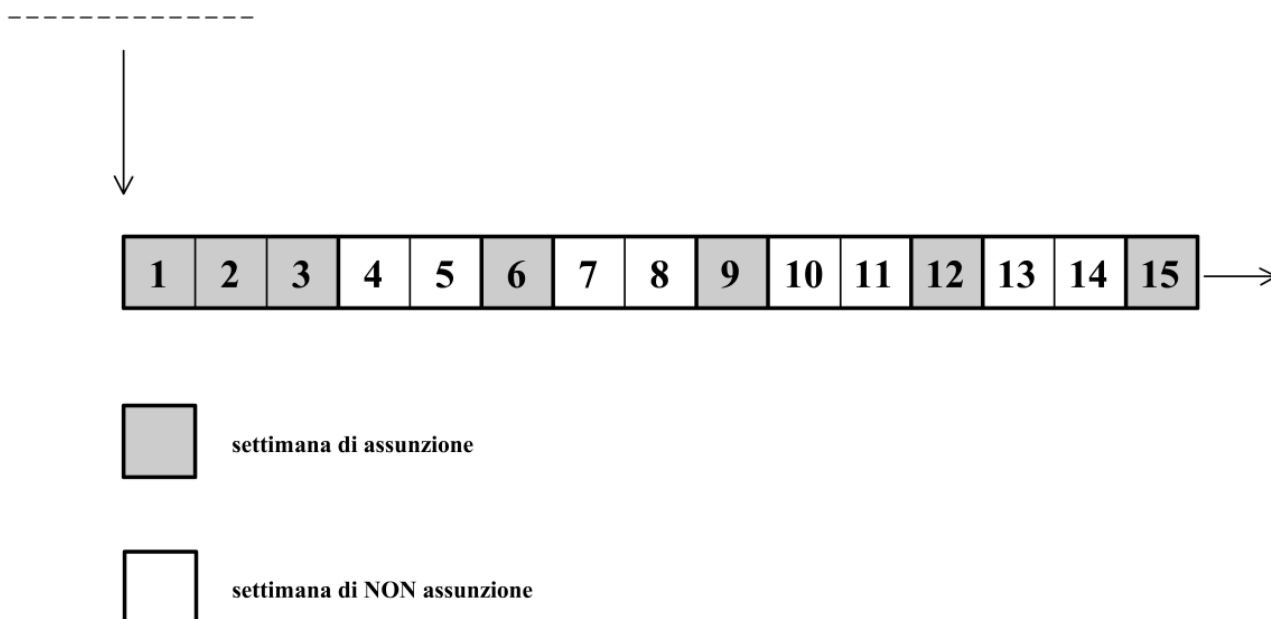
OSSERVAZIONI

PROSPETTO DI ASSUNZIONE FARMACOLOGICA

Gentile Signora, la ringraziamo di aver acconsentito a partecipare alla Ricerca che stiamo conducendo. Cercheremo di sfruttare al meglio le conoscenze che trarremo anche dalla sua collaborazione per rendere sempre migliori e duraturi i risultati della ricostruzione mammaria post oncologica.

Nello schema riportato di seguito è indicato il giorno della settimana nel quale intraprenderà l'assunzione farmacologica. Le settimane di trattamento vanno numerate a partire da quel giorno. Se ad esempio inizierà la terapia di mercoledì, la settimana n.1 di trattamento andrà da quel mercoledì al martedì successivo. Allo stesso modo la settimana n.2 inizierà il secondo mercoledì ed andrà fino al martedì seguente, e così via.

giorno di inizio della terapia



I numeri scritti dentro le caselle indicano le settimane di terapia numerate come descritto. Le caselle grigie indicano le settimane in cui assumerà la terapia. Nelle settimane bianche, al contrario, non dovrà assumere la terapia. La invitiamo a far presente ai controlli periodici qualsiasi problema insorto durante la terapia.

Cordiali saluti

