



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOCHIMICA BIOLOGIA MOLECOLARE E  
BIOTECNOLOGIE

CICLO XXVIII

COORDINATORE Prof. Francesco Bernardi

**IMAGING MOLECOLARE: IL LINFONODO SENTINELLA  
APPLICAZIONI CLINICHE, FORMULAZIONE E VALUTAZIONE  
PRECLINICA DI UN NUOVO TRACCIANTE TECNEZIATO**

Settore Scientifico Disciplinare MED/36

**Dottorando**

Dott. Murri dello Diago Nicola

**Tutore**

Dr.ssa Uccelli Licia

**Correlatore**

Dr.ssa Boschi Alessandra

Anni 2012/2015

# Indice

<b>1. PREMESSA</b> .....	<b>3</b>
<b>2. INTRODUZIONE</b> .....	<b>5</b>
<b>3. II LINFONODO SENTINELLA</b> .....	<b>11</b>
3.1 Anatomia del sistema linfatico.....	12
3.2 Diffusione metastatica dei tumori per via linfatica .....	13
3.3 Concetto del Linfonodo Sentinella .....	14
3.4 Tecnica della Linfoscintigrafia: reperimento del linfonodo sentinella mediante iniezione di traccianti radioattivi.....	15
3.5 Imaging .....	15
3.6 Reperimento intraoperatorio del linfonodo sentinella mediante sonda rilevatrice di raggi gamma.....	16
<b>4. APPLICAZIONI</b> .....	<b>18</b>
4.1 Cancro della mammella .....	18
4.2 Melanoma .....	22
4.3 Carcinoma papillare della tiroide.....	24
4.4 Carcinoma esofageo.....	26
4.5 Carcinoma gastrico .....	27
4.6 Cancro del colon-retto.....	28
4.7 Carcinoma polmonare.....	30
4.8 Carcinoma della prostata .....	31
4.9 Altri tumori urologici.....	32
4.10 Tumori ginecologici .....	34
4.11 Tumori testa-collo.....	36
<b>5. TRACCIANTI</b> .....	<b>37</b>
5.1 Caratteristiche fisico-chimiche .....	37
5.2 Traccianti convenzionali.....	38
5.3 Traccianti ottici .....	40
5.4 Traccianti fotoacustici.....	40
5.5 Microbolle per ultrasonografia.....	41
5.6 Contrastanti per tomografia computerizzata .....	41
5.7 Traccianti magnetici .....	41

5.8	Traccianti con tropismo per il linfonodo sentinella.....	43
5.9	Traccianti PET .....	44
<b>6.</b>	<b>IL TECNEZIO .....</b>	<b>45</b>
6.1	Isotopi del Tecnezio .....	45
6.1.1	Isotopo $^{99}\text{Tc}$ .....	46
6.1.2	Isomero $^{99m}\text{Tc}$ .....	46
6.2	Chimica del Tecnezio .....	48
6.3	Metodi di marcatura del Tecnezio .....	49
6.3.1	Core $[\text{Tc}=\text{O}]^{3+}$ .....	49
6.3.2	Core $[\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$ .....	50
6.3.3	Gruppo HYNIC.....	53
6.3.4	Gruppo Tc (III) a forma di “ombrello rovesciato”.....	54
6.4.5	Core $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ .....	55
<b>7.</b>	<b>PRODUZIONE DI NUOVI TRACCIANTI.....</b>	<b>56</b>
7.1	Iter Pre-Clinico per la produzione di un radiofarmaco .....	56
7.2	Sperimentazioni cliniche con radiofarmaci .....	59
<b>8.</b>	<b>SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>62</b>
<b>9.</b>	<b>PARTE SPERIMENTALE.....</b>	<b>65</b>
9.1	Progettazione di un legante multifunzionale destrano-mannosio per la coordinazione con il core $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$ .....	65
9.2	Scelta dell’opportuno sistema chelante per il core $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$ .....	67
9.3	Sintesi del ligando multifunzionale destrano-mannosio contenente il sistema chelante Cys-Cys tramite il “linear approach” .....	68
9.4	Sintesi del legante multifunzionale destrano-mannosio contenente il sistema chelante Cys-Cys tramite il “branched approach” .....	70
9.5	Marcatura dei leganti 5, 8-10 con il core $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$ .....	72
9.6	Cromatografia HPLC.....	72
9.7	Studi di stabilità dei complessi $^{99m}\text{Tc}(\text{N})5$ e $^{99m}\text{Tc}(\text{N})8-10$ .....	74
9.8	Studi di Imaging tramite lo Scanner per piccoli animali YAP-(S)PET .....	74
9.8.1	Prototipo del tomografo ibrido YAP-(S)PET .....	75
<b>10.</b>	<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>83</b>
<b>11.</b>	<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>86</b>
<b>12.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>87</b>

## 1. PREMESSA

Vedere per 'curare' questo è il ruolo dell'Imaging Molecolare nella diagnostica clinica.

La maggior parte delle neoplasie vengono attualmente diagnosticate attraverso indagini cliniche che evidenziano alterazioni morfologiche del tessuto in esame. Quando le alterazioni anatomiche sono visibili mediante le comuni tecniche radiografiche, spesso la malattia è già in uno stadio molto avanzato di sviluppo e quindi più difficilmente curabile. Tuttavia, i cambiamenti morfologici sono preceduti da modificazioni a livello genetico, biochimico, cellulare e molecolare. La disponibilità di esami diagnostici capaci di identificare anomalie a tale livello permetterebbe di diagnosticare l'insorgenza di una certa patologia ad uno stadio di sviluppo più facilmente curabile. Inoltre, è noto che lesioni morfologicamente simili possono progredire in modo diverso. La necessità e la possibilità di sconfiggere la malattia prima che provochi danni irreparabili ha portato alla scoperta di protocolli diagnostici più raffinati, che rendano possibili interventi terapeutici più efficaci; tutto questo ha portato allo sviluppo di un nuovo settore di ricerca noto come 'Imaging Molecolare'.

La tecnica del *Linfonodo Sentinella* (LS) si inserisce prepotentemente nell'ambito dell'imaging molecolare, è una tecnica diagnostica impiegata per escludere la presenza di metastasi linfonodali ed è una metodica ormai consolidata in diversi iter diagnostico-terapeutici di plurime neoplasie solide, in particolare è diventata un passo indispensabile per evitare inutili morbidità nei tumori mammari e nel melanoma. Essa consiste nell'esame istologico del primo linfonodo che riceve la linfa drenata dall'area in cui è situato il tumore primitivo. Poiché la presenza di metastasi nel primo linfonodo è un indicatore di un probabile interessamento più diffuso, esso viene detto "sentinella"<sup>1,2</sup>. La tecnica del LS presuppone che un tracciante venga inoculato, in sede peritumorale o in sede subdermica (a seconda della scuola di pensiero e del tipo di neoplasia), in corrispondenza della lesione neoplastica. Il tracciante migrerà successivamente, con tempi dipendenti dal tracciante impiegato, attraverso i capillari linfatici fino al linfonodo o ai linfonodi sentinella. Il linfonodo individuato potrà così essere identificato ed asportato chirurgicamente per essere sottoposto ad un accurato esame istologico che consentirà di escludere la presenza di cellule metastatiche, anche se presenti in

minima quantità.

In Medicina Nucleare vengono utilizzati traccianti radioattivi la cui energia radiante, dopo l'inoculazione e la localizzazione a livello linfonodale, potrà essere rilevata impiegando specifiche sonde portatili dedicate.

I risultati clinici ed i dati scientifici hanno dimostrato che la biopsia radioguidata del LS è una procedura semplice ed affidabile, che ha rivoluzionato soprattutto l'approccio al carcinoma mammario in senso conservativo evitando così dissezioni ascellari non necessarie<sup>3</sup> ma anche l'iter diagnostico-terapeutico di altri tipi di tumori.

Per la ricerca e l'identificazione del Linfonodo Sentinella in medicina nucleare vengono attualmente impiegate particelle colloidali di albumina umana di diametro compreso tra 20 e 80 nm (*Nanocoll*), rese radioattive in seguito a marcatura con Tecnezio 99 metastabile (<sup>99m</sup>Tc). Le particelle, inoculate in sede subdermica in corrispondenza della lesione neoplastica, vengono riassorbite attraverso i vasi linfatici e intrappolate, secondo un'interazione di tipo meccanico, dal reticolo endoteliale del primo linfonodo che incontrano.

## 2. INTRODUZIONE

La biopsia del linfonodo sentinella è uno dei più importanti sviluppi recenti nell'iter diagnostico-terapeutico di diverse neoplasie. Le informazioni ottenute dal linfonodo sentinella hanno cambiato la conoscenza dell'anatomia del sistema linfatico e della diffusione dei tumori per via linfatica. L'introduzione della tecnica, inoltre, ha consentito di stadiare meglio i tumori, controllarne meglio le complicanze locali e, quindi, migliorare la sopravvivenza dei pazienti affetti da diversi tipi di cancro.

Sebbene la descrizione dettagliata della procedura sia stata pubblicata da Donald D. Morton e Alistar J. Cochran nel 1992<sup>1</sup>, molti pezzi del puzzle che Morton e Cochran hanno assemblato erano stati individuati prima, e talvolta molto prima.

Sebbene il cancro sia stato descritto già in papiri egizi del 3000 a.C., si ritiene che il nome "cancro" sia stato attribuito alla patologia da Ippocrate. Egli ha paragonato la patologia ad un granchio (in greco: Καρκινος). Alcuni ritengono che il nome sia stato scelto perché, come un granchio, la malattia non molla la presa una volta che abbia fatto la sua comparsa. Altri ritengono che le chele e le zampe del granchio siano evocative delle protrusioni che si osservano quando la malattia invade i tessuti circostanti. Ippocrate descriveva anche le modalità di diffusione della malattia, in un modo che ricorda le metastasi linfonodali<sup>4</sup>.

Il primo a notare vasi linfatici che terminavano in ghiandole del mesentero fu Herophilo, (300 a.C.) della scuola di Alessandria, mentre Herasistrato descrisse per primo il loro contenuto lattiginoso. Entrambi, tuttavia, ritenevano che si trattasse di vasi ematici.

Nel 1622 l'anatomista e chirurgo Gasparo Aselli, professore all'Università di Pavia, ri-scoprì, operando i cani, le "vene lattee" mesenteriche. Egli dimostrò anche l'esistenza di vasi analoghi in molti animali. Egli non diede ai vasi il nome di linfatici, ma di "vene lattiche", e postulò che fossero importanti per l'assorbimento del chilo.

La scoperta di vasi analoghi nell'uomo risale al 1628, quando Gassendi ed i colleghi esaminarono il contenuto addominale di una donna un'ora dopo il decesso. Jhan Vessling (1634), Caecilius Folius e Nicolaas Tulp (1639), Walee (1641) e Jean Pacquet (1649) confermarono l'esistenza di questi vasi, e li riconobbero come una struttura anatomica separata rispetto ad arterie e vene.

Significativi contributi allo studio del sistema linfatico vennero poi dati dal medico, matematico e teologo danese Tommaso Bartholino: il re di Danimarca, che supportava la ricerca scientifica, donò allo studioso il corpo di due criminali giustiziati per i suoi studi. Il re assistè anche ad alcune delle dissezioni anatomiche. Bartholino scoprì il dotto toracico, e pubblicò gli esiti dei suoi studi nel 1652.

Egli intuì che il sistema linfatico consentiva una forma di circolazione separata da quella del sangue, e postulò che la linfa originasse dal sangue per filtrazione. Diede ai vasi linfatici il loro nome attuale "vasa lymphatica". Tra i ricercatori che, in seguito, approfondirono l'anatomia del sistema linfatico è degno di nota Anthony Nuck, professore di anatomia a Leiden, in Olanda. Egli, per rendere visibili i vasi linfatici, iniettò al loro interno una miscela di mercurio, stagno e piombo.

Il patologo tedesco Rudolf Virchow (1821 – 1902) fu uno dei fondatori della medicina moderna. Egli suggerì che la funzione dei linfonodi del sistema linfatico fosse quella di filtro. Il fatto che i linfonodi potessero ospitare il cancro era noto da molto tempo, ma nella metà del 19<sup>mo</sup> secolo nulla si sapeva sui motivi di questo fenomeno. Nel 1863, Virchow propose che la linfa proveniente da ogni data area del corpo drenasse in uno specifico linfonodo, e successivamente ad altri linfonodi. Si può affermare che la storia del linfonodo sentinella sia iniziata con Virchow: la sua intuizione, infatti, fu dovuta all'osservazione del pigmento di carbone proveniente da un piccolo tatuaggio, che era stato fatto sul braccio di un marinaio, del quale Virchow aveva eseguito la dissezione anatomica. Essa si era accumulata tutta in un singolo linfonodo.

L'anatomista francese Marie Philibert Constant Sappey studiò il sistema linfatico utilizzando la stessa tecnica di Nuck, evidenziandoli cioè con il mercurio. Nel 1874 egli pubblicò un atlante anatomico che descriveva accuratamente il decorso dei vasi linfatici cutanei, che rimase un punto di riferimento per i chirurghi per oltre un secolo.

Sulla base di queste scoperte, i clinici iniziarono a raccomandare che, per migliorare il tasso di cura, il trattamento chirurgico del cancro dovesse comprendere la rimozione dei linfonodi regionali. Uno di questi clinici fu il chirurgo britannico Herbert Snow, che lavorava nel primo ospedale oncologico al mondo, il Cancer Hospital (oggi Royal Marsden Hospital) di Londra. Nel 1892, Snow, che si occupava prevalentemente del trattamento del melanoma, pubblicò un lavoro in cui, citando le osservazioni di Virchow, raccomandava che il trattamento del melanoma comprendesse sempre la dissezione elettiva dei linfonodi. Le scoperte

di Virchow ispirarono anche il chirurgo William S. Halsted, del John Hopkins Hospital di Baltimora, (1852 – 1922) che sviluppò, per il cancro della mammella, la mastectomia con lo svuotamento ascellare radicale nel 1894. Halsted, che era stato più volte in Europa, aveva incontrato Virchow a Berlino.

In questo modo la chirurgia del sistema linfatico divenne un elemento fondamentale della chirurgia oncologica, e l'escissione del tumore primario fu accompagnata a quella dei linfonodi regionali per un'ampia varietà di neoplasie, tra cui il melanoma, il cancro del seno, del collo, e i tumori del tratto gastrointestinale.

Nel frattempo, le tecniche per individuare i linfatici furono innovate dal medico, anatomista, radiologo e chirurgo rumeno Dimitrie Gerota<sup>5</sup>, che utilizzò il blu di Prussia e pubblicò la sua tecnica (metodo Gerota) nel 1896.

Il termine "linfonodo sentinella" fu usato da Morton nell'articolo pubblicato nel 1992<sup>1</sup>. Comprensibilmente, gli è sempre stata attribuita la paternità di questo termine, ma era stato già impiegato da altri in precedenza: Ramon M. Cabanas<sup>6</sup>, studiando le metastasi linfonodali del cancro del pene nel 1960, aveva notato che il linfonodo situato 4,5 cm lateralmente al tubercolo pubico era spesso quello coinvolto per primo, e lo aveva pertanto chiamato "Linfonodo sentinella"<sup>7</sup>. La sua definizione, tuttavia, era basata su criteri esclusivamente anatomici, in contrasto con la definizione di Morton, che si basava invece sulla fisiologia del sistema linfatico. Per il cancro al pene la differenza sostanziale può essere ridotta, perché il cancro è situato, generalmente, sempre nello stesso punto, sul glande. Ma la situazione cambia notevolmente a seconda delle diverse posizioni in cui si possono manifestare il cancro della mammella ed il melanoma.

Ma come non era stato Morton il primo ad impiegare il termine "linfonodo sentinella", così non lo era stato nemmeno Cabanas. Nel 1966 il termine era stato usato da Sayegh ed altri<sup>8</sup> per descrivere il linfonodo primario che riceveva la linfa dai testicoli e ancor prima, nel 1960, Gould ed altri<sup>9</sup> lo avevano utilizzato per descrivere il linfonodo alla giunzione tra le vene facciali anteriore e posteriore: in uno studio sul cancro della parotide, essi scoprirono che quest'ultimo linfonodo era il primo ad essere coinvolto dalla diffusione di una neoplasia parotidea, e lo chiamarono, per questo, linfonodo sentinella. Proposero dunque una dissezione profonda del collo se l'esame di sezioni congelate di questo linfonodo rivelava la presenza di malattia metastatica. Anche questi autori, tuttavia, definivano il linfonodo sentinella sulla base della sua posizione anatomica.

In ogni caso, un'approfondita ricerca della letteratura rivela che la prima persona che utilizzò il termine "linfonodo sentinella" fu il chirurgo inglese Leonard Braithwaite, che utilizzò un marcatore blu per studiare il drenaggio linfatico dall'omento in cavie ed umani. Nel 1923 Braithwaite<sup>10</sup> fece colare il colorante blu sull'omento, recuperò il linfonodo cui i vasi linfatici avevano drenato il blu e lo chiamò "linfonodo sentinella".

Il primi utilizzatori del colorante blu brevettato ancora oggi impiegato per la visualizzazione dei dotti linfatici in vivo furono Hudack e McMaster nel 1933<sup>11</sup>. Nel 1959, Walker fu il primo ad utilizzare un radiotracciante per visualizzare il decorso dei vasi linfatici<sup>12</sup>. In seguito, nel 1953, Sherman et al, dimostrarono che l'oro colloidale poteva essere tracciato dal punto dell'iniezione intradermica fino al linfonodo drenante<sup>13</sup>. La prima immagine di un linfonodo radioattivo fu prodotta da Sage e Gozun nel 1958, a New York, attraverso la somministrazione di proteine colloidali marcate con oro 198 a un cane<sup>14</sup>. Le immagini vennero ottenute attraverso uno scanner passato sulla parte del corpo. Le gamma-camere, infatti, non fecero la loro comparsa fino agli anni '70. La linfoscintigrafia fu utilizzata, inizialmente, per la valutazione dell'edema e anche per la visualizzazione della catena linfonodale mammaria interna, che era necessaria per delimitare il campo della radioterapia parasternale nelle pazienti affette da cancro al seno.

La prima documentazione relativa all'utilizzo intraoperatorio di sonde per il rilevamento di raggi gamma intraoperatorio risale al 1984<sup>15</sup>. Anticorpi contro l'antigene carcinoembrionale marcati con Iodio 131 furono iniettati ad un paziente con carcinoma coloretale. L'intensità dei raggi gamma emessi dal tumore era leggermente più intensa rispetto a quella del tessuto circostante, pertanto furono fatti successivamente dei tentativi per localizzare con questa tecnica metastasi linfonodali ed ossee.

Come già spiegato, il concetto in base al quale il tumore migra inizialmente ad un linfonodo specifico era stato introdotto oltre un secolo prima della pubblicazione del fondamentale articolo di Morton e Cochrane del 1992.

Diversi ricercatori avevano già utilizzato il termine "Linfonodo sentinella", il colorante blu era stato utilizzato per visualizzare i dotti linfatici, esisteva la linfoscintigrafia ed esisteva un rilevatore di raggi gamma portatile che poteva essere utilizzato nelle sale operatorie.

Il contributo fondamentale di Morton e Cochrane fu quello di riprendere il concetto

del drenaggio linfatico selettivo espresso da Virchow, e proporre che il melanoma metastatico progredisca prima al linfonodo sentinella, poi via via alle stazioni di secondo e terzo livello lungo la catena linfonodale. Essi re-introdussero il metodo Gerota<sup>5</sup> per visualizzare le vie di drenaggio linfatico. Fecero un passo avanti sulla comprensione delle modalità di diffusione delle metastasi linfatiche proposta da Cabanas<sup>7</sup>, Sayegh<sup>8</sup>, Gould<sup>9</sup>, Braithwaite<sup>10</sup>, che assumevano che il linfonodo sentinella fosse fisso ed individuabile attraverso criteri anatomici. Il nuovo concetto proposto e validato da Morton e Cochrane era dinamico, e basato sulla fisiologia del drenaggio linfatico, che si dimostrò essere variabile da persona a persona. Essi dimostrarono anche che c'è spesso una finestra di tempo che dà l'opportunità di operare e rimuovere le metastasi linfonodali precocemente, prima che queste ed il loro tumore primitivo generino le metastasi ematiche a distanza.

Morton e Cochrane, quindi, cambiarono radicalmente il modo di pensare la disseminazione e la diffusione delle metastasi linfonodali, enfatizzando il concetto che, nella maggior parte dei pazienti, esiste un ordine nel modo in cui le metastasi si diffondono, prima dal sito del tumore primitivo al linfonodo sentinella, e solo poi altrove, anche attraverso il flusso ematico. Questo concetto si sposa con gli obiettivi comunemente accettati di fornire una terapia individualizzata, e con il desiderio di preservare la funzionalità e l'aspetto estetico delle persone.

A posteriori, non è sorprendente che queste due persone siano state in grado di sviluppare questo concetto: in un tempo in cui si praticava routinariamente la dissezione linfonodale, il team di Donald Morton aveva introdotto la tecnica della linfo-scintigrafia linfonodale in pazienti affetti da melanoma del tronco per determinare il gruppo o i gruppi linfonodali di drenaggio<sup>16</sup>. Nel 1982 Cochrane, un patologo, dimostrò che la proteina S-100 è un marker straordinariamente sensibile, in grado di individuare metastasi linfonodali, anche di piccolissimo volume<sup>17</sup>.

Morton e Cochrane iniziarono lo studio sul linfonodo sentinella su modelli animali nella metà degli anni '80, e successivamente estesero la ricerca agli esseri umani. Presentarono i risultati ottenuti sui primi 100 pazienti al congresso sul melanoma organizzato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità a Venezia nel 1989.

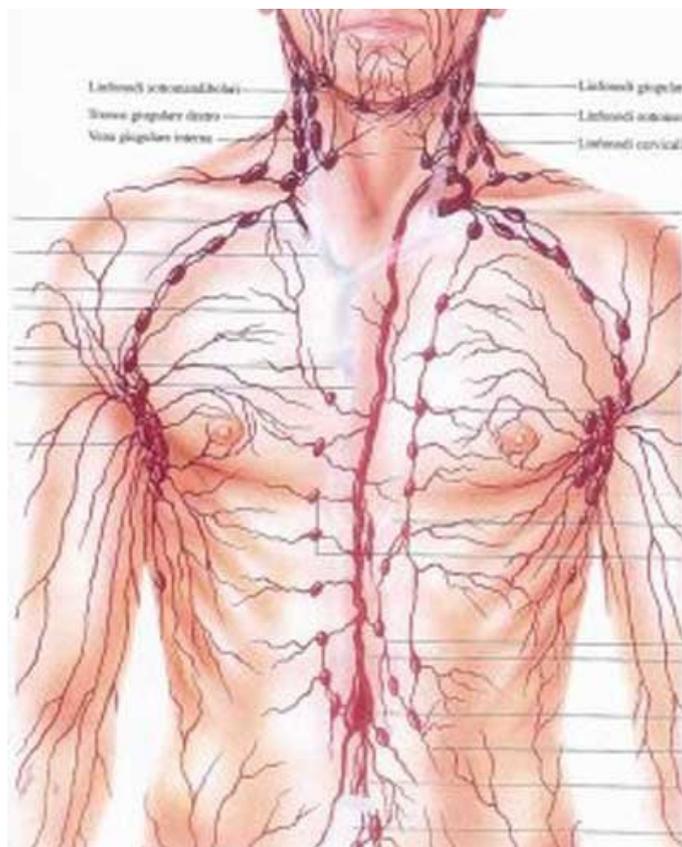
Incredibilmente, la presentazione fu accettata esclusivamente come poster, che suscitò scarso interesse. I due proseguirono gli studi, ampliando la casistica. È poco noto il fatto che ebbero grosse difficoltà a pubblicare l'esito dei loro studi, che furono pubblicati solo dopo due anni e dopo essere stati rifiutati da due riviste.

La chirurgia moderna ebbe origine nella metà del 19<sup>mo</sup> secolo, con l'introduzione dell'anestesia e dell'asepsi. La sottospecialità della chirurgia oncologica fu successivamente sviluppata da pionieri come Virchow, Snow e Halsted. I primi 100 anni furono caratterizzati dallo sviluppo di tecniche sempre più demolitive, considerate necessarie per lo stadio avanzato cui si presentava la maggior parte delle neoplasie. Questa tendenza iniziò a cambiare circa 40 anni fa, e da allora gli interventi sono diventati meno invasivi, con l'obiettivo di preservare la funzionalità e l'estetica, pur senza compromettere la possibilità di controllare la malattia localmente inficiando la sopravvivenza.

Il linfonodo sentinella si inserisce in questo solco, e garantisce che la dissezione linfonodale sia riservata a quei pazienti che hanno effettivamente metastasi linfonodali, migliorando contemporaneamente l'affidabilità della stadiazione della malattia e, quindi, la sopravvivenza.

### 3. II LINFONODO SENTINELLA

Per linfonodo sentinella si intende il primo linfonodo che riceve il flusso linfatico dal tumore primario ed è quindi il primo ad essere interessato da eventuali metastasi.



*Sistema Linfatico*

La linfa è formata da una parte liquida, contenente proteine e grassi, ed una corpuscolata, formata da globuli bianchi, soprattutto linfociti. Molti tumori si caratterizzano per il fatto che le cellule neoplastiche acquisiscono la capacità di sopravvivere indipendentemente dall'adesione alla matrice cellulare. Le cellule, quindi, si spostano seguendo il flusso del liquido extracellulare che viene drenato dai canali linfatici e tendono ad accumularsi, per resistenza meccanica, in presenza del reticolo endoteliale linfonodale<sup>18</sup>. Per questo motivo il LS è usato allo scopo di individuare tempestivamente la presenza di una metastasi, vale a dire la presenza di cellule tumorali in una parte del corpo diversa da quella in cui si è originato il tumore.

### 3.1 Anatomia del sistema linfatico

Il **sistema linfatico** è formato da una fitta rete di piccoli canali periferici, i *capillari linfatici* che, dopo aver raccolto la *linfa* dagli *spazi intracellulari*, la drenano in vasi di diametro maggiore, i *collettori linfatici*. I collettori, analogamente a quanto accade per le vene, confluiscono in vasi di calibro crescente per terminare in due grossi tronchi: il *dotto linfatico destro*, che raccoglie la linfa della porzione sopra-diaframmatica destra del corpo ed è tributario della vena succlavia destra, e il *dotto toracico*, cui giunge tutta la linfa delle regioni sotto-diaframmatiche più quella della parte sopra-diaframmatica sinistra, tributario della vena succlavia sinistra. Tramite le succlavie, afferenti alla vena cava superiore, la circolazione linfatica termina immettendosi in quella ematica.

Il percorso dei collettori linfatici è interrotto dai **linfonodi**, strutture specifiche formate da tessuto linfoide aggregato in noduli, che possono essere unici o più spesso raggruppati in vere e proprie *stazioni linfonodali* o *linfocentri*. La sequenza di collettori e linfonodi costituisce le **catene linfatiche** che decorrono affiancate ai vasi sanguigni, da cui prendono il nome: catena linfatica dell'arteria gastrica, catena linfatica para-aortica, catena linfatica dell'arteria mammaria interna, catena linfatica dell'arteria mesenterica inferiore. I linfonodi, in quanto centri nodali della rete linfatica, rappresentano il punto d'arrivo dei collettori pre-nodali, provenienti anche da zone diverse, e di partenza dei collettori post-nodali, in numero minore rispetto a quelli afferenti, rivolti in varie direzioni. Ciò determina la caratteristica del sistema linfatico per cui un distretto anatomico o un determinato organo, avvolto in una fitta ragnatela di capillari, può drenare verso una o più catene linfatiche e ogni stazione linfonodale, a sua volta, può ricevere linfa anche da più organi o distretti anatomici.

Un organo che si presta bene alla esemplificazione di questo concetto è la **mammella** che può drenare, oltre che verso il diaframma e la parete toracica, in particolare nei:

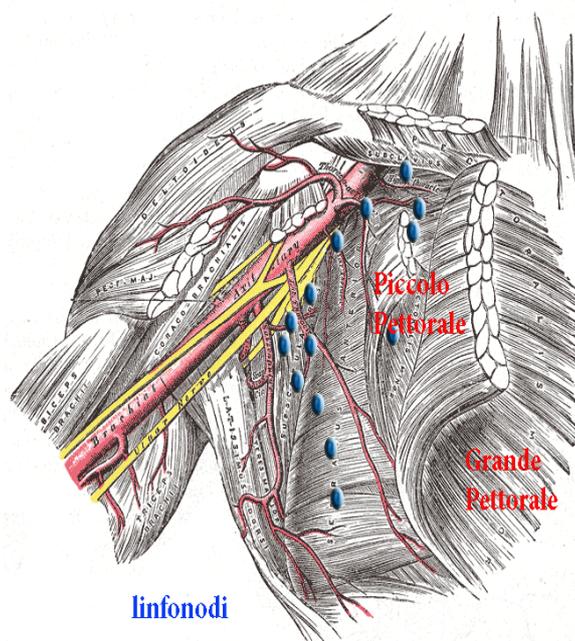
- linfonodi posti medialmente alla ghiandola e che formano la catena dell'arteria mammaria interna, tributaria del linfocentro sopraclavicolare;
- linfonodi della mammella contro-laterale;
- linfonodi della catena linfatica ascellare che partendo dalla ghiandola si porta in alto verso il cavo omonimo.

I linfonodi di quest'ultimo linfocentro sono in media una trentina e sono distribuiti in

sottogruppi variamente classificati. Un criterio è quello di identificarli in base alla loro posizione rispetto al muscolo piccolo pettorale (M.P.P.):

- ▲ linfonodi dell'ascella inferiore o di **I livello**, posti lateralmente al bordo esterno del M.P.P.
- ▲ linfonodi dell'ascella media o di **II livello**, posti tra il bordo mediale e quello laterale del M.P.P.
- ▲ linfonodi dell'apice dell'ascella o di **III livello**, posti medialmente al margine interno del muscolo.

Numerose ricerche riguardanti la dinamica del drenaggio linfatico della mammella hanno dimostrato che la quasi totalità della linfa proveniente dalla ghiandola segue la via ascellare, mentre una parte minima, intorno all'1-3%, segue la via mammaria<sup>18</sup>.



*Linfonodi della catena ascellare*

### **3.2 Diffusione metastatica dei tumori per via linfatica**

La principale caratteristica dei tumori maligni, oltre all'aggressività locale dovuta alla capacità di infiltrare e distruggere i tessuti e le strutture circostanti, è quella di disseminare **metastasi** per via ematica e/o linfatica. Nella diffusione per via linfatica le cellule malate, dopo essersi staccate dal tumore, invadono i capillari e/o i collettori e, seguendo il flusso della linfa, raggiungono i linfonodi, dove, almeno temporaneamente, rimangono bloccate. Successivamente, infatti, possono

passare nei collettori post-linfonodali portandosi in altri linfonodi, e così via, fino a concludere il loro percorso nei tronchi linfatici principali e di lì nella circolazione ematica. A questo punto le metastasi, trasportate dal sangue in ogni parte dell'organismo, possono colonizzare ovunque riproducendo il tumore da cui sono originate.

La diffusione delle metastasi per via linfatica presenta alcuni aspetti peculiari rispetto a quella che segue la via ematica.

- È più lenta, perché deve seguire l'intero percorso linfatico (venendo anche frenata, come detto, dai linfonodi) prima di raggiungere il circolo sanguigno e diventare sistemica.
- Procede in modo sequenziale, ovvero le metastasi, avanzando lungo la catena linfatica, invadono i linfonodi iniziando da quello che incontrano per primo (il linfonodo sentinella), e proseguendo via via con tutti gli altri fino a coinvolgere l'intero linfocentro.
- Risulta prevedibile, in quanto segue le catene linfatiche e raggiunge le stazioni linfatiche tributarie dell'organo colpito dalla neoplasia. Per questi motivi in chirurgia oncologica è importante conoscere la topografia delle vie di drenaggio dei visceri e dei distretti anatomici. Ciò consente al chirurgo di prelevare un linfonodo, di regola il LS, o più linfonodi in sequenza, da sottoporre a esame istologico estemporaneo. Il numero e il grado di coinvolgimento dei linfonodi esaminati fornirà informazioni utili sulla aggressività del tumore e sulla entità della sua diffusione loco-regionale e consentirà di effettuare la stadiazione della malattia e di stabilirne la prognosi. Servirà infine a orientare l'operatore verso il tipo di intervento che meglio garantisca la necessaria radicalità chirurgica.

### **3.3 Concetto del Linfonodo Sentinella**

Con il termine "linfonodo sentinella" si intende il primo linfonodo che riceve la linfa proveniente dal tumore ed esso è, quindi, il primo linfonodo in cui colonizzano le cellule neoplastiche trasportate per via linfatica. Ne consegue che, se il LS è libero da cellule neoplastiche all'esame istologico, anche gli altri linfonodi regionali avranno alta probabilità di esserlo (fino al 96%), e potranno essere lasciati in sede. In tale circostanza, infatti, le probabilità di ripresa locale della malattia non

superano il 3%<sup>19</sup>. Contrariamente, se il LS fosse interessato dalla neoplasia occorrerà procedere con una linfadenectomia radicale.

La metodica della BLS offre quindi due sostanziali vantaggi rispetto all'esecuzione sistematica della linfadenectomia ascellare. Il primo è ovviamente quello di poter evitare, in tutti quei casi in cui il LS risulti negativo, la morbidità propria della linfadenectomia radicale (primo fra tutti, ad esempio, il linfedema dell'arto superiore nella dissezione ascellare); il secondo vantaggio è costituito dal fatto che il patologo deve esaminare un solo linfonodo (o talora due o tre) e può, quindi, procedere ad un esame molto più approfondito di quello possibile su molti più linfonodi derivanti da una linfadenectomia completa.

La biopsia del LS è dunque entrata stabilmente nel protocollo del trattamento chirurgico di molti tumori maligni, riscuotendo particolari consensi in campo senologico ove si pone come alternativa alla linfadenectomia ascellare.

### **3.4 Tecnica della Linfoscintigrafia: reperimento del linfonodo sentinella mediante iniezione di traccianti radioattivi**

La scintigrafia Linfonodale è un esame che viene effettuato presso un Servizio di Medicina Nucleare, che permette di localizzare il linfonodo "sentinella", vale a dire la prima stazione linfonodale interessata da un eventuale processo metastatico. Le informazioni che si potranno ottenere da questo esame saranno di aiuto al Medico Chirurgo per identificare ed asportare il linfonodo in sala chirurgica. Il tracciante radioattivo utilizzato per la biopsia radioguidata del linfonodo sentinella deve penetrare nei dotti linfatici in prossimità del tumore ed essere fissato nel primo linfonodo di drenaggio (LS), in modo da essere rilevato alla linfoscintigrafia e, intraoperatoriamente, da una sonda rilevatrice di emissioni gamma<sup>20</sup>.

### **3.5 Imaging**

La linfoscintigrafia può essere eseguita il giorno precedente l'intervento chirurgico o il giorno stesso una-due ore prima dell'intervento. Per individuare la posizione del primo linfonodo drenante il tessuto neoplastico vengono effettuate diverse proiezioni (anteriori, obliquo-anteriori, laterali, etc.) a seconda della stazione linfonodale da esaminare; con l'aiuto di una sorgente puntiforme di <sup>57</sup>Co si

evidenzia la proiezione cutanea del linfonodo che viene segnalata con una penna dermatografica. La profondità del linfonodo viene dedotta dalle diverse proiezioni di acquisizione o tramite un'acquisizione tomografica.

L'esame può essere completato con conferma della sede del linfonodo sentinella mediante conteggio esterno con la stessa sonda rivelatrice di radiazioni per chirurgia radioguidata che verrà poi utilizzata in sala chirurgica.

### **3.6 Reperimento intraoperatorio del linfonodo sentinella mediante sonda rivelatrice di raggi gamma**

In sede di intervento il chirurgo praticherà una piccola incisione in corrispondenza dei segni fatti sulla cute durante l'imaging e individuerà il punto di maggior emissione radioattiva, generalmente corrispondente al LS, mediante l'ausilio della sonda rivelatrice di raggi gamma avvolta in una guaina sterile.



*Asportazione linfonodo sentinella*

Tale sonda (gamma-detection probe), dotata di altissima sensibilità e di elevata risoluzione spaziale, è costituita da un piccolo cilindro metallico, all'interno del quale è in genere posizionato un cristallo di ioduro di sodio. Essa è poi collegata ad un collimatore e ad un trasformatore, il quale converte la radioattività captata in conteggi per minuto ed in un segnale acustico, di intensità e frequenza

proporzionali all'attività presente nella regione in esame.

Una volta identificato il LS, il chirurgo procederà alla sua estrazione. Qualora la sonda identifichi più di un linfonodo radioattivo, anche questi dovranno essere prelevati ed inviati ad analisti isto-patologica. Se nessun LS viene evidenziato è necessario procedere con la dissezione completa della stazione linfonodale.

## 4. APPLICAZIONI

### 4.1 Cancro della mammella

Lo stato dei linfonodi ascellari è uno dei fattori prognostici più importanti nelle donne affette da cancro della mammella, e la biopsia del LS è diventata la tecnica standard per rilevare la diffusione metastatica alle stazioni linfonodali<sup>21</sup>.

Per definizione, il LS è il primo della stazione linfonodale a ricevere la linfa drenata da una regione anatomica, ed è “responsabile” delle reazioni immunologiche relative a quella regione.

La tecnica è diventata uno standard in virtù del tasso relativamente basso di falsi negativi (5-10%) e dell’alta sensibilità (90-95%) nel rilevare la diffusione delle cellule cancerose al sistema linfatico.

Il LS è ormai una tecnica consolidata nella stadiazione del carcinoma della mammella; esistono tuttavia delle aree controverse, come la sua applicabilità dopo terapie neo-adiuvanti, il significato di nuovi traccianti e tecniche istopatologiche per l’identificazione di micrometastasi ed il loro significato prognostico e terapeutico<sup>22</sup>.

Un’area di interesse è stata aperta proprio dagli studi sulla risposta immune delle cellule adiacenti alle formazioni metastatiche, osservata nel LS. Queste osservazioni hanno rivelato che i cancri della mammella ed il melanoma hanno la capacità di ridurre la risposta immune dell’ospite all’interno del linfonodo: l’immunità del linfonodo rivolta contro le cellule tumorali è moderata da citochine, prostaglandine e gangliosidi e lipoproteine trasmesse attraverso i vasi linfatici dal tumore primitivo. Uno degli attuali campi di ricerca che coinvolgono il LS è pertanto costituito dalla possibilità di studiare, attraverso la sua analisi istopatologica, la risposta immune in atto al fine di ottenere utili informazioni cliniche rispetto al microambiente che caratterizza la risposta immunitaria dell’organismo alle cellule cancerose<sup>22</sup>.

La tecnica del LS è indicata per stadiare le pazienti con cancro precoce della mammella in stadio T1 e T2, con linfonodi ascellari clinicamente negativi. Sono candidate alla biopsia del LS anche le donne con carcinoma duttale in situ, in quanto la distruzione dei canali linfatici che si verifica nel corso della mastectomia impedirebbe la successiva identificazione del linfonodo sentinella, qualora fosse identificata una forma invasiva a seguito dell’analisi più accurata del pezzo

asportato. Più in generale, la procedura è indicata in tutte quelle pazienti con carcinoma duttale in situ in cui siano indicate procedure che potrebbero alterare il decorso dei vasi linfatici<sup>23</sup>.

La biopsia del LS è controindicata nelle pazienti con malattia infiammatoria del seno e nelle pazienti con linfonodi ascellari clinicamente positivi. Queste pazienti dovrebbero essere sottoposte a dissezione linfonodale ascellare.

Una controindicazione relativa è costituita dalla disponibilità di un agoaspirato di un linfonodo del cavo ascellare che provi la presenza di metastasi; tuttavia alcuni autori suggeriscono che la biopsia del LS potrebbe essere utile anche in questo caso, soprattutto per ri-stadiare il tumore successivamente all'impiego di terapie neoadiuvanti<sup>23,24</sup>.

Mentre l'uso di blu isosulfano è controindicato in gravidanza a causa della potenziale teratogenicità, l'uso di traccianti marcati con <sup>99m</sup>Tc è considerato sicuro per il feto<sup>22</sup>.

La tecnica prevede, prima dell'inizio dell'intervento chirurgico, l'iniezione di un colorante e di un tracciante radioattivo. In linea generale, la combinazione dei due traccianti consente di identificare il LS in un numero maggiore di casi (96% – 100% se vengono utilizzati entrambi i traccianti contro un 86-90% nel caso venga utilizzato un solo tracciante)<sup>25</sup>.

I coloranti utilizzati includono il blu di metilene, il verde indiocianina, e l'indocarminio. Il tracciante radioattivo più utilizzato è il <sup>99m</sup>Tc. È descritta in letteratura sia l'iniezione del tracciante per via sottocutanea che transdermica, e sono stati descritti, nei diversi studi, diversi siti di iniezione: subareolare, peritumorale ed intratumorale, sebbene alcune metanalisi ritengano conveniente la via periareolare perché, a fronte di una maggior semplicità tecnica, consentirebbe simili probabilità di successo nell'identificazione del LS

Una delle controversie attuali è rappresentata dall'utilizzo della linfoangiografia pre-operatoria. I sostenitori di questa tecnica ritengono che essa consentirebbe un'accurata localizzazione pre-operatoria sia del LS che dell'intero sistema linfatico, minimizzando la manipolazione e la dissezione dei tessuti da parte del chirurgo. Tuttavia il valore reale di queste informazioni non è chiaro: i detrattori di questa opportunità obiettano che la linfoangiografia non aumenterebbe il tasso di successo nell'individuazione del LS, e determinerebbe anzi, un maggior numero di falsi negativi rispetto all'individuazione con la sonda gamma<sup>26</sup>.

La sicurezza della tecnica del LS è stata oggetto di diversi trial clinici: I Trial

NSABP B-32<sup>27</sup> ha dimostrato che non esistono differenze statisticamente significative tra la prognosi delle persone trattate con la tecnica del LS e quelle sottoposte a linfadenectomia ascellare per quanto riguarda controllo delle recidive in loco, sopravvivenza e tempo libero da malattia.

Questi risultati, ottenuti da uno studio con elevatissimo potere statistico, sono successivamente stati confermati da uno studio monocentrico condotta da Veronesi et al.<sup>28</sup>.

Inoltre, lo studio ALMANAC<sup>29</sup> ha indagato il tasso di invalidità risultante dai due approcci: le pazienti sottoposte a biopsia selettiva del linfonodo sentinella hanno mostrato una frequenza statisticamente inferiore di linfedema dell'arto superiore (RR = 0,37), perdita di sensibilità alla mano (RR = 0,37) un tempo inferiore di ritorno alle attività della vita quotidiana e un miglioramento nello stato di salute percepito e nelle scale di funzionalità dell'arto superiore. È quindi oggi indiscusso il fatto che, in presenza di un LS negativo, lo svuotamento del cavo ascellare non determina alcun miglioramento in termini di sopravvivenza, e che la tecnica del LS consente un notevole miglioramento della qualità della vita delle pazienti trattate.

#### Micrometastasi nel linfonodo sentinella

Successivamente si è ipotizzato che, anche in presenza di metastasi nel LS, la biopsia del LS potesse essere equivalente alla dissezione dei linfonodi ascellari. Nel trial Z0011<sup>30</sup>, che aveva come obiettivo quello di verificare quest'ultima ipotesi, in donne con tumore invasivo T1 e T2 senza linfonodi palpabili ed 1 o 2 LS positivi, l'utilizzo del solo LS non determinò risultati inferiori in termini di sopravvivenza rispetto alla dissezione dei linfonodi ascellari. Si noti che tutte le donne erano state trattate con nodulectomia ed irradiazione dell'intero seno, mentre non era prevista l'irradiazione del cavo ascellare. Il campione oggetto dello studio non comprendeva pazienti sottoposte a mastectomia, né pazienti con 3 o più linfonodi positivi.

Questi risultati, tuttavia, presentano alcuni elementi criticabili, il principale dei quali è rappresentato dalla scarsa potenza statistica dello studio: a fronte dell'obiettivo dichiarato di reclutare 1900 pazienti, solo 891 furono inserite nel trial. Inoltre, la potenza statistica è data dal numero di eventi registrati, che furono solo 94, mentre era attesa una percentuale attorno al 20%. Nel corso dello studio, inoltre, tutte le pazienti erano state irradiate al seno, e non si può escludere che le radiazioni avessero interessato l'ascella, diminuendo il numero di cellule tumorali rimaste nei

linfonodi lasciati in sede, creando un possibile fattore di confondimento<sup>22</sup>.

Due anni dopo furono pubblicati i risultati del trial IBCSG 23-01<sup>31</sup>, in cui pazienti con micrometastasi di diametro inferiore ai 2mm e tumore primitivo T1 o T2 erano assegnate casualmente ad un braccio nel quale era prevista la linfadenectomia del cavo ascellare o a uno in cui non era prevista un'estensione dell'intervento chirurgico. Gli endpoint primari erano rappresentati dal tempo libero da malattia e dalla mortalità per tutte le cause a 5 anni. Era stata somministrata radioterapia adiuvante nel 92% delle pazienti sottoposte a linfadenectomia ascellare e all'89% delle pazienti sottoposte alla sola biopsia del LS. Non vi fu alcuna differenza tra le pazienti sottoposte a biopsia del LS e quelle sottoposte a linfadenectomia dell'ascella. Il risultato di questo trial, considerato insieme a risultati dello Z0011, offre ulteriore supporto al concetto che alcuni sottogruppi di pazienti con LS metastatico potrebbero non avere alcuno svantaggio prognostico rispetto a quelli sottoposti a linfadenectomia ascellare. La maggior parte delle società scientifiche, di conseguenza, hanno prodotto dei documenti di consenso che in soggetti con tumore T1 e T2 e linfonodi sentinella positivi per micrometastasi, trattati con lumpectomia ed irradiazione del seno può non essere considerata l'estensione della linfadenectomia ascellare<sup>22</sup>.

#### Chemioterapia neoadiuvante e linfonodo sentinella

La chemioterapia neoadiuvante è somministrata a donne che presentano un tumore primario di grandi dimensioni, ed è finalizzata a ridurre la massa del tumore primario prima della terapia locoregionale definitiva.

È fortemente dibattuto il momento in cui dovrebbe essere ricercato il LS rispetto alla chemioterapia, in quanto alcuni risultati portano a pensare che vi sia un tasso più alto di falsi negativi nel caso in cui la biopsia del LS sia effettuata dopo la chemioterapia.

È il caso di quanto è emerso dallo studio SENTINA<sup>32</sup>, condotto su 592 donne i cui linfonodi, clinicamente positivi, erano divenuti clinicamente negativi grazie alla terapia. Gli autori riportano un tasso di LS falsamente negativi nel 14,2%, dei casi, se confrontati con le positività rilevate con la linfadenectomia ascellare. Il tasso di falsi negativi, inoltre, aumentava al diminuire dei linfonodi sottoposti a biopsia, raggiungendo il 20% nel caso in cui fosse prelevato un singolo linfonodo. Il trial, tuttavia, non prevedeva un follow-up a lungo termine e, quindi, non forniva alcuna informazione rispetto alla sopravvivenza e al tempo libero di malattia dei due

gruppi.

Il trial ALLIANCE<sup>33</sup> ha confermato che il tasso di falsi negativi tende ad aumentare al diminuire del numero di linfonodi esaminati. Anche in questo caso, tuttavia, non sono stati riportati dati rispetto alla sopravvivenza e alla ricomparsa di malattia a lungo termine, e ricerche volte a verificare l'impatto del momento in cui viene effettuata la biopsia del LS rispetto alla chemioterapia neoadiuvante saranno determinanti nello stabilire se la tecnica sia applicabile dopo la sua somministrazione. Al momento, le linee guida<sup>21</sup> raccomandano di effettuare la biopsia del LS prima della somministrazione della chemioterapia neoadiuvante, perché può fornire indicazioni aggiuntive affidabili per la pianificazione del trattamento locoregionale.

Una applicazione specifica del LS, infine, potrebbe riguardare le pazienti di età superiore ai 70 anni, per le quali è stato osservato che, anche in presenza di linfonodo sentinella positivo, la sopravvivenza nelle donne di questa età non sarebbe aumentata dalla linfadenectomia ascellare. Tuttavia, i lavori che supportano questa tesi sono basati su dati retrospettivi, e necessitano di essere confermati da ulteriori studi<sup>22</sup>.

Nel complesso, si può certamente affermare che la biopsia del LS si confermi un cardine della chirurgia oncologica della mammella, e che gli sviluppi in corso confermino la tensione verso una chirurgia meno invasiva, capace di mantenere uno standard di cure capace di minimizzare la morbidità e la mortalità della patologia.

## **4.2 Melanoma**

La biopsia del linfonodo sentinella prevede, nel caso del melanoma, l'esecuzione di una linfoscintigrafia pre-operatoria per l'identificazione della stazione linfonodale cui afferisce la linfa proveniente dal tumore primitivo. La linfa, infatti, può localizzarsi in stazioni linfonodali multiple, e la loro localizzazione prima dell'intervento è utile per la corretta individuazione dei linfonodi da asportare. Per esempio, la linfa proveniente dalle porzioni distali degli arti superiori ed inferiori, può raggiungere i linfonodi epitrocleari e poplitei, nelle lesioni del tronco possono essere coinvolte stazioni controlaterali, e nel caso del melanoma della testa e del collo le stazioni linfonodali pre-auricolari, intraparotidiche o sottocipitali possono

essere coinvolte prima di quelle della catena cervicale o sopraclaveare.

I LS dei melanomi della testa e del collo andrebbero sempre ricercati anche preoperatoriamente attraverso la SPECT-CT, che consente di identificare chiaramente, grazie all'imaging anatomico della TC, anche l'eventuale linfonodo che si trovi molto vicino al tumore primitivo e quindi "mascherato" dall'attività del sito di iniezione. Queste immagini, infatti, possono modificare l'approccio chirurgico, e possono indurre il chirurgo a modificare l'intervento previsto nel 20 – 50% dei casi rispetto all'imaging planare<sup>34,35</sup>

Come per altre patologie, anche per il melanoma la biopsia del LS consente un esame istopatologico ed immunohistochimico più accurato.

Il tracciante viene iniettato per via intradermica nei quattro quadranti attorno alla lesione primitiva, generalmente lo stesso giorno in cui verrà eseguito l'intervento. Il volume iniettato non deve essere superiore a 0,1ml per evitare la compressione dei vasi linfatici. Possono essere necessarie delle proiezioni particolari per i melanomi del capo-collo, in quanto la stazione linfonodale interessata sarà generalmente molto vicina al sito di iniezione del tracciante.

I traccianti maggiormente impiegati sono il <sup>99m</sup>Tc sulfuro colloide, il <sup>99m</sup>Tc nanocolloide e il <sup>99m</sup>Tc antimonio trisulfide colloidale. Alcuni centri utilizzano un ultrafiltro di 22 micron per selezionare dalla preparazione colloidale particelle di diametro maggiore. Un tracciante alternativo che è stato testato per l'impiego nella biopsia del LS nel melanoma è il tilmanocept.

La procedura non pone particolari problemi di radioprotezione, in quanto la sensibilità ottenuta dalle moderne gamma camere consente di somministrare dosi comprese tra 0,5 e 1 mCi. Si è stimato che la dose assorbita dal sito su un chirurgo durante l'intervento sia circa 1/30 di quella assorbita quotidianamente a causa della radiazione di fondo<sup>36</sup>.

È inoltre raccomandata per i pazienti con melanoma di spessore intermedio, ovvero compreso tra 1 e 4mm (T2 e T3), indipendentemente dalla regione in cui è situata la lesione primitiva. Inoltre, la biopsia potrebbe essere utile nelle persone con melanoma più spesso (T4) per migliorare l'affidabilità della stadiazione e facilitare il controllo regionale della patologia: 8 studi condotti su oltre 100 pazienti ciascuno hanno dimostrato una differenza significativa nella sopravvivenza dei pazienti sottoposti a biopsia del LS.

Non è raccomandata, invece, la biopsia per i melanomi in stadio T1, in quanto solo il 5% dei pazienti in questo stadio risulta avere lesioni metastatiche. Tuttavia,

poiché sono stati descritti tassi di positività del 20% nei pazienti con melanoma in stadio T1 con spessore maggiore di 0,75mm e in presenza di ulcerazione) o tasso mitotico più elevato ( $\geq 1/\text{mm}^2$ , la biopsia può essere presa in considerazione in queste categorie di pazienti).

Attualmente è raccomandata la linfadenectomia regionale completa in tutti i pazienti in cui si sia riscontrato un LS positivo, intendendo per positivo indistintamente un linfonodo in cui si siano rilevate metastasi, micrometastasi o cellule metastatiche isolate attraverso l'impiego di metodi di immunocistochimica. Il "Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial II", che si concluderà nel 2022, stabilirà se sia necessaria la dissezione linfonodale completa qualora sia identificato un LS positivo.

### **4.3 Carcinoma papillare della tiroide**

La tecnica del LS nel carcinoma papillare della tiroide viene proposta sia per ridurre le complicanze secondarie alla dissezione completa del compartimento centrale dei linfonodi del collo, sia per estendere la resezione linfonodale ai compartimenti laterocervicali nei casi in cui sia evidenziato il drenaggio linfatico alle stesse.

I tentativi di applicazione della tecnica hanno mostrato tassi di reperimento del linfonodo sentinella LS molto variabili, compresi tra il 65% ed il 90%. Le ragioni di tale variabilità potrebbero essere la sede di iniezione (i tassi maggiori si hanno per le iniezioni del tracciante per via peritumorale piuttosto che per via intratumorale) ed il numero di procedure effettuate (si hanno tassi di reperimento maggior negli studi condotti da centri che hanno applicato la tecnica il maggior numero di volte). I tassi di reperimento maggiori, inoltre, si riscontrano quando si utilizza una combinazione di radiotracciante e colorante blu.

Il numero di falsi negativi varia a seconda degli studi: una metanalisi sistematica del 2011, effettuata su 24 studi riportava un tasso di reperimento dell'83% con l'utilizzo del colorante blu, del 98% con l'utilizzo del radiotracciante e del 96% con l'utilizzo combinato delle due tecniche. La stessa metanalisi riportava che in nessuno degli studi presi in considerazione erano stati segnalati casi di falsi negativi qualora si fossero usate le due tecniche combinate, mentre il tasso era pari al 7,7 ed al 16% con l'utilizzo del colorante blu e del radiotracciante

rispettivamente. L'analisi immunoistochimica del LS, inoltre, consentiva l'identificazione di metastasi nel 15% dei pazienti altrimenti considerati negativi, concludendo che la biopsia del LS consentiva di evitare con sicurezza la linfadenectomia profilattica nel 57% dei pazienti<sup>37</sup>.

Studi successivi, tuttavia, non hanno confermato questi dati: un lavoro pubblicato nel 2011, che ha coinvolto 90 pazienti operate per cancro alla tiroide, riporta un tasso di falsi negativi pari al 25% ed un valore predittivo negativo del 74%<sup>38</sup>.

Per questa ragione si è iniziato a considerare il LS non una tecnica alternativa alla resezione linfonodale radicale, ma come una tecnica utile ad allargare l'area di dissezione, estendendola alle catene linfonodali laterocervicali nel caso in cui fosse dimostrato un drenaggio linfatico a queste aree. In questo studio, che utilizzava la tecnica della dissezione selettiva radio-guidata del comportamento del collo, ovvero lo svuotamento dell'intera stazione linfonodale di appartenenza del linfonodo sentinella, si è registrato un alto numero di falsi negativi (40,9%), e si è documentato che in una discreta percentuale dei casi lo svuotamento linfonodale dei linfonodi cervicali centrali non avrebbe consentito l'identificazione di metastasi identificate invece con lo svuotamento del compartimento di appartenenza del LS. Inoltre i risultati eccellenti ottenuti in termini di controllo della malattia (1,5% di recidive o persistenza di malattia a 3,5 anni) ed il basso tasso di morbidità (1,3% di lesioni permanenti del nervo laringeo ricorrente) suggeriscono che la tecnica del linfonodo sentinella potrebbe essere utile, in associazione allo svuotamento del compartimento linfonodale di appartenenza, ad aumentare il numero di metastasi individuate e migliorare l'accuratezza nella stadiazione della patologia, piuttosto che per evitare il ricorso alla linfadenectomia profilattica<sup>39</sup>.

Al momento non esistono evidenze che la biopsia del LS si associ a benefici in termini di sopravvivenza o ridotta morbidità per i portatori di carcinoma midollare della tiroide. Occorrono trial clinici controllati per determinare il significato delle metastasi occulte e la possibilità di individuarle attraverso la tecnica del LS<sup>40</sup>.

## 4.4 Carcinoma esofageo

La validità del LS per il trattamento del carcinoma esofageo è controversa a causa delle difficoltà tecniche nella sua identificazione e anche a causa del fatto che la quota di carcinomi esofagei identificati in uno stadio precoce è molto limitata.

La resezione dell'esofago per via transtoracica con dissezione linfonodale radicale è stata riconosciuta come una procedura risolutiva, ma la sua applicazione comporta elevata morbidità e riduzione della qualità della vita. Per questo motivo, si stanno svolgendo ricerche riguardanti la possibilità di impiegare il concetto del linfonodo sentinella per consentire il ricorso a procedure chirurgiche meno invasive accompagnate da una linfadenectomia selettiva. Un ulteriore vantaggio dell'impiego della tecnica potrebbe essere la possibilità di rilevare micrometastasi evidenziabili solo con metodiche immunoistochimiche non applicabili a grandi numeri di linfonodi<sup>41</sup>. Anche se, perché questa tecnica possa essere trasferita da un ambito sperimentale alla pratica clinica occorrono degli studi prospettici randomizzati, dati incoraggianti provengono da una metanalisi sistematica pubblicata nel 2014, che ha identificato 12 lavori per un totale di 492 pazienti. I metodi impiegati per l'identificazione del LS sono variabili, ed includono l'utilizzo di colorante blu, radionuclidi, tomografia computerizzata e linfoscintigrafia: il tasso di identificazione e la sensibilità si sono rivelati superiori con l'impiego di traccianti marcati con <sup>99m</sup>Tc rispetto al colorante blu, risultando in una probabilità di identificare il linfonodo sentinella pari al 97% (95% CI 81-99) ed una accuratezza diagnostica pari al 90% (95% CI 74-97%), mentre i tassi di identificazione ed accuratezza con il colorante blu sono stati del 97% (95% CI 89-99) e 0.79 (95% CI 68-87). La linfoscintigrafia, a fronte di una maggior complessità e più alti costi, produce risultati sostanzialmente sovrapponibili alla ricerca del LS con sonda gamma: reperibilità 97% (95% CI 81-99) e accuratezza diagnostica 90% (95% CI 74-97). Particolarmente promettenti sono stati i risultati ottenuti su pazienti con stadio cT1N0M0 o cT2N0M0<sup>42</sup>.

## 4.5 Carcinoma gastrico

La tecnica del LS applicata al carcinoma gastrico si riferisce attualmente essenzialmente alla pratica delle resezioni gastriche parziali.

Molti pazienti con carcinoma gastrico, infatti, vengono trattati attraverso la gastrectomia totale o distale per via laparoscopica. Molti pazienti trattati con questa procedura, tuttavia, risentono di complicanze a lungo termine, come la dumping syndrome o perdita di peso causata dall'incapacità di nutrirsi adeguatamente.

Tecniche come la gastroresezione segmentale e la gastrectomia prossimale con conservazione della valvola pilorica potrebbero contribuire ad una migliore qualità della vita dei pazienti trattati, tuttavia la possibilità di non individuare, con queste tecniche, metastasi del secondo o del terzo compartimento linfonodale potrebbe determinare dei risultati sfavorevoli in termini di sopravvivenza.

Il concetto di LS promette di contribuire a risolvere questo problema.

La tecnica consiste nell'iniezione di un tracciante radioattivo nello strato sottomucoso dei 4 quadranti in corrispondenza del tumore primitivo per via gastroscopica, seguita dall'iniezione per via endoscopica di un tracciante colorato blu.

È necessaria la resezione del legamento gastrocolico per consentire la visualizzazione completa per via endoscopica di tutte le stazioni linfonodali. I linfonodi della stazione linfonodale cui afferisce la linfa drenata dal tumore si colorano di blu in circa 15 minuti. La localizzazione del linfonodo è facilitata dall'utilizzo di una sonda gamma endoscopica.

I tumori dello stomaco possono drenare ad una delle seguenti stazioni linfonodali: area dell'arteria gastrica sinistra, area dell'arteria gastrica destra, area gastroepiploica sinistra, area gastroepiploica destra, ed area gastrica posteriore. La tecnica del linfonodo sentinella consente di identificare quale di queste aree sia potenzialmente interessata da metastasi.

A differenza di quanto previsto per i LS del melanoma e del cancro al seno, è previsto che non venga asportato il singolo linfonodo, ma l'intera stazione linfonodale di appartenenza, che sarà quindi esaminata intraoperatoriamente per la ricerca dei noduli indicati colorante o dal tracciante radioattivo<sup>43</sup>.

Una alternativa efficace alla combinazione del colorante blu con il radiotracciante potrebbe essere l'utilizzo del verde indocianina, che attraverso una camera ad

infrarossi può essere individuato anche sotto uno strato di connettivo o tessuto adiposo spesso 1 cm<sup>44,45</sup>.

Recentemente è stata prodotta una metanalisi degli studi disponibili sull'applicabilità del concetto del LS nel carcinoma gastrico che include 38 studi ben condotti su un totale di 2128 pazienti, e che dimostra che il tasso di reperimento del LS è pari al 94%, mentre la sensibilità nel predire la presenza di metastasi linfonodali è pari al 92% rispettivamente. Le conclusioni di questa metanalisi sono che la tecnica del LS sia affidabile nei cancri dello stomaco T1, purché effettuata con l'uso combinato di tracciante colorato e radioattivo.

È attualmente in corso un trial clinico, in cui la biopsia basata sulla tecnica del linfonodo sentinella è stata effettuata su 400 pazienti, con carcinoma gastrico di basso grado cT1 N0M0 o cT2 N0M0 con diametro del tumore primario inferiore ai 4 cm. Il tasso di reperimento è stato pari al 98%, e l'accuratezza nel determinare la presenza di metastasi del 98%. I risultati di questo trial potranno dare delle informazioni fondamentali sull'impiego della tecnica del linfonodo sentinella nel carcinoma gastrico.

#### **4.6 Cancro del colon-retto**

Nel caso del cancro del colon retto, il LS non è utilizzato per ridurre l'estensione della resezione chirurgica, ma con lo scopo di identificare, tra i linfonodi mesenterici escissi nel corso dell'intervento, quelli che più probabilmente contengono metastasi, per poterli sottoporre ad una indagine istopatologica più accurata ed identificare così i casi che devono essere sottoposti a chemioterapia adiuvante. La tecnica del LS, inoltre, consente di identificare eventuali varianti anatomiche nel drenaggio linfatico, che possono determinare la necessità di estendere l'escissione chirurgica, eventualità che si verifica nel 22% dei casi in cui viene applicata la tecnica. La tecnica consente una stadiazione più accurata, e permette di identificare, quindi, i pazienti che devono essere sottoposti a terapia neoadiuvante<sup>46</sup>.

Nel tumore del colon retto, il più importante fattore prognostico è l'interessamento linfonodale. Tuttavia, esiste un'ampia quota di pazienti che, anche in un quadro istopatologico negativo, svilupperà successivamente una ripresa della malattia. Ciò è dovuto al fatto che, con le sezioni normalmente utilizzate per l'analisi dei

linfonodi (una ogni 2mm), possono facilmente sfuggire le metastasi, di dimensioni pari o inferiori a 0,5 mm, presenti nel 70% dei casi, e la probabilità di non poter osservare la presenza di malattia metastatica è ancora più grande nel caso delle micrometastasi, che si possono evidenziare solo con microsezionamenti o con l'impiego di tecniche immunoistochimiche. L'impiego di sezioni più sottili, così come l'impiego di tecniche immunoistochimiche su tutti i linfonodi escissi nel corso dell'intervento chirurgico, tuttavia, non è sostenibile dal punto di vista economico ed organizzativo. Il senso della tecnica del LS, quindi, è quello di consentire, su un numero di linfonodi limitato ma identificato in modo mirato, l'identificazione di micrometastasi, individuando così quei pazienti che devono essere sottoposti a terapia neoadiuvante<sup>47</sup>. L'impiego di queste tecniche ha portato ad una modifica della stadiazione del tumore nel 20 – 24%<sup>48,49</sup> dei casi.

Il LS è identificabile nel 90% dei casi, e la sensibilità della tecnica è pari al 70%. Il tasso di identificazione è maggiore per pazienti con un BMI inferiore, se la tecnica "in vivo" è accompagnata da iniezione di tracciante colorato ex vivo. La sensibilità, inoltre, risulta maggiore per i cancro rettali e per tumori T1 e T2, in quanto la diffusione di cellule metastatiche da parte di tumori di grandi dimensioni sarebbe in grado di alterare il deflusso della linfa attraverso l'ostruzione dei canali linfatici. La sensibilità, infine, è aumentata nel caso in cui siano identificati almeno 4 linfonodi sentinella.

Il tasso di identificazione è maggiore in quei centri in cui sono stati trattati con questa tecnica almeno 100 pazienti, il che fa supporre la necessità di un adeguato addestramento da parte del team che mette in atto la procedura<sup>50</sup>, e questo potrebbe spiegare la variabilità dei risultati ottenuti dai trial che hanno indagato l'impatto clinico dell'adozione di questa procedura<sup>47</sup>.

Un trial che sta dando risultati incoraggianti è condotto dal gruppo di Bilchik, ed indaga l'accuratezza della stadiazione ottenuta attraverso l'analisi immunoistochimica e molecolare con RT-PCR dei LS in pazienti affetti da cancro del colon-retto in stadio 1 e 2. Nel 2006 sono stati pubblicati dei risultati preliminari, riferiti a 132 pazienti reclutati tra il 2001 ed il 2005. Il LS veniva identificato con iniezione intraoperatoria di un tracciante blu, ed il linfonodo sentinella veniva marcato con un punto di sutura per la successiva analisi istopatologica. Se il chirurgo non era in grado di identificare il linfonodo in vivo, questo veniva identificato successivamente dal patologo ex vivo immediatamente dopo la resezione chirurgica.

I risultati preliminari indicano una percentuale di reperimento del LS del 96%, ed il numero mediano di linfonodi sentinella individuati era pari a tre, mentre il numero mediano di linfonodi complessivamente escissi era pari a 14. Il numero di linfonodi sentinella falsi positivi era pari al 7%, valore simile a quanto si ottiene con l'analisi del linfonodo sentinella nel tumore della mammella e nel melanoma<sup>51</sup>.

Uno studio prospettico multicentrico randomizzato condotto su 84 soggetti dal US Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study (GI-01), che aveva come scopo verificare se l'impiego del linfonodo sentinella fosse in grado di migliorare la stadiazione complessiva della stazione linfonodale, e quindi migliorare la sopravvivenza ed il tempo libero da malattia dei pazienti sottoposti a questa tecnica, rispetto a quelli trattati con la metodica tradizionale, ha mostrato che l'impiego di questa tecnica esita in aumento nella percentuale di pazienti catalogati N1, ed in una differenza significativa (71% vs 87% p=0,04) nella percentuale di persone libere da malattia a 5 anni tra quelli classificati N0. Gli autori concludono che un'analisi mirata del linfonodo sentinella possa aumentare il numero di pazienti liberi da malattia di una non trascurabile quota del 15%<sup>52,53</sup>.

Al contrario, in uno studio prospettico controllato il tasso di reperimento del LS è stato solo dell'85%, ed il numero di linfonodi classificati come falsi negativi è stato del 46%<sup>54</sup>. Nel caso di questo studio multicentrico, il numero di pazienti afferenti a ciascuna struttura era molto basso, e ciò potrebbe giustificare il basso tasso di reperimento, dato che altri studi hanno indicato come nei primi 30-50 casi di ciascuna struttura di verifici una bassa percentuale di successo. Inoltre, non erano stati utilizzati metodi immunocistochimici per l'esame istopatologico del LS<sup>47</sup>. Date le difficoltà tecniche nell'introduzione della metodica ed i risultati discordanti forniti da studi con un numero di casi relativamente basso, la tecnica del LS non è entrata, ad oggi, nella pratica clinica di trattamento del carcinoma del colon-retto<sup>50</sup>.

## **4.7 Carcinoma polmonare**

Nel caso del tumore polmonare non a piccole cellule la morbidità associata alla resezione radicale delle stazioni linfonodali non è ritenuta eccessiva, tuttavia l'attenzione è rivolta alla possibilità di individuare, attraverso un esame istopatologico più approfondito, micrometastasi e cellule tumorali isolate che non potrebbero essere altrimenti individuate. Infatti il 40% dei tumori classificati N0 recidivano, e nel 20% dei casi ciò è dovuto alla presenza di micrometastasi non

individuare dalle tecniche anatomopatologiche tradizionali. Lyptay et al.<sup>55</sup> hanno condotto un trial in cui il tasso di reperimento del linfonodo sentinella è stato pari all'88%, utilizzando come tracciante il <sup>99m</sup>Tc. In questo trial, l'esame immunoistologico ha evidenziato metastasi nel 24% dei linfonodi etichettati come negativi a seguito all'esame istologico dei linfonodi ottenuti con la chirurgia tradizionale. Tuttavia, ad oggi, il tasso di reperimento del LS attraverso la combinazione di radiotracciante marcato con <sup>99m</sup>Tc e colorante vitale è ancora largamente inferiore al 90% nella maggior parte degli studi (51% – 88%). Occorre sottolineare tuttavia che, analogamente a quanto osservato per le ricerche legate al linfonodo sentinella relative ad altri tipi di patologia neoplastica, i tassi di reperimento superiori si ottengono in quei centri che reclutano più di 100 pazienti, e ciò a causa della ripida curva di apprendimento caratteristica della metodica. Tecnologie come la PET-CT con iniezione di FDG ha dato risultati promettenti, ma risulta essere troppo costosa per una applicazione su vasta scala. Altre tecniche, come l'utilizzo di mezzi di contrasto magnetici o traccianti fosforescenti potrebbero portare a tassi di reperimento del LS superiori al 90%, ma sono necessari ulteriori trial che lo dimostrino<sup>56</sup>.

#### **4.8 Carcinoma della prostata**

Uno spunto interessante è fornito dal recente studio che ha trattato con biopsia del LS e prostatectomia 1229 pazienti affetti da carcinoma prostatico tra il 2005 ed il 2009. Il 17% dei pazienti aveva un coinvolgimento linfonodale, ed il tasso di coinvolgimento era del 3% nel gruppo a basso rischio, del 14% nel gruppo a rischio intermedio e del 37% tra quelli ad alto rischio di metastasi linfonodali. Se fossero state seguite le attuali linee guida europee, non sarebbero stati diagnosticati il 15% dei linfonodi positivi, mentre l'accuratezza sarebbe notevolmente migliorata se si fosse utilizzato come parametro la positività del primo linfonodo (sentinella) della stazione linfonodale. Lo studio prevedeva, per tutti i pazienti, la ricerca del LS per via laparotomica<sup>57</sup>, tuttavia è stato recentemente proposto anche un approccio mini-invasivo per via laparoscopica<sup>58</sup>. Non esistono, tuttavia, evidenze che la maggior accuratezza diagnostica esiti in una maggiore sopravvivenza ed in un periodo libero da malattia più prolungato.

## 4.9 Altri tumori urologici

Tra i tumori urologici, le esperienze principali riguardano il carcinoma del **pene**, per il quale è la metanalisi più recente individuata sintetizza i risultati di 13 studi e riporta un tasso di identificazione complessivo pari all'88%. Negli studi che avevano utilizzato una combinazione di colorante blu e radiotracciante il tasso di reperimento del LS era stato, invece, pari al 90%. La sensibilità globale era pari all'88%, mentre si raggiungeva una sensibilità complessiva del 92% negli studi che utilizzavano sia il tracciante colorato che quello radioattivo, e che reclutavano solo casi cN0 ed una sensibilità complessiva è anch'essa pari all'88%<sup>59</sup>, con risultati leggermente superiori utilizzando una combinazione di colorante blu e radiotracciante. Sebbene da una ricerca condotta su pubmed utilizzando le mesh "Sentinel Lymph Node Biopsy" e "Penile neoplasms" non siano emersi trial clinici che documentino l'impatto dell'applicazione della metodica della biopsia del linfonodo sentinella sulla sopravvivenza o sul tempo libero da malattia dei pazienti trattati, la metodica è ritenuta sicura e si sta diffondendo nella pratica clinica.

Il cancro del **testicolo** è una delle neoplasie più frequenti nel sesso maschile, e circa i due terzi dei pazienti ha una malattia allo stadio I al momento della diagnosi.

Il seminoma ed i non-seminoma sono definiti di stadio I in presenza di una tomografia computerizzata negativa per la ricerca di metastasi linfonodali del petto, dell'addome e della pelvi, oltre a valori normali di markers ematochimici della patologia come a-fetoproteina, gonadotropina corionica umana e lattato deidrogenasi.

A causa della bassa incidenza di metastasi linfonodali, il trattamento d'emblée con linfadenectomia retroperitoneale o chemioterapia risulta eccessivamente invasivo per il 65% dei pazienti con non-seminoma e nell'80% dei pazienti con seminoma.

D'altra parte, la sorveglianza a lungo termine appare estremamente onerosa in quanto richiede l'esecuzione di accertamenti molto costosi e può portare alla diagnosi di metastasi linfonodali tardivamente.

Per queste ragioni si sta introducendo, nei pazienti con neoplasia al primo stadio, la tecnica del LS. La procedura consiste nella somministrazione di nanocolloide marcata con <sup>99m</sup>Tc, visualizzazione preoperatoria scintigrafica del LS ed individuazione intraoperatoria dello stesso con una sonda gamma<sup>60</sup>.

La sede di inoculo peri-testicolare non consente di individuare il linfonodo

sentinella, in quanto si traduce in un drenaggio nella regione inguinale, mentre i testicoli drenano generalmente ai linfonodi retroperitoneali. L'iniezione intratesticolare con ago sottile di 99 mBq di tracciante radioattivo disciolto in 0,2 ml di soluzione, effettuata in anestesia locale indotta con l'iniezione di lidocaina in sede funicolare, invece, si è dimostrata di semplice esecuzione e ben tollerata<sup>61</sup>. In analogia al carcinoma del pene<sup>59</sup>, la velocità del drenaggio dei traccianti nanocolloidali richiede l'esecuzione di un'acquisizione dinamica immediatamente dopo l'iniezione per distinguere le stazioni linfonodali di primo e di secondo livello. I linfatici dal testicolo destro drenano prevalentemente alle regioni laterali, anteriori e mediali alla vena cava e anteriormente all'aorta. Il drenaggio del testicolo sinistro è prevalentemente alle aree laterali, anteriori e mediali all'aorta. In alcuni pazienti, invece è possibile identificare le stazioni linfonodali lungo i vasi testicolari. Pertanto è possibile identificare pre-operatoriamente la stazione linfonodale che deve essere escissa. Nel complesso, la SPECT/CT preoperatoria si è dimostrata accurata nel fornire informazioni anatomiche sulla localizzazione del LS, mentre l'impiego intraoperatorio di una sonda gamma può facilitarne la localizzazione in sala operatoria<sup>62</sup>.

Il carcinoma **renale** rappresenta il 3% delle neoplasie dell'adulto, ed il coinvolgimento linfonodale è uno degli aspetti che maggiormente influenzano la prognosi. Possono essere coinvolte diverse stazioni linfonodali retroperitoneali, in particolare quelle paraortiche e paracavali. Tuttavia, non è ancora chiaro se i pazienti sottoposti a resezione linfonodale completa abbiano un beneficio in termini di prognosi: mentre, in quei casi in cui si è proceduto alla resezione linfonodale, si osserva un rapporto tra il numero di linfonodi positivi e la prognosi infausta, non è stato possibile dimostrare alcuna correlazione tra prognosi e numero di linfonodi asportati. Gli studi sull'applicazione della biopsia del LS sono piuttosto limitati, ed è riportato in letteratura un solo studio su pazienti clinicamente non metastatici con tumore primitivo di diametro inferiore ai 10 cm, in cui la linfoscintigrafia pre-operatoria con nanocolloide iniettato nella lesione primitiva per via ultrasonografica, che aveva consentito di identificare la stazione linfonodale di drenaggio<sup>63</sup>.

Circa il 33% dei pazienti con cancro della **vescica** con infiltrazione della tonaca muscolare presentano disseminazioni che non erano state individuate nel corso del trattamento.

Il trattamento consiste nella resezione della vescica e delle stazioni linfonodali di

riferimento, ma non è chiaro se lo svuotamento linfonodale debba essere considerato una procedura terapeutica o diagnostica, per consentire una corretta stadiazione della patologia.

Non c'è accordo nemmeno sull'estensione della linfadenectomia che è opportuno praticare: l'approccio più aggressivo, tenuto da chi ritiene che la linfadenectomia abbia un significato prevalentemente terapeutico, consiste nella svuotamento dell'area compresa tra il nervo genitofemorale laterale, la parete posteriore della vescica e la biforcazione aortica prossimale. È controversa anche la necessità di provvedere alla resezione dei linfonodi di secondo e terzo livello, ovvero quelli compresi tra la stazione mesenterica inferiore e la biforcazione dell'aorta. Attualmente è raccomandato un approccio più conservativo, consistente nello svuotamento, a fini diagnostici e di stadiazione della fossa degli otturatori distalmente alla biforcazione dell'arteria iliaca comune<sup>64,65</sup>. Inoltre, linfonodi metastatici vengono individuati solo nel 20-25% dei pazienti così trattati<sup>66,67</sup>.

#### 4.10 Tumori ginecologici

Il metodo del LS è stato applicato anche ad alcuni tumori ginecologici<sup>68</sup>.

Nel cancro della **cervice uterina** i risultati hanno mostrato aspetti positivi e negativi. In questa tipologia di tumori viene usato come tracciante sia il colorante vitale che il radiocolloide, con una preferenza per il tracciante radioattivo, che consente di identificare il linfonodo sentinella anche in caso di sanguinamento e consente la sua identificazione anche facendo delle incisure più piccole. Gli svantaggi dell'impiego del tracciante radioattivo sono la necessità di un servizio di medicina nucleare attivo nella struttura e l'impossibilità di identificare linfonodi al sito di iniezione del tracciante nella cervice, circostanza nella quale il colorante blu è più efficace. Il tasso di reperimento dei linfonodi è pari all'88%, con il tecnezio, dell'81% con il colorante e del 96% combinando le due tecniche. La sensibilità per l'identificazione di metastasi, invece, è pari all'81% con l'uso del colorante e dell'88% con l'uso dei collidi marcati con <sup>99m</sup>Tc<sup>69</sup>. Questi dati, insieme a molti altri che documentano una buona affidabilità della tecnica del LS, consentiranno la progettazione di trials clinici che dovranno verificare se questa metodica sia sufficientemente accurata da risparmiare il ricorso ad interventi più invasivi, senza però compromettere la sopravvivenza e la percentuale di pazienti liberi da recidive

o se, l'applicazione di tecniche di biologia molecolare non applicabili a quantità superiori di linfonodi possa migliorare la sopravvivenza delle pazienti grazie ad una più accurata stadiazione.

Tra i tumori ginecologici, risultati incoraggianti si hanno soprattutto per il carcinoma squamocellulare della **vagina**, per il quale la metanalisi sistematica più recente ha identificato 49 studi per un totale di 1948 pazienti, riportando tassi di identificazione variabili dal 92 al 96%<sup>70</sup> e sensibilità comprese tra il 90 ed il 95%. Poiché, tuttavia, il tasso di falsi negativi era inferiore al 2% qualora il diametro del tumore primitivo fosse inferiore ai 4cm e non si localizzasse sulla linea mediana, gli autori concludono che la tecnica del LS è sicura in questo sottogruppo di pazienti, pur ammettendo che potrebbero essere opportuni ulteriori studi che si focalizzassero su questo sottogruppo. I risultati si riferiscono a studi condotti con il colorante blu utilizzato in associazione al tracciante radioattivo, mentre non è stato possibile giungere ad una conclusione sui possibili miglioramenti determinati dall'utilizzo intraoperatorio della fluorescenza ad infrarossi con il verde indocianina<sup>71</sup>. I risultati di studi osservazionali<sup>72</sup> e trials clinici non controllati<sup>73</sup> mostrano che le donne operate per questa neoplasia, e per le quali il LS sia risultato negativo, hanno tassi di recidiva attorno al 2%, anche in assenza di resezione dell'intera stazione linfonodale, e morbilità a medio e lungo termine inferiore; la tecnica sta quindi trovando applicazione anche nella pratica clinica.

L'incidenza di positività linfonodale per il carcinoma **ovarico** di stadio precoce è molto bassa, attorno al 5-10%<sup>74</sup>, mentre la linfadenectomia pelvica e paraortica comporta interventi chirurgici di tempo prolungato e possibili morbilità correlate.

Questi dati fanno sì che si stia considerando l'applicabilità della biopsia del LS per questa patologia. Tuttavia l'applicabilità della tecnica è limitata la possibilità di provocare la rottura della capsula ovarica, e conseguentemente lo spargimento di cellule metastatiche nella cavità peritoneale. Le ricerche effettuate attraverso l'iniezione di polvere di carbone in 11 pazienti con carcinoma ovarico<sup>75</sup> hanno documentato un drenaggio bilaterale nel 67% delle pazienti. In tutti i casi i linfonodi sentinella erano localizzati nelle catene linfonodali dell'iliaca comune e iliache esterne. Sono in corso ricerche volte a valutare l'affidabilità della tecnica attraverso l'iniezione di tracciante radioattivo nel ligamento ovarico proprio e nel legamento infundibolo-pelvico<sup>69</sup>.

## 4.11 Tumori testa-collo

Ci sono numerosi studi sul mapping linfatico del carcinoma squamocellulare della testa e del collo. Per questa neoplasia, esistono tuttora delle controversie rispetto all'approccio più indicato: la dissezione radicale delle catene linfonodali del collo potrebbe determinare una stadiazione più accurata della malattia, tuttavia molti oncologi preferiscono un atteggiamento attendista, in quanto in oltre il 70% dei pazienti, l'esame delle catene linfonodali risulta negativo. L'introduzione della tecnica del LS quindi, potrebbe consentire un approccio più razionale al trattamento di questa neoplasia, evitando sia il pericolo di sottostadiazione che il ricorso a terapie inappropriate. La più recente metanalisi ha identificato 16 studi su tumori in stadio T1 e T2, con un tasso complessivo di identificazione del linfonodo sentinella del 95%, un tasso di falsi negativi del 13% ed un valore predittivo negativo del 95%. Il sottogruppo di articoli caratterizzati da una migliore qualità metodologica, invece, mostravano un tasso di identificazione del 95%. Esistevano delle sorprendenti differenze tra i trials finalizzati alla validazione della tecnica del LS attraverso il confronto con la biopsia effettuata sui linfonodi ottenuti dallo svuotamento completo delle stazioni linfonodali (91%) ed i trials che utilizzavano esclusivamente la tecnica del LS, nei quali l'84% dei linfonodi risultati positivi all'analisi patologica in laboratorio erano positivi anche all'analisi intraoperatoria. Questo determinava un potere predittivo negativo della procedura pari al 96%: solo nel 4% dei casi si era reso necessario un secondo intervento per procedere allo svuotamento completo delle stazioni linfonodali<sup>76</sup>. Le nuove metodiche immunoistochimiche potrebbero migliorare ulteriormente questi risultati, ed il LS è una pratica clinica ormai diffusa per questo tipo di neoplasia<sup>77</sup>. I traccianti maggiormente impiegati risultano essere il <sup>99m</sup>Tc colloide solfuro, l'albumina colloidale marcata con <sup>99m</sup>Tc ed il colloide renio solfuro <sup>99m</sup>Tc. Non esistono trials che abbiano confrontato i diversi traccianti tra loro<sup>78</sup>.

## 5. TRACCIANTI

Lo stato dei linfonodi regionali è il più importante fattore prognostico nel tumore della mammella, nel melanoma ed in altri tumori solidi con diffusione linfatica<sup>79,80,81</sup>.

Diversi studi hanno dimostrato che lo stato del LS è un accurato indicatore dello stato del secondo e dei successivi linfonodi sul decorso dei linfatici provenienti dal tumore primitivo<sup>82,83,84</sup>.

Attualmente la metodica più utilizzata per la sua individuazione è la linfoscintigrafia, con l'utilizzo di radio traccianti e di imaging nucleare (preoperatoriamente) o di sonde portatili (gamma probe) intraoperatoriamente.

Esistono però molti altri tipi di traccianti, con caratteristiche estremamente diverse tra loro, specifici per tecniche di imaging diverse da quelle di medicina nucleare, come raggi x, ultrasuoni, risonanza magnetica o fluorescenza.

### 5.1 Caratteristiche fisico-chimiche

Per quanto riguarda l'aspetto della struttura chimico-fisica, il fattore dominante che controlla l'efficienza del trasporto del farmaco nel sistema linfatico è la dimensione della particella.

Traccianti di piccole dimensioni (5-10 nm) vengono assorbiti e trasportati molto rapidamente attraverso i linfatici<sup>85</sup>. Questa caratteristica da un lato permette una rapida individuazione intraoperatoria del drenaggio linfatico, ma dall'altro consente la ricerca del LN solo in una finestra temporale molto breve, rendendo difficoltosa la discriminazione tra LN e linfonodi successivi. Inoltre le molecole a basso peso molecolare tendono a diffondere all'esterno, riducendo la concentrazione nel linfonodo interessato ed aumentando il segnale di fondo<sup>86,87</sup>.

I traccianti di dimensioni medie (50-200 nm) hanno una velocità di trasporto minore<sup>88,89</sup> e lasciano quindi più tempo per l'individuazione del LN. Tuttavia questi traccianti potrebbero non migrare dal sito di iniezione o "saltare" i linfonodi di primo livello se metastatici<sup>90,91</sup>.

I traccianti di dimensioni maggiori (>500 nm) migrano nei linfatici per mezzo di macrofagi e cellule dendritiche in seguito a fagocitosi, e per questo presentano una migrazione estremamente lenta<sup>88,92</sup>.

Il tracciante di dimensioni ideali dovrebbe essere abbastanza piccolo da entrare e venire trasportato nei linfatici rapidamente ma abbastanza grande da rimanere intrappolato nei linfonodi il tempo necessario per l'identificazione del LN senza diffondere precocemente ai linfonodi successivi<sup>88</sup>.

Naturalmente la produzione di un tracciante "ideale" richiede un compromesso tra le dimensioni intrinseche di un dato agente e le dimensioni desiderate. Un esempio è l'uso di "fluorofori" o coloranti usati per l'imaging ottico: il tipo di molecola, la sua composizione e l'ambiente in cui si trova influenzano grandemente la sua idrodinamicità. Questi traccianti possono essere coniugati con altre molecole in maniera controllata per variare le loro dimensioni e la loro idrodinamicità; questo concetto è stato dimostrato con il fluoroforo verde indocianina (ICG), che è stato coniugato con albumina sierica umana (HSA) per aumentarne le dimensioni<sup>93</sup>. Anche i radiocolloidi correntemente utilizzati in Medicina Nucleare, come l'albumina nanocolloidale (Nanocoll) e il renio solfuro nanocolloidale (Nanocis) seguono questo concetto, e pertanto la loro preparazione (che si ottiene per mezzo di kits) deve essere molto accurata<sup>94</sup>. Purtroppo, nonostante la dimostrata utilità clinica, alcuni radiocolloidi attualmente in uso presentano una grande dispersività che si traduce in un disomogeneo trasporto linfatico e di conseguenza un subottimale imaging del LS.

I progressi nello studio dei rapporti tra le nanoparticelle e di come si possono interfacciare, ha portato alla loro associazione anche con macromolecole che hanno migliorato la loro stabilità prevenendo l'aggregazione e aumentando la biocompatibilità<sup>95</sup>. Una delle più comuni macromolecole utilizzate è il polietilenglicole (PEG) che, legato alle nanoparticelle, migliora grandemente la loro rapidità di diffusione e stabilità biologica ritardando il processo di fagocitosi<sup>96</sup>. Il PEG può inoltre fungere da base per altri ligandi per aumentare ulteriormente la funzionalità delle particelle che compongono i vari traccianti.

## **5.2 Traccianti convenzionali**

La maggior parte delle procedure di ricerca del LS si basano attualmente su coloranti organici (per mappare il flusso linfatico intraoperatoriamente), radiotraccianti o su una combinazione dei due.

I "blue dyes" sono stati ampiamente utilizzati a partire dagli anni '90; sono

rapidamente catturati dai linfatici e permettono al chirurgo di localizzare i linfonodi senza bisogno di gamma probe. Sono semplici da preparare e hanno un basso rischio sia per il paziente che per il chirurgo, ma hanno una resa limitata. Infatti, il loro basso peso molecolare si traduce in un rapido wash-out dai linfatici ed in uno scarso intrappolamento nei linfonodi. Queste caratteristiche richiedono particolare abilità da parte del chirurgo nel localizzare e rimuovere prontamente il LS prima che il colorante raggiunga i linfonodi successivi<sup>97</sup>. Si è inoltre visto che, anche se molto raramente, i coloranti possono generare reazioni anafilattiche in alcuni pazienti<sup>98</sup>.

I coloranti sono utili nell'individuazione dei linfonodi più superficiali, come nel tumore mammario o nel melanoma, mentre diventa molto più difficile la localizzazione di quelli più profondi, soprattutto nei pazienti in sovrappeso<sup>99</sup>, o quelli mediastinici per la frequente presenza di linfonodi antracotici (fumo o inquinamento)<sup>100,101</sup>.

Già pochi anni dopo l'introduzione dei "blue dyes" per la ricerca del LS si è dimostrata la possibilità di utilizzare anche radiotraccianti gamma-emittenti<sup>102,103</sup>; attualmente i più popolari sono costituiti da nanoparticelle marcate con Tecnezio 99m (i Radiocolloidi).

Possono essere utilizzati anche altri marcatori, come ad esempio Iodio 123 o Tallio 201, ma il <sup>99m</sup>Tc rimane il più popolare per la semplicità di produzione, la breve emivita e l'energia abbastanza alta (140KeV) da non creare problemi in caso di linfonodi profondi o situati in un contesto di tessuti molto densi.

La sensibilità di questa metodica è molto alta<sup>104</sup>, ma la risoluzione spaziale è molto scarsa; questo causa problemi nei casi in cui il LN sia situato in prossimità del tumore primitivo, poiché il segnale derivante dal linfonodo può essere perso all'interno del segnale emesso dal sito di iniezione. Questa eventualità si verifica in tumori come quello gastrico, in cui in più del 90% dei casi il LN si trova a meno di 3 centimetri dal tumore primitivo<sup>105</sup> e il drenaggio è imprevedibile per la sua multidirezionalità<sup>106</sup>.

Combinando "blue dyes" e radiocolloidi l'accuratezza della metodica aumenta significativamente<sup>91,107</sup>.

### 5.3 Traccianti ottici

Sono molecole organiche che danno un segnale fluorescente sotto lo stimolo di una sorgente luminosa. A seconda della lunghezza d'onda utilizzata, può essere percepito anche il segnale proveniente da linfonodi situati più profondamente rispetto a quelli che si possono individuare con il solo colorante. Il suo raggio d'azione si colloca quindi tra quello puramente visivo del "blue dye" e quello radiante e molto penetrante dei radiocolloidi tecneziati.

Formulazioni a base di metalli pesanti, come il Cadmio, hanno ottime proprietà ottiche, ma non hanno preso campo nell'uso clinico a causa della loro intrinseca tossicità<sup>108</sup>.

Il verde indocianina (ICG), invece, è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA); inizialmente utilizzato come colorante semplice, con l'avvento della tecnologia delle camere sensibili all'infrarosso si è dimostrato ampiamente migliore dei blue dyes<sup>109</sup>, con una percentuale di riscontro del LS in circa il 95% dei tumori mammari<sup>110</sup>. Questi risultati hanno incoraggiato l'utilizzo dell'ICG in altri campi, con risultati preliminari nel riscontro del LNS nel 100% dei melanomi (anche se studio su 10 pz)<sup>111</sup>, nel 98% dei tumori gastrici<sup>110</sup> e nell'81% dei tumori polmonari<sup>112</sup>.

Può inoltre essere utilizzata in forma libera o legata ad albumina umana, forma quest'ultima che migliora sia la frequenza di individuazione del LS sia la potenza del segnale fluorescente<sup>113</sup>.

### 5.4 Traccianti fotoacustici

Si tratta di particelle che, investite da luce laser pulsata, creano onde acustiche nel tessuto che possono essere captate da un normale apparato da ultrasonografia. Queste nanoparticelle, come i nanotubi di carbonio o di oro, sono state utilizzate con successo nell'imaging dei linfatici, poiché possiedono particolari proprietà ottiche, tra le quali la capacità di sostenere la risonanza superficiale del plasma<sup>114,115</sup>

Le nanoparticelle di oro presentano un buonissimo coefficiente di assorbimento dell'infrarosso; inoltre, la loro struttura permette la preparazione di particelle delle dimensioni e forma desiderate che sono caratteristiche determinanti sia per

l'assorbimento della luce sia per la diffusione e il trasporto del tracciante nei linfatici.

Seppure ancora sperimentale, l'imaging fotoacustico è già stato ampiamente utilizzato dimostrandosi una valida alternativa, non invasiva e a basso costo, ai coloranti, ai radiocolloidi ed ai traccianti ottici<sup>116</sup>.

## **5.5 Microbolle per ultrasonografia**

Si tratta di microbolle ecoriflettenti che vengono rilevate da apparecchi ultrasonografici ad alta risoluzione. Non è risultata però una metodica utile in sede operatoria per il reperimento del LS.<sup>117</sup>

## **5.6 Contrasti per tomografia computerizzata**

Sono stati utilizzati mezzi di contrasto iodati a basso peso molecolare per l'imaging linfatico, ma la loro accuratezza nell'individuazione del LS è limitata (circa il 30%)<sup>118</sup>. Questo è dovuto in parte alle piccole dimensioni degli agenti di contrasto iodinati a base di acqua, i quali, con un rapido wash-out, concedono una finestra temporale molto breve per l'imaging; a questo si è ovviato sostituendo i contrasti a base di acqua con emulsioni iodinate che, di maggiori dimensioni, presentano una maggior permanenza nei linfatici<sup>119</sup>.

Ci sono poi traccianti inorganici come le particelle d'oro, che lasciano una finestra temporale più ampia grazie alle loro maggiori dimensioni e coefficiente di assorbimento<sup>120</sup>. Purtroppo, per l'attenuazione, sarebbero necessarie quantità troppo elevate di contrasto (addirittura 7-8 g di oro per un soggetto di 80kg)<sup>121,122</sup> e pertanto questo tipo di imaging non è praticabile in vivo.

## **5.7 Traccianti magnetici**

La risonanza magnetica (RM) ha un'ottima risoluzione spaziale ed è l'ideale per i tessuti molli, quindi sarebbe una metodica ideale per l'imaging dei linfatici; i contrasti convenzionali come il gadolinio, però, hanno dimensioni troppo piccole e tendono a diffondere rapidamente dai vasi linfatici aumentando il rumore di

fondo<sup>123</sup>. Ma con il contributo di nanoparticelle magnetiche esogene come l'ossido di ferro è stato possibile mappare il decorso dei linfatici dal sito del tumore primitivo. Queste nanoparticelle possiedono bassa tossicità<sup>124</sup>, alta biocompatibilità<sup>125</sup>, lunga permanenza all'interno di linfatici<sup>123</sup>, forte segnale<sup>126</sup> e semplicità di produzione<sup>127</sup>.

Si tratta di un'ottima alternativa per pazienti che non vogliono essere esposti a radiazioni o chirurgia invasiva. Inoltre queste nanoparticelle sono ottime piattaforme per ulteriori eventuali ligandi, a differenza del gadolinio<sup>128</sup>.

Così come con la RM, le nanoparticelle di ossido di ferro possono essere individuate anche attraverso una sonda portatile<sup>129</sup>.

La diagnostica per immagini è stata protagonista, nel corso dell'ultimo ventennio, di una rivoluzione senza precedenti, legata all'introduzione e al progressivo perfezionamento di nuove metodiche di immagine, fra le quali quella che maggiormente è stata la protagonista di questa rivoluzione è la Risonanza Magnetica. Parallelamente allo sviluppo tecnologico, si è verificata una crescente attività di ricerca in ambito farmaceutico, finalizzata alla realizzazione di mezzi di contrasto in grado di migliorare l'accuratezza e l'utilità clinica delle nuove metodiche di diagnostica per immagini.

I mezzi di contrasto (MdC) per Risonanza Magnetica includono oggi una varietà di molecole che possono essere ricondotti a due categorie principali: i MdC paramagnetici e i MdC superparamagnetici. Si tratta in entrambi i casi di ioni metallici legati a strutture chimiche organiche che prendono il nome di chelanti che hanno l'obiettivo di ridurre la tossicità intrinseca. Tali mezzi di contrasto vengono iniettati per via endovenosa e determinano un mutamento del campo magnetico locale a livello dei tessuti normali e patologici nei quali si distribuiscono.

La modificazione del campo magnetico comporta una modificazione dell'intensità del segnale che può essere positiva o negativa nel senso di un aumento o di una diminuzione dell'intensità del segnale. L'effetto del MdC si esplica direttamente sui tempi di rilassamento T1 e T2 per cui, a seconda del tipo di MdC, in relazione alla concentrazione ed alla sequenza impiegata, si potranno avere effetti prevalentemente T1 dipendenti o prevalentemente T2 dipendenti. I mezzi di contrasto Superparamagnetici sono in genere formati da particelle di ossido di ferro con dimensioni molto variabili da un minimo di 30 fino ad un massimo di 300 nm. Tali prodotti vengono indicati con delle sigle particolari, SPIO — Superparamagnetic Iron Oxide — e USPIO — Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide —. Tali

composti vengono captati elettivamente dal sistema reticolo endoteliale presente nel fegato, nella milza e nei linfonodi. Questa proprietà dei MdC superparamagnetici vengono utilizzate nello studio di questi organi in quanto, una volta captati dalle cellule, inducono, quando studiati con sequenze T2 pesate, una marcata riduzione dell'intensità del segnale. Di norma tale riduzione si ha nei tessuti sani in quanto i tessuti patologici (cellule tumorali) non possedendo il sistema reticolo endoteliale, mantengono inalterate il loro segnale. Per questo meccanismo di azione i MdC superparamagnetici vengono definiti negativi, al contrario dei precedenti che sono definiti positivi. La maggior parte delle applicazioni con questi MdC inizialmente abbandonati ma ora ritornati in auge si avrà proprio nello studio del sistema linfonodale, studi che se sviluppati nel modo corretto porteranno questi mdc ad essere un valida alternativa nello studio delle metastasi linfonodali tanto da poter sostituire in un futuro lo studio di tali strutture mediante linfoscintigrafia tanto da poter immaginare di avere in alcune forme tumorali uno studio del linfonodo sentinella già nella fase stadiativa prechirurgica.

## **5.8 Traccianti con tropismo per il linfonodo sentinella**

L'intrappolamento a livello dei linfonodi, che di solito è dovuto a processi di fagocitosi aspecifica legata alle dimensioni delle particelle, può essere molto più efficace se vengono sfruttati i recettori biologici: ad esempio, associando al tracciante un ligando attivo che lega in maniera specifica le cellule linfatiche come il mannosio, che lega le cellule del reticolo endoteliale, o anticorpi monoclonali mirati ai macrofagi, ai linfociti T o ad altri fagociti presenti nei linfatici.

L'utilizzo di questi ligandi è particolarmente adatto per agenti di piccole dimensioni (agenti solubili di basso peso molecolare, nanoparticelle <20nm), per i quali occorre ricercare un equilibrio tra rapida migrazione dal sito di iniezione e tempo adeguato di permanenza all'interno del linfonodo. Un tracciante che migri rapidamente dal sito di iniezione e permanga a lungo nei linfonodi è l'ideale per l'imaging nucleare, in quanto il segnale del sito di iniezione si ridurrebbe grandemente e il LS rimarrebbe ben visibile, senza interferenze di segnale. Queste proprietà si possono trovare nei radiotraccianti a base di mannosio (Lymphoseek)<sup>130</sup>. Questo tipo di tracciante presenta un'emivita di clearance di circa due ore; questo permette di reperire il LS in una percentuale elevata di casi, in quanto l'attività si concentra in esso diminuendo rapidamente nel sito di

iniezione<sup>131</sup>.

Si è tentato anche di incrementare il tropismo specifico del tracciante per i linfonodi mediante la coniugazione di anticorpi monoclonali ad un tracciante; è il caso di nanoparticelle di oro di 18 nm coniugate con un anticorpo mirato contro l'antigene comune dei leucociti CD45<sup>132</sup>.

Questo tipo di tracciante ha dimostrato di accumularsi efficacemente nei linfonodi ascellari e poplitei di topi quando iniettato negli arti anteriori o posteriori<sup>133</sup>.

Sono stati allo stesso modo impiegati traccianti legati ad anticorpi rivolti verso l'antigene CD4, che si legano ai macrofagi del sistema linfatico risultando in più alte concentrazioni nei linfonodi<sup>134</sup>.

## 5.9 Traccianti PET

Tra i vari traccianti PET studiati per la ricerca del LS, spiccano quelli marcati con Zirconio-89 (<sup>89</sup>Zr) e Gallio-68 (<sup>68</sup>Ga).

L'albumina nanocolloidale marcata con <sup>89</sup>Zr ha dimostrato un'ottima stabilità ed una purezza radiochimica superiore al 95%, ed ha mostrato lo stesso pattern di drenaggio dell'analogo nanocolloide tecneziato. Questo tracciante si è rivelato particolarmente utile nelle neoplasie con LS molto prossimo al tumore primitivo (come ad esempio i tumori del capo-collo)<sup>135,136</sup>.

Ottimi risultati sono stati ottenuti anche con albumina umana mannosilata marcata con <sup>68</sup>Ga; in modelli animali ha mostrato un alto segnale rispetto al fondo oltre ad un rapido wash-out dal sito di iniezione ed un alto tropismo per i linfonodi<sup>137</sup>.

## 6. IL TECNEZIO

Manganese, tecnezio e renio sono gli elementi che appartengono al gruppo VIIB della tavola periodica. Essi presentano differenze estremamente marcate sia in termini di storia che di abbondanza e disponibilità. La similitudine esistente tra i tre elementi è limitata alla formazione di un certo numero di complessi semplici e ad identica stechiometria come gli ioni permetallati ( $\text{MnO}_4^-$ ,  $\text{TcO}_4^-$ ,  $\text{ReO}_4^-$ ) e gli ossidi ( $\text{MnO}_2$ ,  $\text{TcO}_2$ ,  $\text{ReO}_2$ ). La chimica del tecnezio si avvicina maggiormente a quella del renio, rispettando la tendenza degli elementi della seconda e terza serie di transizione ad avere un comportamento chimico più simile tra loro che a quelli della prima serie. Gli elettroni dei gusci 4d del tecnezio e 5d del renio sono molto più distanti dal nucleo di quelli 3d del manganese quindi per gli elementi della prima serie di transizione è più comune l'esistenza di complessi ad alto spin, mentre per quelli della seconda e terza serie si manifesta una tendenza maggiore all'accoppiamento spin-spin [48]. Gli orbitali 4d e 5s del tecnezio sono praticamente isoenergetici invece nel renio gli elettroni 6s hanno una energia superiore agli elettroni 5d. Questo comporta una certa differenza tra le proprietà chimiche dei due elementi ed in particolare i composti del renio sono ossidabili più facilmente. La tabella 6.1 riporta i potenziali di riduzione degli elementi del gruppo VIIB[49].

**TABELLA 6.1.** *Potenziali normali di riduzione in soluzione acquosa acida non complessante*

Reazione	Mn E°(V)	Tc E° (V)	Re E°(V)
$\text{MO}_4^-/\text{MO}_2$	+ 1.695	+ 0.738	+ 0.550
$\text{MO}_4^-/\text{M}$	+ 1.781	+ 0.477	+ 0.367
$\text{MO}_2/\text{MO}$	+ 0.115	+ 0.281	+ 0.260

### 6.1 Isotopi del Tecnezio

Il tecnezio è il primo elemento artificiale prodotto dall'uomo. Sebbene la nascita ufficiale risalga al 1947 esso venne scoperto nel 1937 da C. Perrier e E. Segré in un campione di molibdeno bombardato con deuteroni nel ciclotrone di Barkley in California. Il nome tecnezio (dal greco τεχνητοζ, artificiale) è evidentemente appropriato anche se tracce dell'isotopo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , originate dalla fissione spontanea

dell'uranio, sono presenti in natura. Attualmente si conoscono trenta isotopi con un numero di massa compreso tra 90 e 110, artificiali, radioattivi e con tempi di dimezzamento compresi tra 0.8 secondi di  $^{110}\text{Tc}$  e  $4.2 \times 10^6$  anni del  $^{98}\text{Tc}$ .

Di questi sono commercialmente disponibili i due isomeri:

- $^{99\text{m}}\text{Tc}$  utilizzato in piccolissime quantità in Medicina Nucleare
- $^{99}\text{Tc}$  utilizzato negli studi sulle proprietà chimiche dell'elemento.

### 6.1.1 Isotopo $^{99}\text{Tc}$

Dopo il  $^{98}\text{Tc}$ , il  $^{99}\text{Tc}$  è il più stabile tra gli isotopi del tecnezio. Presenta un tempo di dimezzamento di  $2.1 \times 10^5$  anni e decade per emissione  $\beta^-$  a  $^{99}\text{Ru}$  stabile:



Viene prodotto principalmente per fissione neutronica del  $^{235}\text{U}$  con rese di circa il 6%. Dalla miscela dei prodotti di fissione si riescono a separare quantità apprezzabili di  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , ad esempio reattori nucleari da 100 MW ne producono giornalmente circa 2.5 g.

Le radiazioni  $\beta^-$  emesse sono relativamente a bassa energia ( $E_\beta = 290$  KeV) e interagiscono con la materia producendo ionizzazione e radiazione X di frenamento (Bremsstrahlung). Se sono utilizzate quantità inferiori ai 10 mg le radiazioni  $\beta^-$  sono assorbite dallo spessore delle pareti della vetreria da laboratorio, rendendo scarsamente pericoloso l'utilizzo del  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Tuttavia, per evitare qualsiasi rischio di contaminazione, tutte le manipolazioni si eseguono sotto cappa e in zone controllate.

Commercialmente il  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  è disponibile in soluzioni acquose di  $\text{NH}_4^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  (concentrazione  $\sim 60$  mg /ml) o come solido di  $^{99\text{m}}\text{TcO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ , facilmente trasformabile in  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  per dissoluzione in  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 6.1.2 Isomero $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Il  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  è generato per decadimento radioattivo del  $^{99}\text{Mo}$ . L'insieme di decadimenti che si ottengono dalla coppia  $^{99}\text{Mo} - ^{99\text{m}}\text{Tc}$  sono riassunti nella figura 6.1.

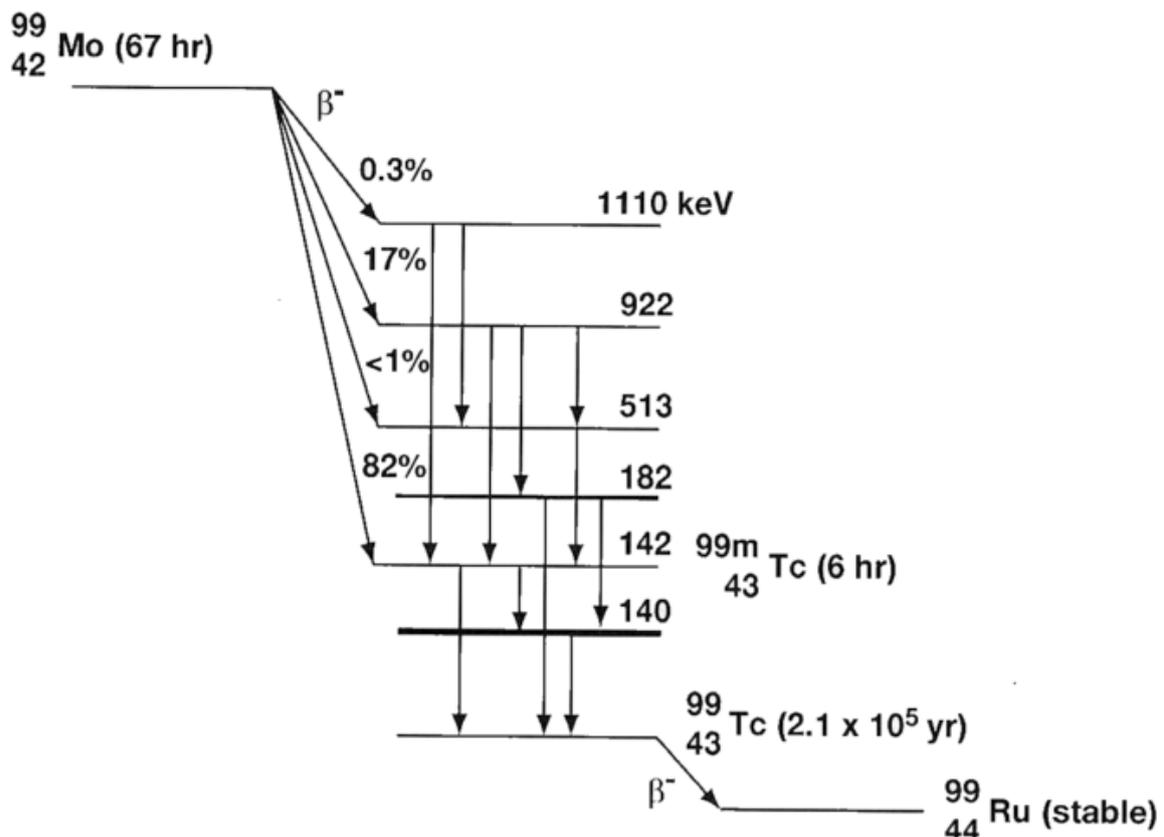


Figura 6.1. Schema di decadimento della coppia  $^{99}\text{Mo}$  -  $^{99\text{m}}\text{Tc}$

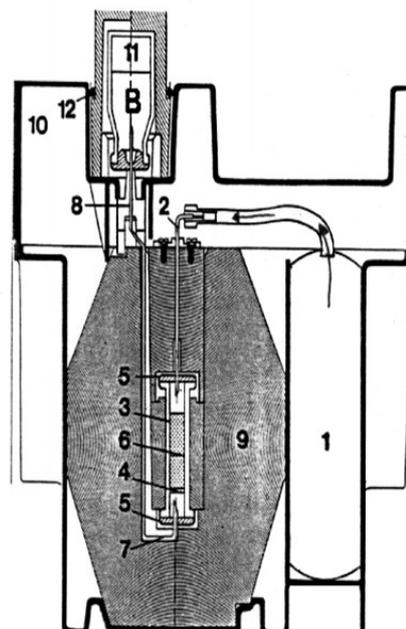
Esistono tre diversi metodi di separazione del  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  dal radionuclide padre: cromatografia su colonna, estrazione con solvente, sublimazione[50]. Tra questi solo il primo offre la possibilità di concepire una semplice apparecchiatura che porta ad un prodotto finale di elevata purezza, sterile, apirogeno, adatto per l'uso immediato nella preparazione dei radiofarmaci. Attualmente i generatori di questo tipo (Figura 6.2), nonostante i continui cambiamenti estetici e strutturali, continuano ad ispirarsi al modello messo a punto nel Brookhaven National Laboratory oltre trenta anni fa. Il dimensionamento della colonna cromatografica, costituita da una fase fissa di allumina, dipende dall'attività specifica della soluzione di  $^{99}\text{Mo}$  a sua volta legata al metodo di preparazione dello stesso.

Il  $^{99}\text{Mo}$  si ottiene infatti da:

- reazione nucleare di  $^{98}\text{Mo}$  ( $n, \gamma$ ): attività specifica  $\sim 180$  GBq/g
- prodotti di fissione di  $^{235}\text{U}$ : attività specifica  $\geq 185$  GBq/g.

In quest'ultimo caso la colonna ha dimensioni di circa 5 cm di altezza per 1 cm di diametro. Le ridotte dimensioni della colonna e l'impiego di piccole quantità di piombo assicurano un'adeguata protezione dalle radiazioni  $\gamma$  prodotte.

1. contenitore in PVC dell'eluente NaCl 0.9%
  2. ago in acciaio collegato alla testa della colonna
  3. colonna cromatografica in vetro
  4. setto di vetro sinterizzato
  5. tappi metallici
  6. fase fissa di allumina
  7. ago in uscita dalla colonna
  8. ago di uscita dell'eluito
  9. schermatura di piombo
  10. contenitore stagno di nylon molato
  11. flacone di raccolta dell'eluito (vial di reazione)
  12. sede della vial
- B. soluzione eluita di  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ .



**Figura 6.2.** Schema del generatore cromatografico a colonna di allumina "Elumatic III Sorin Biomedica"

Il radioisotopo  $^{99}\text{Mo}$  viene fissato alla colonna di allumina mediante una soluzione di acido nitrico a pH 4-5. In queste condizioni lo ione molibdato  $\text{MoO}_4^{2-}$  polimerizza in  $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ , che per l'elevata carica si lega saldamente all'allumina[51]. Il passaggio successivo di una soluzione alcalina permette la completa eluizione del  $^{99}\text{Mo}$  in forma di  $\text{MoO}_4^{2-}$  monomero.

Il decadimento:



genera ioni pertecnetato con carica -1, che rimangono legati alla colonna più debolmente e vengono eluiti con una soluzione di sali inorganici. Nella pratica clinica sono utilizzate soluzioni sterili e apirogene di NaCl 0.9%.

## 6.2 Chimica del Tecnezio

Il pertecnetato di sodio  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$ , eluito dal generatore in soluzione acquosa, rappresenta la specie chimica di partenza di tutti i radiofarmaci del tecnezio- $^{99m}\text{Tc}$ . Il pertecnetato, in cui il tecnezio possiede stato di ossidazione +7, non reagisce direttamente con leganti che possiedono atomi donatori o sistemi chelanti

adatti per formare complessi di coordinazione del Tecnezio, ma deve essere ridotto ad uno stato di ossidazione più basso. La riduzione del pertecnetato può essere effettuata utilizzando diversi agenti, i più comuni tra i quali sono il cloruro di stagno, l'acido cloridrico, l'acido ascorbico, l'idrazina e le fosfine terziarie. Per preparare il radiofarmaco è quindi necessario rimuovere, in parte o completamente, gli atomi di ossigeno legati al metallo e sostituirli con gli atomi coordinati dei nuovi leganti. Il Tecnezio può presentarsi in uno stato di ossidazione inferiore (fino a +1) in dipendenza dalla capacità di donare elettroni dei leganti coordinanti o chelanti, utilizzati per la formazione dei complessi finali. La variazione dello stato di ossidazione, insieme alla geometria strutturale, che può presentarsi con numeri di coordinazione che vanno da 4 a 7, offre la possibilità di disporre di una chimica molto ricca del Tecnezio, al fine di sintetizzare complessi di diverso tipo.

In generale i complessi del Tecnezio sono preparati utilizzando una reazione ad uno oppure a due step. Nelle preparazioni ad uno step, il  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , appena eluito dal generatore, viene aggiunto ad una vial sterile contenente i leganti e gli agenti riducenti. La vial viene poi lasciata a temperatura ambiente o viene posta ad alta temperatura per un tempo appropriato. Nelle reazioni a due step il  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  viene prima ridotto in presenza di un legante labile, utilizzato semplicemente per stabilizzare il metallo in uno stato di ossidazione appropriato. Successivamente il complesso intermedio viene aggiunto alla vial contenente il legante o i leganti finali per formare il composto desiderato più stabile termodinamicamente, secondo una reazione di transchelazione o di scambio.

## 6.3 Metodi di marcatura del Tecnezio

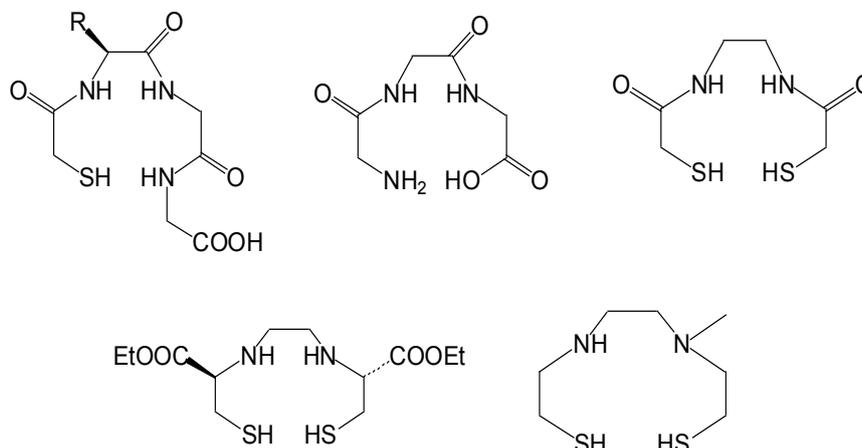
Alcune categorie importanti di radiofarmaci del tecnezio sono caratterizzate dalla presenza di gruppi funzionali inorganici specifici indicati con il nome di "core" metallico.

### 6.3.1 Core $[\text{Tc}=\text{O}]^{3+}$

Il core  $[\text{Tc}=\text{O}]^{3+}$  è il core più utilizzato nella chimica dei radiofarmaci del tecnezio. In esso il tecnezio presenta il numero di ossidazione +5. Nella formazione di questo core il  $[\text{TcO}_4]^-$  viene ridotto tramite due elettroni provenienti dallo  $\text{Sn}^{2+}$

(SnCl<sub>2</sub>) o da altri agenti riducenti. Il core viene quindi stabilizzato con leganti tetradentati contenenti solo N come atomo donatore oppure leganti misti contenenti N-S o N-O.

Alcuni di questi leganti sono mostrati nella figura 6.3.



**Figura 6.3.** Leganti tetradentati più comunemente usati per stabilizzare il core  $[Tc=O]^{3+}$

Tra i leganti attualmente in uso, esempi importanti sono rappresentati dal TRODAT<sup>139</sup>, un'agente capace di attraversare la barriera emato-encefalica e legarsi ai recettori della dopamina, ed il Technescan<sup>®</sup> (MAG3), che trova applicazione come agente nella scintigrafia renale<sup>140</sup>.

Nonostante il metodo di marcatura di alcuni leganti tetradentati con il core  $[Tc=O]^{3+}$  sia abbastanza recente, esso ha dimostrato di essere stabile e di potere essere applicato ad una grande varietà di molecole da impiegare nell'imaging molecolare. Inoltre non bisogna trascurare il fatto che la maggior parte dei complessi sono stati ampiamente caratterizzati tramite l'uso dei metodi cromatografici ed è stata così riconosciuta l'autenticità di molti composti.

### 6.3.2 Core $[Tc\equiv N]^{2+}$

In questa molecola il tecnezio si trova nello stato di ossidazione +5. Nonostante questo blocco molecolare sia noto da parecchio tempo, la sua applicazione nel campo dei radiofarmaci è abbastanza recente.

Al contrario del core  $[Tc=O]^{3+}$ , la carica ridotta e la forte donazione  $\pi$  indotta dal centro nitruro rendono il core molto più basico<sup>141</sup>.

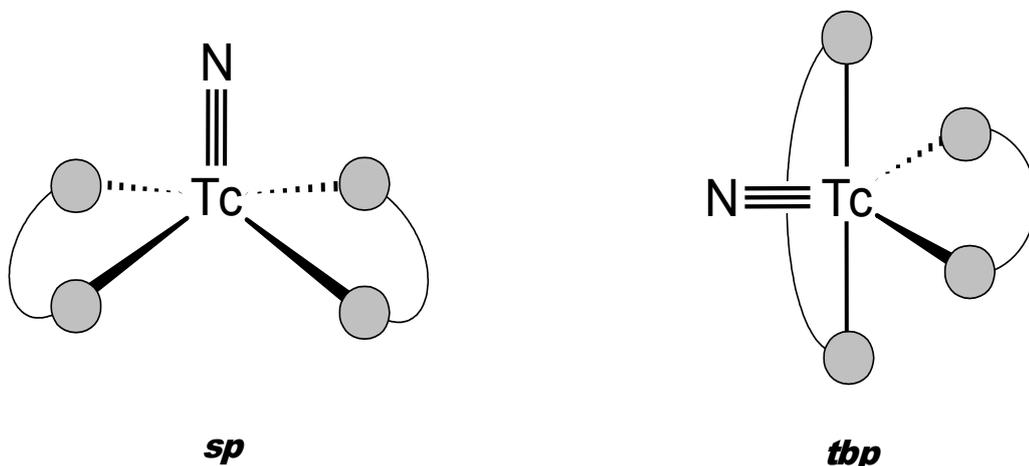
Sia il core  $[Tc=O]^{3+}$  che il core  $[Tc\equiv N]^{2+}$  non esistono liberi o in forma idratata e

sono sempre stabilizzati da qualche legante aggiuntivo.

Questi leganti devono però essere a loro volta rimossi dal sistema chelante del legante finale che contiene anche il gruppo biologicamente attivo tramite una reazione di trans-metallazione.

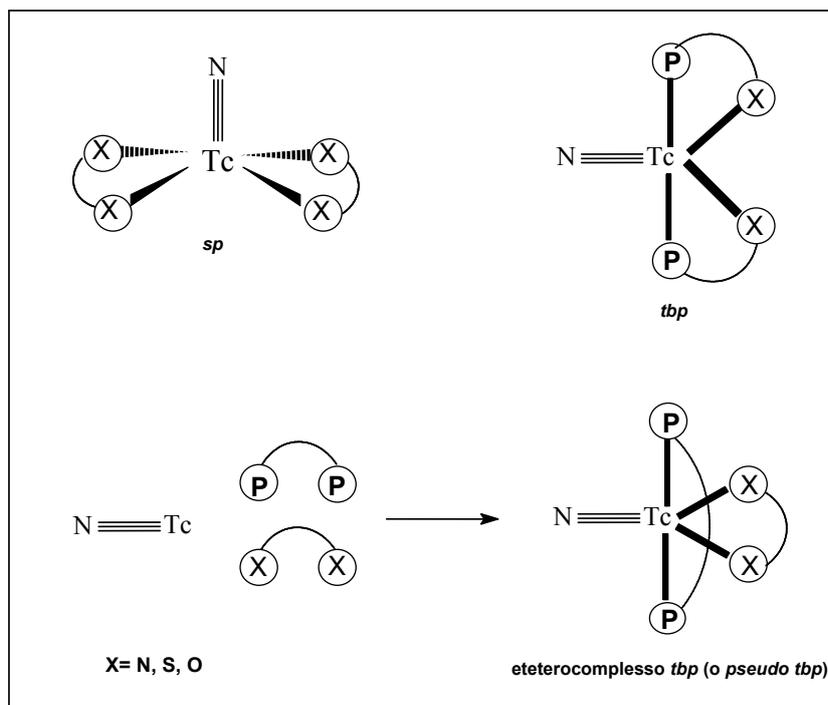
I complessi contenenti il gruppo  $Tc\equiv N$  possiedono generalmente una geometria pentacoordinata indotta dalle caratteristiche steriche ed elettroniche del legame  $Tc\equiv N$  stesso. In tale geometria l'azoto del legame multiplo occupa uno dei siti di coordinazione, mentre le altre quattro posizioni sono disponibili per la coordinazione con altri leganti. La geometria pentacoordinata può manifestarsi secondo due possibili riarrangiamenti (Figura 6.4):

- a) **piramide a base quadrata** (*sp*);
- b) **bipiramide trigonale** (*tbp*).



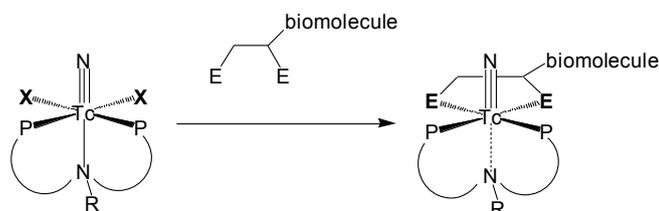
**Figura 6.4:** Possibili strutture dei complessi pentacoordinati di  $Tc\equiv N$

La preferenza di una configurazione rispetto all'altra è determinata esclusivamente dal tipo di atomi coordinanti dei due leganti bidentati. In generale si è visto che due atomi donatori neutri e due atomi donatori carichi negativamente si coordinano al gruppo  $Tc\equiv N$  secondo una geometria *tbp*, mentre una serie formata da quattro atomi identici preferisce l'arrangiamento *sp*.



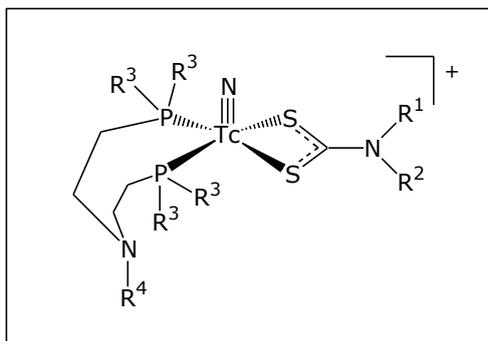
**Figura 6.5.** *Differenti geometrie dei complessi  $Tc\equiv N$*

Di particolare rilievo nella preparazione di nuovi radiofarmaci di nitruro-tecnezio si è rivelato il cosiddetto “asymmetrical  $[Tc\equiv N]^{2+}$  approach”, recentemente sviluppato nel laboratorio di Medicina Nucleare dell’Università di Ferrara da Duatti et al., il cui meccanismo è mostrato nella figura sotto.



La preparazione di questa nuova classe di radiofarmaci di nitruro- $^{99m}Tc$  del tipo  $[^{99m}Tc(N)(L)(PNP)]^+$ , dove L rappresenta la forma monoanionica di un legante ditiocarbammato e PNP un legante difosfinico (vedi Figura 6.6), è stata effettuata utilizzando una procedura in formulazione liquida costituita da 2 step di reazione<sup>142</sup>. Nel primo step viene prodotto il core  $[^{99m}TcN]^{2+}$ , facendo reagire il prodotto di partenza  $^{99m}TcO_4^-$ , con SDH, come donatore di atomi di azoto ( $N^{3-}$ ), in presenza di  $Sn^{2+}$  (da  $SnCl_2$ ) come agente riducente. La preparazione dei complessi  $[^{99m}Tc(N)(L)(PNP)]^+$  è stata poi completata aggiungendo alla stessa via di reazione simultaneamente i 2 leganti PNP e NaL. Si osserva che la formazione degli eterocomplessi asimmetrici  $[^{99m}Tc(N)(L)(PNP)]^+$  avviene senza la concomitante

formazione dei complessi simmetrici neutri [ $^{99m}\text{TcN}(\text{L})_2$ ] contenenti due leganti identici bidentati.



**Figura 6.6.** *Struttura chimica dei complessi [ $^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{L})$ ] $^+$*   
*(PNP = legante difosfinico; L = legante ditiocarbammato monoanionico;*  
 *$R^{1-4}$  = gruppi organici laterali).*

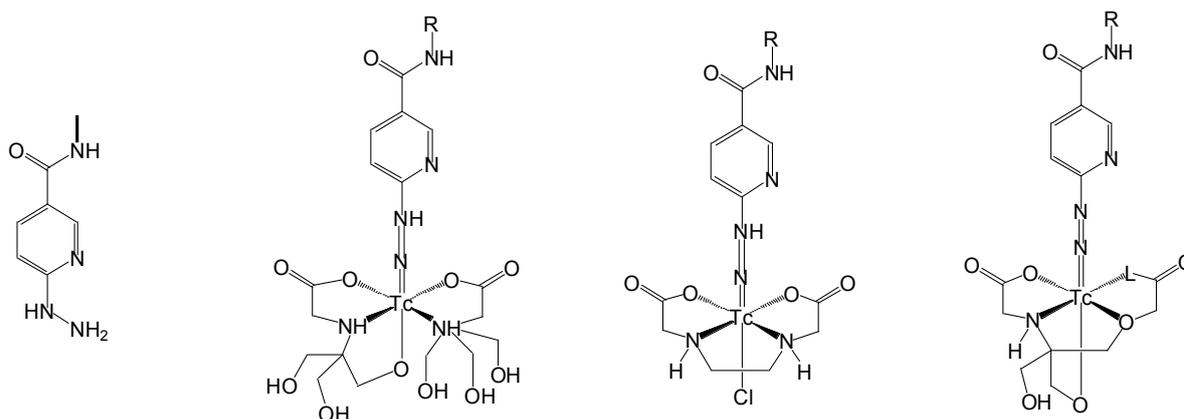
I complessi [ $^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{L})(\text{PNP})$ ] $^+$  sono stati caratterizzati mediante metodi cromatografici. La loro struttura chimica è stata determinata attraverso il confronto con i complessi corrispondenti ottenuti utilizzando l'isotopo a lunga vita  $^{99m}\text{Tc}$ .

La sintesi di complessi asimmetrici contenenti il "core" [ $^{99m}\text{TcN}$ ] e due differenti leganti bidentati del tipo PNPx e ditiocarbammati coordinati al centro metallico, ha dato vita ad una classe di radiofarmaci a tropismo cardiaco in possesso di promettenti proprietà biodistributive come, ad esempio, il [ $\text{TcN}(\text{NOEt})_2$ ], un'eccellente agente per l'imaging del miocardio.

### 6.3.3 Gruppo HYNIC

Questo gruppo (il cui nome, hynic, è l'abbreviazione dell'acido idrazino-nicotinico) è quello più utilizzato nella marcatura dei peptidi e delle proteine<sup>143</sup>. È stato sviluppato solo recentemente e rappresenta con buona probabilità il metodo migliore nell'imaging dell'espressione genica. La tecnica richiede alcune precauzioni dovute alla sensibilità dei composti utilizzati e al metodo sintetico.

I composti ottenibili con il metodo Hynic ed alcuni ligandi addizionali sono raffigurati nella Figura 6.7.

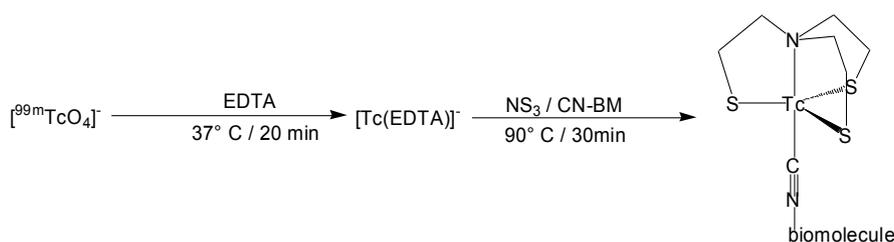


**Figura 6.7.** Strutture tipiche dei complessi  $^{99m}\text{Tc}$ -hynic con differenti leganti

### 6.3.4 Gruppo Tc (III) a forma di “ombrello rovesciato”

La chimica del tecnezio con numero di ossidazione +3 è abbastanza nota ma poco utilizzata nella marcatura di biomolecole.

Il tecnezio in questo stato di ossidazione deve essere stabilizzato e per fare ciò viene utilizzato un legante tetradentato a forma di ombrello “Umbrella” tipo l'NS<sub>3</sub>.



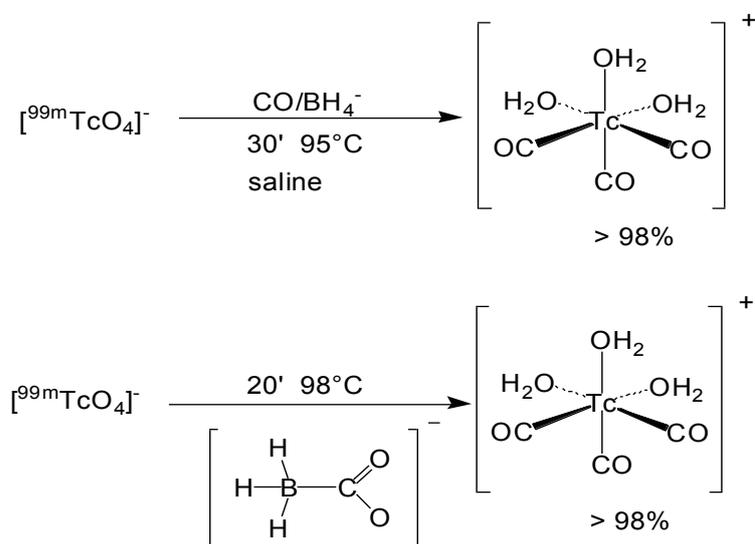
**Figura 6.8.** Schema sintetico della preparazione dei complessi di Tc(III) tipo “Umbrella”

Il radiofarmaco risultante è abbastanza lipofilo e perciò si è rivelato molto utile nell'applicazione con gli acidi grassi<sup>144</sup>. Gli acidi grassi infatti sono importanti nell'imaging del miocardio che si basa proprio sull'uso del metabolismo degli acidi grassi. Tra i leganti monodentati utili si ricordano gli isocianuri, ma sono anche stati studiati e introdotti altri leganti come le fosfine e i tioeteri. Anche se gli isocianuri tendono ad essere volatili e sono sensibili all'aria, possono essere ben stabilizzati attraverso la coordinazione con un centro metallico come il Cu(I). Questo metodo è usato da lungo tempo nel kit del CARDIOLITE<sup>®</sup>, attualmente utilizzato come agente per l'imaging della perfusione cardiaca.

### 6.4.5 Core $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$

Questo core organometallico contiene tre molecole leganti di CO, paragonabili all'O per il core  $[\text{Tc}=\text{O}]^{3+}$  e all'N per il core  $[\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$  mentre ai siti di coordinazione restanti sono legate tre molecole d'acqua che possono essere sostituite da altre biomolecole chelanti o da semplici leganti utili nella preparazione dei radiofarmaci essenziali del tecnezio.

Il precursore di questo core  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  può essere preparato tramite un Kit fatto in laboratorio o disponibile in commercio. Il metodo sintetico è di facile esecuzione e perciò molte biomolecole sono state marcate con questo core tra le quali, si ricordano, i peptidi, gli anticorpi, i leganti per i recettori del glucosio nel SNC ed altre piccole molecole.



**Figura 6.9.** Schema sintetico per la preparazione del core  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$

Il principale vantaggio del core  $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  è proprio rappresentato dalla grande quantità di leganti che si possono legare con facilità al Tc con numero di ossidazione +1. I complessi ottenibili sono stabili e non si decompongono né in siero né in vivo. Nonostante siano possibili molte combinazioni con leganti mono-, bi- e tri-dentati, quelli tridentati sembrano i più versatili e quindi i più utilizzati.

In conclusione si può riassumere che il core  $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  rappresenta un gruppo funzionale molto versatile ed applicabile ad una grande varietà di biomolecole. Inoltre nello studio di nuovi radiofarmaci esso possiede una elevata utilità ed importanza non solo per quanto riguarda la chimica del  ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ , ma anche quella di altri metalli di transizione.

## 7. PRODUZIONE DI NUOVI TRACCIANTI

### 7.1 Iter Pre-Clinico per la produzione di un radiofarmaco

La produzione e la progettazione di un radiofarmaco o Tracciante sono parte di un processo che coinvolge contributi di differenti discipline scientifiche fondamentali, come la fisica nucleare, la chimica, la farmacologia, la biologia molecolare, le biotecnologie ed ovviamente la Medicina. Secondo un approccio del tutto teorico, lo sviluppo di un radiofarmaco avviene attraverso le seguenti fasi:

1. Identificazione del Bersaglio Biologico.
2. Progettazione della specie molecolare più adatta a interagire selettivamente con il bersaglio.
3. Scelta del Radionuclide.
4. Scelta del precursore freddo e sviluppo di un'efficiente sintesi chimica, per introdurre il radionuclide all'interno della molecola senza modificarne la capacità di interagire selettivamente con il bersaglio biologico.

Tuttavia l'identificazione e lo sviluppo di un nuovo radiofarmaco costituiscono sempre un processo assai complesso, tipicamente induttivo, che si svolge attraverso una successione di ipotesi e tentativi e che, proprio per questo, richiede una costante verifica sperimentale dei dati raggiunti<sup>145</sup>.

Nell'ambito preclinico, grazie allo sviluppo ad hoc delle biotecnologie, si possono attualmente utilizzare tecniche di imaging finora esclusive dell'ambito clinico. Questo ha comportato una notevole svolta per quanto riguarda tutto l'iter di produzione di un Radiofarmaco, permettendo quindi un miglior controllo sulla fase preclinica, una miglior capacità di caratterizzazione di fenomeni complessi e una non trascurabile interscambiabilità di applicazione di tali metodiche tra le fasi clinica e preclinica.

Ciascuna metodica è caratterizzata da precise finalità applicative, limiti e vantaggi. Il loro uso combinato consente di rappresentare attraverso immagini, di misurare in modo quantitativo e di monitorare nel tempo i danni strutturali, le alterazioni funzionali e i meccanismi molecolari che regolano le funzioni biologiche in condizioni fisiologiche o patologiche.

TC e RM: forniscono immagini di specifiche alterazioni strutturali e funzionali.

PET e SPECT: consentono di esaminare in vivo i meccanismi alterati di patologia ed eventualmente trasferire alla clinica le ipotesi testate e misurate in specifici modelli animali. Consentono inoltre di determinare la cinetica di distribuzione di farmaci o tools terapeutici innovativi nei vari distretti corporei.

Le proprietà chimiche del radionuclide rivestono una fondamentale importanza per la preparazione di un radiofarmaco efficace, poiché determinano la struttura molecolare finale responsabile del comportamento biologico della sonda. I radiotraccianti sono delle vere e proprie sonde in quanto composte da una Struttura Chimica, deputata al raggiungimento e alla interazione col bersaglio, e da un Radionuclide deputato alla rilevabilità del segnale. Essenziale per la rilevabilità del processo è che l'interazione con il bersaglio biologico determini un rallentamento della cinetica di eliminazione del radiofarmaco. In questo modo, in presenza del bersaglio e a un tempo definito successivo all'iniezione di radiofarmaco, i livelli di radioattività misurati saranno correlati all'attività o alla densità del bersaglio. Questo rallentamento può avvenire per effetto di fenomeni di legame reversibile, a seguito di variazioni della struttura determinate per lo più da processi enzimatici, o infine, per internalizzazione derivata da processi di endocitosi. In parallelo, in assenza di bersaglio biologico, l'eliminazione del farmaco deve essere rapida per garantire rapporti segnale-rumore tali da consentire un'elevata accuratezza della misura rispetto alle variazioni del bersaglio in esame. Come già accennato PET e SPECT hanno notevolmente migliorato negli ultimi anni la fase preclinica, fornendo i metodi e le informazioni opportune per svolgere al meglio la fase di Validazione preclinica di un radiofarmaco. Questa fase, una delle più importanti per lo sviluppo farmaceutico di un nuovo radiocomposto, consiste in una verifica preliminare del comportamento biologico del radiofarmaco, condotta sia su cellule isolate sia in organismi modello diversi dall'uomo (modelli animali), al fine di raccogliere le informazioni indispensabili per decidere se avviare la valutazione clinica nell'uomo.

Nello studio preclinico l'attenzione è principalmente focalizzata sulla raccolta di precise informazioni riguardo, Tossicità, Farmacocinetica e Farmacodinamica.

- Verificare che il nuovo radiocomposto non induca effetti negativi sull'organismo in base alla dose e alla massa somministrata (*Tossicità*)
- Verificare che la sua distribuzione e trasformazione spazio-temporale all'interno dell'organismo e del tessuto bersaglio siano compatibili con l'impiego clinico previsto (*Farmacocinetica*)

- Valutare la specificità di interazione con il bersaglio<sup>146</sup>.

Nella sperimentazione con Radiofarmaci uno dei modelli animali più utilizzati inizialmente è quello murino (topi e ratti), ma successivamente possono essere impiegati anche modelli canini o costituiti da primati non umani. Su questi substrati è possibile valutare la farmacocinetica, mentre per la farmacodinamica vengono utilizzate colture cellulari o tessuti isolati. Gli studi farmacocinetici e farmacodinamici vengono sempre svolti in parallelo. Per valutare la specificità di interazione, si effettuano studi di inibizione o competizione con dosi farmacologiche dell'analogo non marcato del radiofarmaco in studio o valutazioni su modelli sperimentali esprimenti o non esprimenti il bersaglio. Anche in questo caso l'ausilio di PET/SPECT accelera notevolmente il processo di sviluppo, riducendo il numero di animali e le sedute sperimentali necessarie per la valutazione della nuova sostanza.

Per determinare la tossicità dei radiofarmaci è molto importante valutare l'esposizione dei soggetti, anche mediante studi di biodistribuzione nell'animale da esperimento.

I radiotraccianti ad uso diagnostico devono rispondere dei requisiti previsti dalla teoria dei traccianti, ossia avere le capacità di tracciare un processo biologico di interesse senza perturbare il sistema in cui vengono introdotti. Trattandosi di sostanze radioattive iniettate in dosi estremamente ridotte gli studi di tossicità devono essere effettuati sull'analogo freddo del radiofarmaco in esame preparato e formulato (inclusi eccipienti o eventuali contaminanti) come previsto nei protocolli clinici per l'uomo.

Esistono due tipi di tossicità da valutare:

- Acuta (per dose singola): descrive il danno biologico dopo una singola esposizione dell'organismo di prova a una sostanza, oppure poche esposizioni ravvicinate nel tempo (entro 24 ore). Il danno deve comparire entro 14 giorni dall'esposizione.
- Cronica (per dose ripetuta): si riferisce al danno biologico che insorge dopo una serie di esposizioni intercorse nell'arco di tempo che va dalle 2 settimane ai 6 mesi.

Nel caso dei radiofarmaci è evidente che la tossicità acuta rappresenta il parametro più rilevante, dal momento che la somministrazione di un radiocomposto a un singolo paziente può rendersi necessaria solo poche volte durante il corso della vita<sup>147,148,149</sup>.

## 7.2 Sperimentazioni cliniche con radiofarmaci

Caratteristica peculiare delle sperimentazioni con radiofarmaci è l'estrema eterogeneità strutturale delle molecole utilizzate, ognuna delle quali caratterizzata da problematiche diverse di ordine cinetico, tossicologico, chimico e radiochimico. Per poter visualizzare e misurare a fini diagnostici un processo biologico, i radiofarmaci devono rispettare la "teoria dei traccianti", essere cioè somministrati in quantità ponderali tali da non produrre alcun effetto biologico e consentire di seguire il processo senza alterare il sistema.

Dagli anni '90 la normativa italiana (DLgs 178/1991) classifica i radiofarmaci come medicinali specificando che "è da intendersi come medicinale ogni sostanza o composizione presentata come avente proprietà curative o profilattiche delle malattie umane o animali, nonché ogni sostanza o composizione da somministrare all'uomo o all'animale allo scopo di stabilire una diagnosi medica o di ripristinare, correggere o modificare funzioni organiche dell'uomo o dell'animale"[43]. Tuttavia rispetto ai medicinali tradizionali e ai radiofarmaci con funzione terapeutica, i radiofarmaci per diagnostica sono soggetti a differenti requisiti di qualità, sicurezza ed efficacia.

Il DM 17 dicembre 2004[44] suddivide le sperimentazioni cliniche in due categorie, in base alla loro finalità e alla tipologia di investimento economico:

1. Sperimentazioni a fini industriali o commerciali: Profit.
2. Sperimentazioni a fini non commerciali: Non-Profit.

Le sperimentazioni della prima categoria sono promosse a fini di lucro e finanziate dall'industria che sviluppa il farmaco, mentre quelle della seconda hanno quasi sempre come obiettivo il miglioramento della pratica clinica, non hanno alcuna ricaduta economica, se non per quanto riguarda il rientro dei costi sostenuti per la loro conduzione, e devono essere finanziate da fondi di ricerca specificatamente dedicati.

In medicina nucleare esiste una ulteriore specifica distinzione per quanto riguarda i radiofarmaci di tipo diagnostico:

- a) Sperimentazioni che hanno come oggetto primario il comportamento di un radiofarmaco, cioè l'agente sperimentale o IMP (Investigational Medicinal Product);
- b) Sperimentazioni in cui il radiofarmaco è lo strumento di valutazione dell'efficacia di un trattamento con un altro IMP.

Nella prima categoria vengono inseriti, per semplicità, anche i trials clinici in cui il radiofarmaco è utilizzato non come prodotto diagnostico in sviluppo ma come mezzo per studiare la fisiopatologia d'organo.

Per descrivere le Fasi delle sperimentazioni cliniche prenderemo ora ad esempio lo sviluppo di un radiofarmaco per uso PET.

**Studi di Fase I:** Scopo di questi studi è ottenere dati di ordine farmacocinetico e informazioni preliminari di sicurezza sull'uomo, utilizzando dosi crescenti del radiofarmaco. Se l'agente ha un bersaglio selettivo metabolico o recettoriale, deve essere effettuato anche uno studio farmacodinamico, al fine di osservarne anche il comportamento nei riguardi del bersaglio. Possono essere effettuati su soggetti sani o malati purché siano volontari.

**Studi di Fase II:** Detti anche di Dose-Risposta. Mirano a determinare quantità e modalità di somministrazione di un radiofarmaco ai pazienti, informazioni poi utilizzate negli studi di fase III. Devono inoltre fornire informazioni preliminari di efficacia e sicurezza. Vengono inoltre sviluppati metodi e criteri attraverso i quali si valuteranno le immagini e/o i risultati dell'indagine. Possono essere inclusi soggetti affetti e soggetti non affetti dalla patologia in esame. Un aspetto importante che deve essere presente è la concordanza tra la modalità di lettura e l'esperienza di valutazione dei risultati ottenuti in Fase I e in questa Fase.

**Studi di Fase III:** Il disegno e gli end point di uno studio di Fase III con radiofarmaci di tipo diagnostico si basano in genere sui risultati ottenuti da un precedente studio di Fase II, dal quale vengono importati i criteri di interpretazione delle immagini. Sono studi eseguiti su larga scala, in una popolazione ben definita, con soggetti che solitamente si trovano nello stesso momento diagnostico nel quale il radiofarmaco verrà utilizzato nella pratica clinica.

Le immagini ottenute con radiofarmaci sono da considerare veri e proprio biomarker, parametri cioè misurabili e indicatori di un processo biologico normale o patologico o della risposta ad un determinato trattamento terapeutico<sup>150</sup>.

Il complesso aspetto normativo che regola le sperimentazioni cliniche ha investito pesantemente anche la sperimentazione con radiofarmaci. Il medico nucleare deve quindi includere nelle proprie competenze sia gli aspetti regolatori relativi all'osservanza della normativa vigente in termini di sperimentazione clinica e di norme di buona pratica clinica, aspetto che lo accumuna a ogni altro investigatore clinico, sia quelli relativi alle norme di Buona Preparazione dei Radiofarmaci in Medicina Nucleare (NBP-MN) per uso clinico e sperimentale.

Parallelamente alla necessità di migliorare lo standard di qualità della ricerca medica nasce l'esigenza di ribadire e consolidare le competenze già attribuite ai Comitati Etici (un tempo denominati Comitati Bioetici), assicurando sempre di più l'affidabilità e la sicurezza dei dati clinici raccolti. In uno scenario globale, ove gli investimenti in ricerca e sviluppo saranno fondamentali per la crescita di un Paese, è sicuramente fondamentale avere degli organismi di garanzia pubblica efficienti e di qualità, onde garantire tempi rapidi per le valutazioni nella piena tutela dei diritti dei pazienti: questi ultimi infatti sono l'essenza alla base dello spirito di servizio per i quali i Comitati etici sono nati e per i quali continueranno a operare anche in un futuro di terapie sempre più complesse e personalizzate<sup>151</sup>.

## 8. SCOPO DELLA TESI

Un Tracciante ideale, per essere utilizzato in una linfo-scintigrafia, dovrebbe possedere determinate caratteristiche, tra cui:

- migrare rapidamente dal sito di deposito ai canali linfatici e da qui diffondersi lungo tutta la catena linfonodale;
- possedere molecole sufficientemente grandi da non penetrare la membrana capillare dopo il passaggio interstiziale;
- essere distribuito solo nell'interstizio mantenendo il flusso linfatico;
- non essere soggetto a fenomeni di fagocitosi<sup>152</sup>.

Nonostante i buoni risultati, due sono gli ostacoli principali all'uso dei colloidi per una linfo-scintigrafia:

1. Meno del 35% della sostanza colloidale introdotta interstizialmente viene assorbita entro le 24 ore;
2. L'eliminazione dal punto di introduzione e l'accumulo nei linfonodi dipende dalla grandezza delle particelle e dallo stato funzionale del sistema reticolo-endoteliale e, quindi, queste particelle non rispecchiano in maniera ottimale il flusso linfatico[20].

Inoltre molti di questi agenti hanno recato delle reazioni avverse, specialmente infezioni virali, dovute all'uso di albumina colloidale di origine animale, probabilmente contaminata da virus[21]. Attualmente il <sup>99m</sup>Tc-Sc, il <sup>99m</sup>Tc-Dx, il <sup>99m</sup>Tc-HSA ed il Trisolfuro d'Antimonio-<sup>99m</sup>Tc e varie preparazioni a base di microcolloidi di albumina tecneziata, sono considerati i radiofarmaci di scelta per la linfo-scintigrafia in molti paesi.

Negli Stati Uniti invece, il solfuro colloidale-<sup>99m</sup>Tc è l'unico tracciante approvato per la linfo-scintigrafia in quanto i colloidi di albumina sono stati aboliti proprio per i possibili rischi biologici derivanti dal loro utilizzo.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è individuare nuove categorie di Traccianti Tecneziati che, essendo caratterizzate da una interazione molecolare specifica con il target, siano preferibili ai nanocolloidi tecneziati per l'identificazione del Linfonodo Sentinella.

Un tracciante in grado di migrare rapidamente e legarsi selettivamente alle cellule del linfonodo sentinella, infatti, potrebbe evidenziarlo esclusivamente e

selettivamente, che, a differenza dei nanocolloidi tecnezati attualmente utilizzati, permettano un'interazione molecolare specifica con il target.

In particolare, l'obiettivo è identificare un tracciante ideale da utilizzare per la linfoscintigrafia, così da evidenziare esclusivamente e selettivamente il linfonodo sentinella riducendo le emissioni radioattive provenienti da altre parti anatomiche.

La dimostrazione della sovra-espressione di recettori per il mannosio, avidi di zuccheri, sulla superficie delle cellule cancerose, è un concetto fondamentale da approfondire per poter progettare nuovi radiofarmaci utili all'identificazione del linfonodo sentinella.

Studi recenti hanno infatti dimostrato che macromolecole mannosilate marcate con Tecnezio-99m presentano ottime caratteristiche di uptake grazie ad un meccanismo di binding per i recettori del mannosio che si trovano sulla superficie dei macrofagi nei linfonodi<sup>153</sup>.

Pertanto, uno studio più approfondito è stato svolto sulle seguenti molecole:

- ▲  $^{99m}\text{Tc}$  – DTPA - mannosil-destrano[2]
- ▲  $^{99m}\text{Tc}$  – mannosil - neoglicalbumina
- ▲  $^{99m}\text{Tc}$  –  $\text{MAG}_3$  - mannosil-destrano<sup>154</sup>[3].

Tra tutte è stato ampiamente sviluppato il Lymphoseek<sup>TM</sup> ( $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-mannosil-destrano), a tutt'oggi immesso nel mercato, costituito da una catena di destrano ampiamente sostituita; esso mostra proprietà di migliore uptake nel linfonodo sentinella rispetto al  $^{99m}\text{Tc}$ -Sc<sup>155</sup>[4]. Infatti il destrano offre un conveniente scheletro macromolecolare al quale poter legare un grande numero di gruppi funzionali.

La strategia formulativa di questo nuovo radiofarmaco consiste quindi nell'“appendere” in varie posizioni allo scheletro del destrano un numero di gruppi DTPA utili alla chelazione del metallo (DTPA = Acido dietilaminopentaacetico) insieme a un numero di residui di mannosio che possono essere riconosciuti dai recettori presenti nella membrana dei macrofagi<sup>156</sup>.

Nonostante queste favorevoli caratteristiche, l'uso del DTPA presenta però alcuni limiti: esso non è un gruppo chelante ottimale per il  $^{99m}\text{Tc}$  e, di conseguenza, la stabilità del complesso macromolecolare coniugato risultante è scarsa; inoltre dev'essere ancora ben chiarita la vera struttura chimica del complesso finale col  $^{99m}\text{Tc}$ .

La stabilità e la debole reattività potrebbero essere fornite dall'uso di molecole chelanti che meglio si adattino alle proprietà elettroniche di un dato core  $^{99m}\text{Tc}$ .

A questo scopo, si è pensato di prendere in considerazione il core  $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$ .

La chimica di coordinazione di questo precursore metallico è bene nota e può essere facilmente manipolata tramite l'uso di un numero selezionato di atomi coordinanti già ampiamente studiati per il gruppo  $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$ .

Inoltre la conoscenza geometrica del core  $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$ , insieme alla sua alta stabilità, contribuiscono a creare un disegno preciso della struttura molecolare dei radiofarmaci risultanti, rendendo possibile una buona conoscenza delle loro proprietà biologiche.

L'attività da me svolta nel presente lavoro di tesi, si è basata su un particolare progetto di ricerca, denominato "Development of Tc-99m Radiopharmaceuticals for Sentinel Node Detection and Cancer Diagnosis", nato da un Coordinated Research Project (CRP) tra il laboratorio di ricerca di Imaging Molecolare della Sezione di Diagnostica per Immagini dell'Università di Ferrara e l'Agenzia Internazionale per l'Energia Atomica (IAEA, Vienna) (per la quale il laboratorio svolge da molti anni il ruolo di collaboratore scientifico) assieme alla collaborazione di altri gruppi di ricerca in Europa e nel Mondo.

Tale progetto si compone di numerose fasi, ciascuna sviluppata dai diversi gruppi partecipanti.

La prima fase ha avuto come obiettivo quello di sintetizzare un legante destrano-mannosio capace di legare il core  $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$ .

Buona parte di questa sintesi è stata effettuata dal gruppo di ricerca ungherese, il quale ha prodotto nuovi derivati che sono stati quindi inviati al gruppo di Ferrara, con il quale ho collaborato nella realizzazione e nello svolgimento di alcune delle seguenti fasi:

- 1) Unione tramite la Click chemistry dei vari frammenti che compongono i nuovi leganti multifunzionali di destrano-mannosio.
- 2) Marcatura dei nuovi leganti con il core  $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$
- 3) Controllo di qualità dei traccianti risultanti.
- 4) Studi biologici preliminari tramite lo scanner YAP-(S)PET.

Il kit di marcatura dei composti, dopo essere stato messo a punto, è stato inviato ai gruppi collaboranti al progetto, che hanno condotto le prove biologiche e gli studi di biodistribuzione e di imaging.

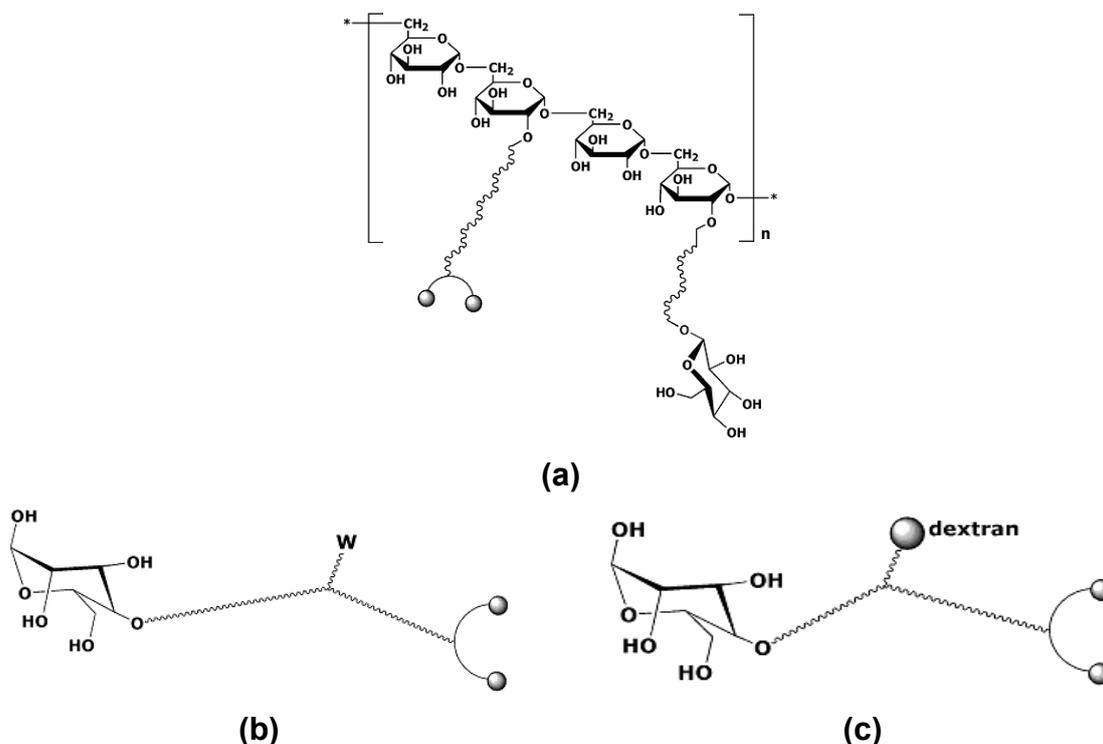
## 9. PARTE SPERIMENTALE

### 9.1 Progettazione di un legante multifunzionale destrano-mannosio per la coordinazione con il core $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$

Il Destrano è un ligando multifunzionale, ovvero una macromolecola avente dimensioni sufficientemente grandi da fungere da supporto (*scaffold*) e da poter accogliere nella propria struttura un elevato numero di differenti gruppi chimici con specifiche funzioni biologiche.

La prima parte di questo progetto ha previsto l'impiego di due differenti approcci al fine di legare, in diverse posizioni della catena polimerica, i due gruppi funzionali richiesti per ottenere un nuovo agente contenente il "core"  $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$  da impiegare nella rilevazione del Linfonodo Sentinella (SLND). Tali gruppi sono il sistema chelante adeguato per la coordinazione al core metallico e un residuo di mannosio.

Il primo di questi metodi viene indicato con il nome di "*linear approach*" e consiste nell'"agganciare" i gruppi funzionali in differenti posizioni della catena polimerica, come illustrato nella Figura 9.1a.



**Figura 9.1.** Rappresentazione dei differenti metodi per legare diversi gruppi funzionali alla molecola del destrano.

Il secondo metodo è invece noto con il nome di “*branched approach*” ed è illustrato in Figura 9.1b e Figura 9.1c. In quest’ultimo, ogni gruppo è stato posizionato ad una terminazione della catena lineare di atomi che era stata a sua volta fornita di un gruppo reattivo (definito **w**) nella sua posizione centrale (Figura 9.1b). Successivamente questo gruppo viene fatto reagire, con un’altra molecola opportuna e molto reattiva, precedentemente legata allo scheletro del destrano, ottenendo così un legame stabile. (Figura 9.1c)

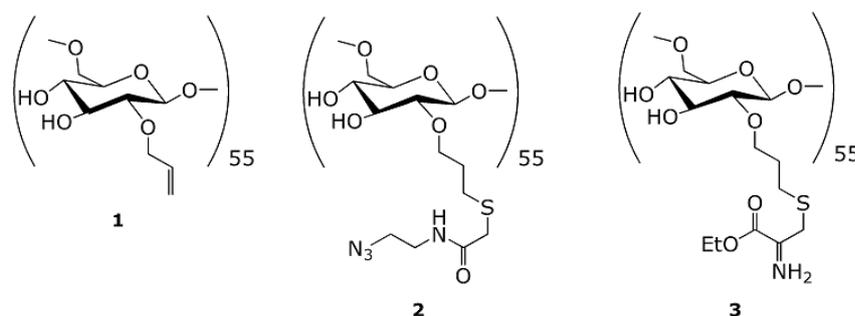
In questo modo entrambe le funzioni, quella chelante e quella biologicamente attiva, rimangono legate alla catena macromolecolare come catene ramificate appese alla macromolecola di destrano.

In particolare la strategia sintetica utilizzata (“*branched approach*”) include la preliminare preparazione di un frammento trifunzionale e lineare che presenti un residuo di mannosio da un lato, un gruppo chelante per il core  $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$  dall’altro lato ed infine un gruppo reattivo posizionati quasi al centro della catena lineare (Figura 9.1b, Figura 9.1c).

Questi frammenti, una volta sintetizzati, sono stati progressivamente legati allo scheletro di destrano derivatizzato, presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e di Chimica, usando tre diverse procedure:

- una reazione di Pauson-Khand (PKR);
- una cicloaddizione di Huysgen di un’azide con un alchino (nota con il nome di “*Click chemistry*”);
- una condensazione ammidica.

Più precisamente i derivati di allil-destrano (**1**), azido-destrano (**2**) e cistein-destrano (**3**) in Figura 9.2 sono usati rispettivamente nella PKR, nella *click chemistry* e nella condensazione ammidica.



**Figura 9.2.** Derivati del destrano utilizzati nella sintesi dei nuovi leganti multifunzionali destrano-mannosio.

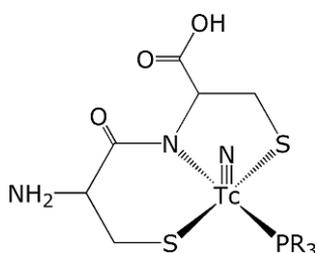
In seguito verranno riportati in dettaglio i passaggi chiave di queste due strategie sintetiche.

## 9.2 Scelta dell'opportuno sistema chelante per il core $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$

L'obiettivo di trovare l'opportuno sistema chelante per il core  $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$  è stato portato a termine nel laboratorio di Medicina Nucleare, noto per avere sviluppato un metodo originale per la preparazione di complessi asimmetrici di  $^{99m}\text{Tc}$  contenenti il gruppo terminale  $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$  e due differenti leganti bidentati coordinati allo stesso centro metallico, il cosiddetto *metodo (3+1)*.

Tale sistema coordinante, costituito da un ligando tridentato avente come atomi coordinanti il set S-N-S di tipo  $\sigma$  donatore ed un ligando monodentato monofosfinico ( $\text{PR}_3$ ) come  $\pi$  accettore, esibisce un'alta stabilità se viene coordinato ad un gruppo  $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$  con geometria piramidale a base quadrata.

Il sistema chelante tridentato (S-N-S), si ottiene a sua volta dalla semplice combinazione di due amminoacidi terminali cisteinici (sistema Cys-Cys) come illustrato nella Figura 9.3.



**Figura 9.3.** *Struttura dei complessi di nitrato -  $^{99m}\text{Tc}$  (3+1) con il sistema chelante Cys-Cys*

### 9.3 Sintesi del ligando multifunzionale destrano-mannosio contenente il sistema chelante Cys-Cys tramite il “linear approach”

Una prima sintesi del derivato del destrano è stata realizzata seguendo lo schema sintetico raffigurato in Figura 9.4.

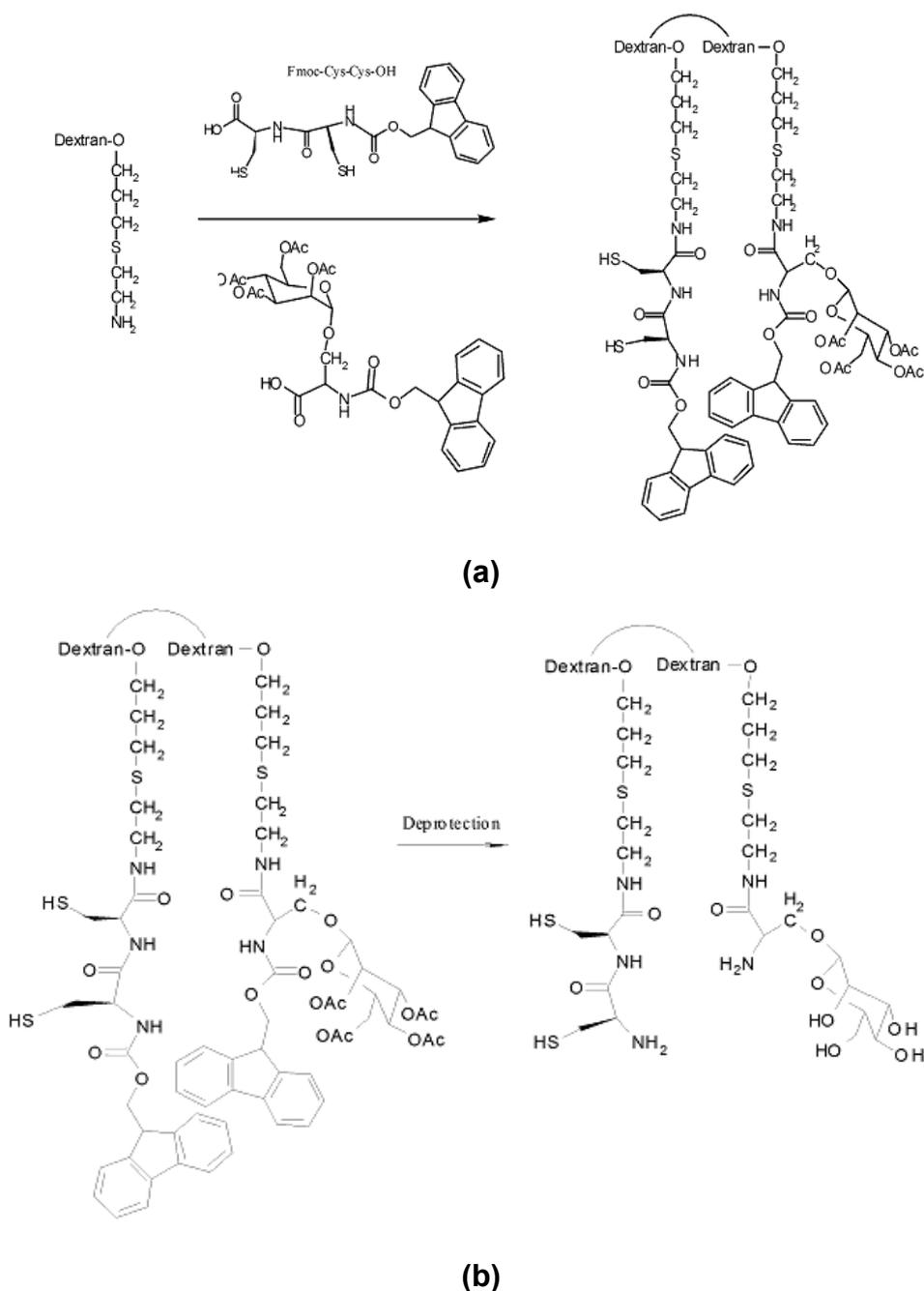
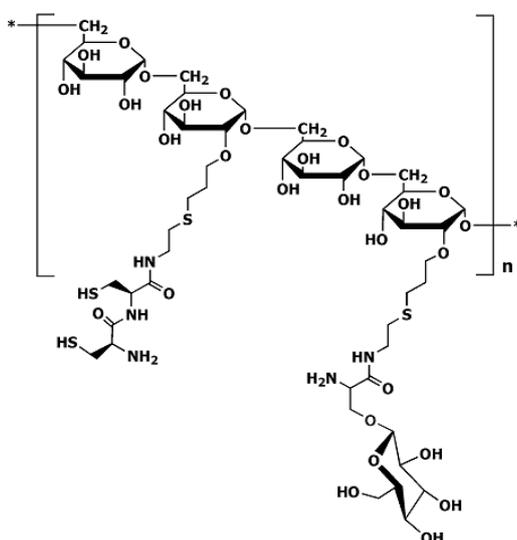


Figura 9.4. Rappresentazione schematica della sintesi del destrano tramite il “linear approach” (5).

Tra i derivati del destrano contenenti la porzione terminale Cys-Cys si è rivelato di particolare interesse il ligando Cys-Cys-destrano-mannosio (DCCM) **5** (in Figura 9.5), la cui sintesi può essere brevemente riassunta così:

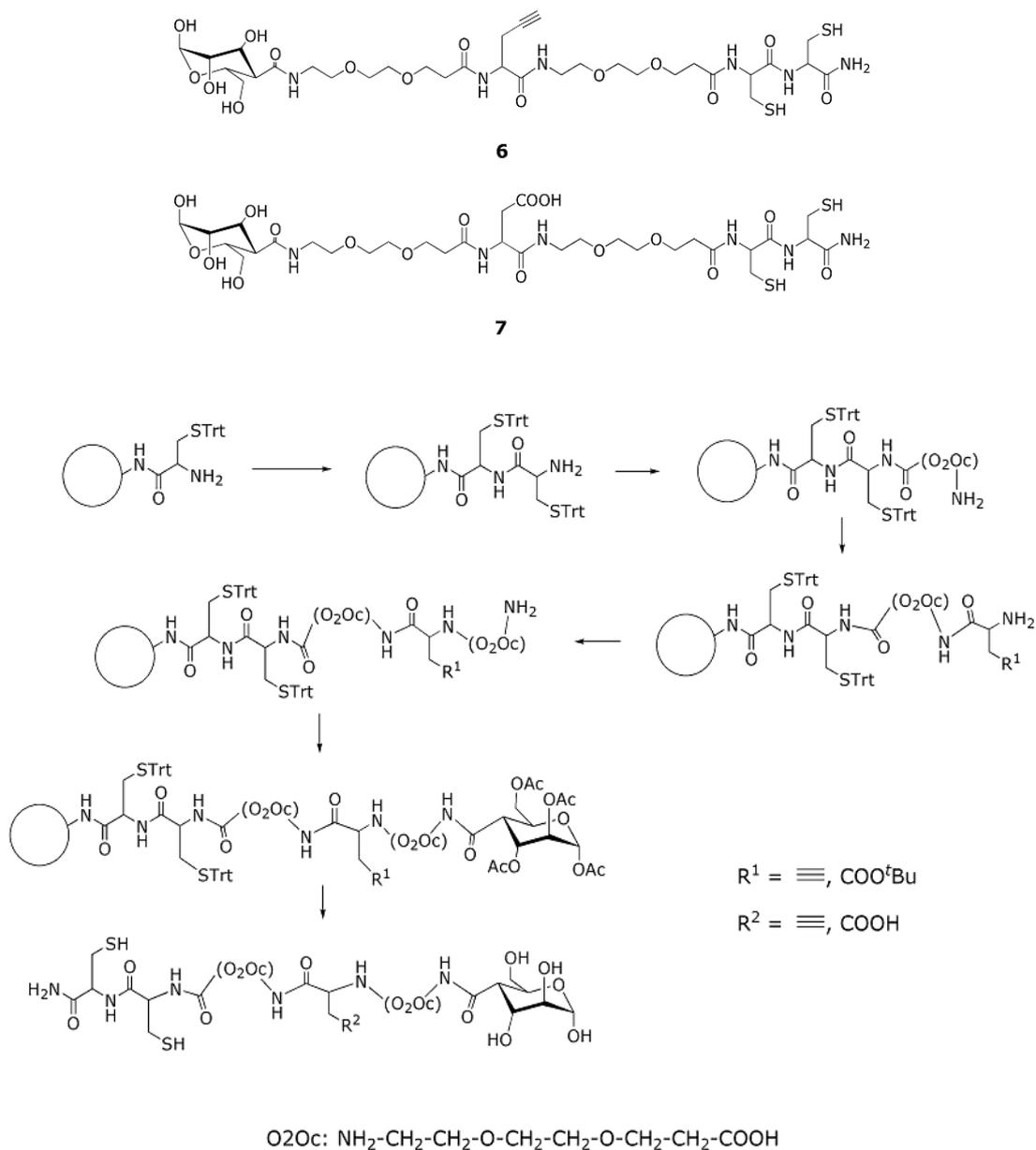
- I) Coniugazione ammino-terminale del destrano;
- II) Sintesi in fase solida del residuo bis-cisteinico;
- III) Sintesi del residuo mannosilato;
- IV) Accoppiamento dei residui bis-cisteinici e mannosilati alle terminazioni amminiche del destrano;
- V) Rimozione dei gruppi protettori.



**Figura 9.5.** *Rappresentazione schematica del ligando Cys-Cys-destrano-mannosio (DCCM)5*

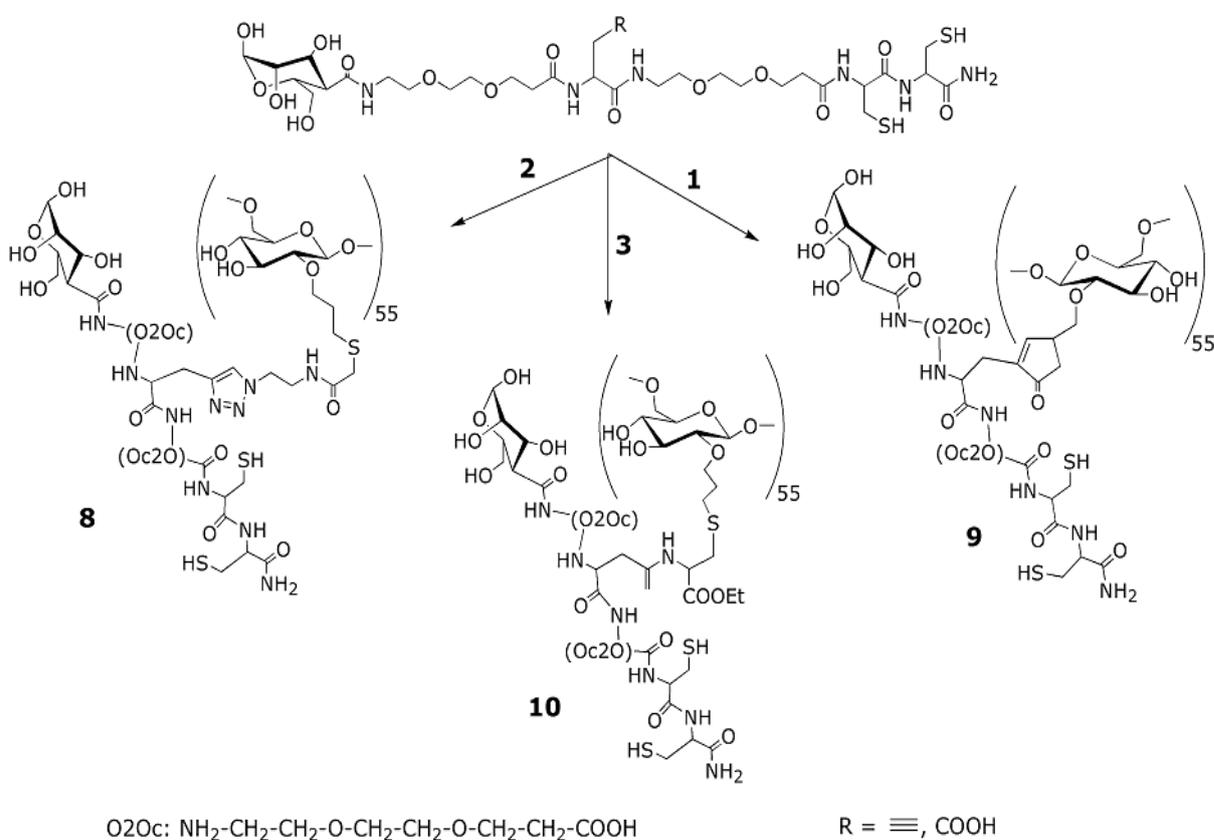
## 9.4 Sintesi del legante multifunzionale destrano-mannosio contenente il sistema chelante Cys-Cys tramite il “branched approach”

I leganti multifunzionali mannosilati Cys-Cys, **6** e **7**, (Figura 9.5a) adatti per la coordinazione al “core”  $^{99m}\text{Tc}=\text{N}$  utilizzando la strategia sintetica nota come metodo 3+1, sono stati ottenuti utilizzando le reazioni raffigurate in Figura 9.6.



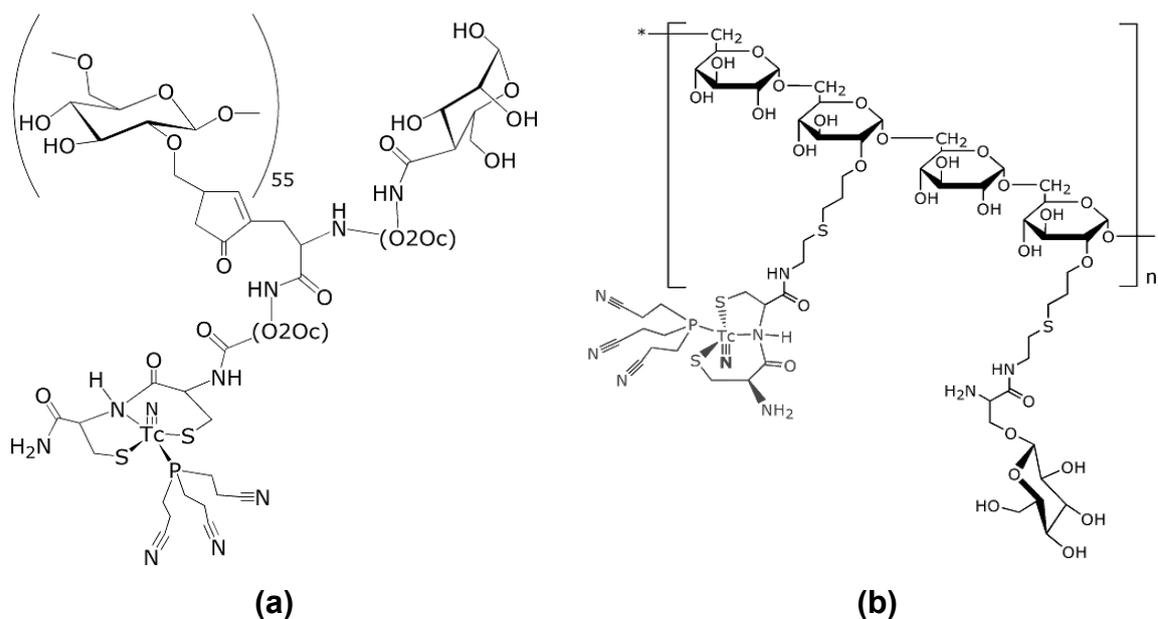
**Figura 9.6.** Sintesi e struttura dei leganti Cys-Cys-mannosio **6** e **7**.

I due pseudopeptidi lineari **6** e **7**, prodotti seguendo le procedure illustrate nella Figura 9.6, possiedono in pratica le stesse caratteristiche strutturali di base portando da un lato un gruppo di mannosio e dall'altro la combinazione di due cisteine, e differiscono essenzialmente per la natura del gruppo reattivo posto all'incirca al centro della catena lineare pseudopeptidica. In particolare il numero **6** porta un gruppo un alchino, sostituito da un gruppo carbossilico nel numero **7**. In questo modo la molecola risultante **6** viene rispettivamente legata al derivato del destrano **1** (vedi Figura 9.2) tramite la PKR, mentre al derivato **2** tramite la click chemistry, infine il legante **7** è condensato al derivato del destrano **3** tramite una condensazione ammidica (Figura 9.7).



**Figura 9.7.** Sintesi e struttura dei leganti Cys-Cys-mannosil-destrano **8**, **9** e **10**.

I leganti multifunzionali così formati **8-10** così come il legante **5** precedentemente illustrato, sono stati successivamente legati al core  $^{99\text{m}}\text{Tc}\equiv\text{N}$  utilizzando il sistema chelante Cys-Cys, mediante la strategia sintetica 3+1. In Figura 9.8 è schematizzata la struttura dei complessi ottenuti secondo la procedura sperimentale riportata di seguito.



**Figura 9.8.** Rappresentazione dei leganti Cys-Cys-destrano-mannosio **9** (a) e **5** (b) marcati con il core  $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$ .

## 9.5 Marcatura dei leganti 5, 8-10 con il core $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$

1 mg di diidrazide succinica (SDH) e 0,1 mg di  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , precedentemente solubilizzato in 0,1 ml di soluzione fisiologica, sono posti in una vial alla quale vengono successivamente aggiunti 0,9 ml di  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (50MBq-370 MBq) ottenuto da generatore. La vial viene lasciata a temperatura ambiente per 15 min. Il legante appropriato di destrano-mannosio (0,1 mg dissolti in 0,5 ml di soluzione fisiologica) e la tri-cianoetilfosfina (PCN) (0,5 mg dissolti in una soluzione fisiologica contenente 2,0 mg di  $\gamma$ -idrossiciclodestrina) sono aggiunti successivamente alla stessa vial e la miscela risultante è posta a 80° C per 15 min.

La purezza radiochimica dei complessi tecneziati (definita come il rapporto percentuale tra l'attività del radionuclide nella forma chimica desiderata e l'attività totale del preparato, e determinata tramite HPLC) è superiore a 90%.

I cromatogrammi dei complessi ottenuti sono riportati in Figura 9.9.

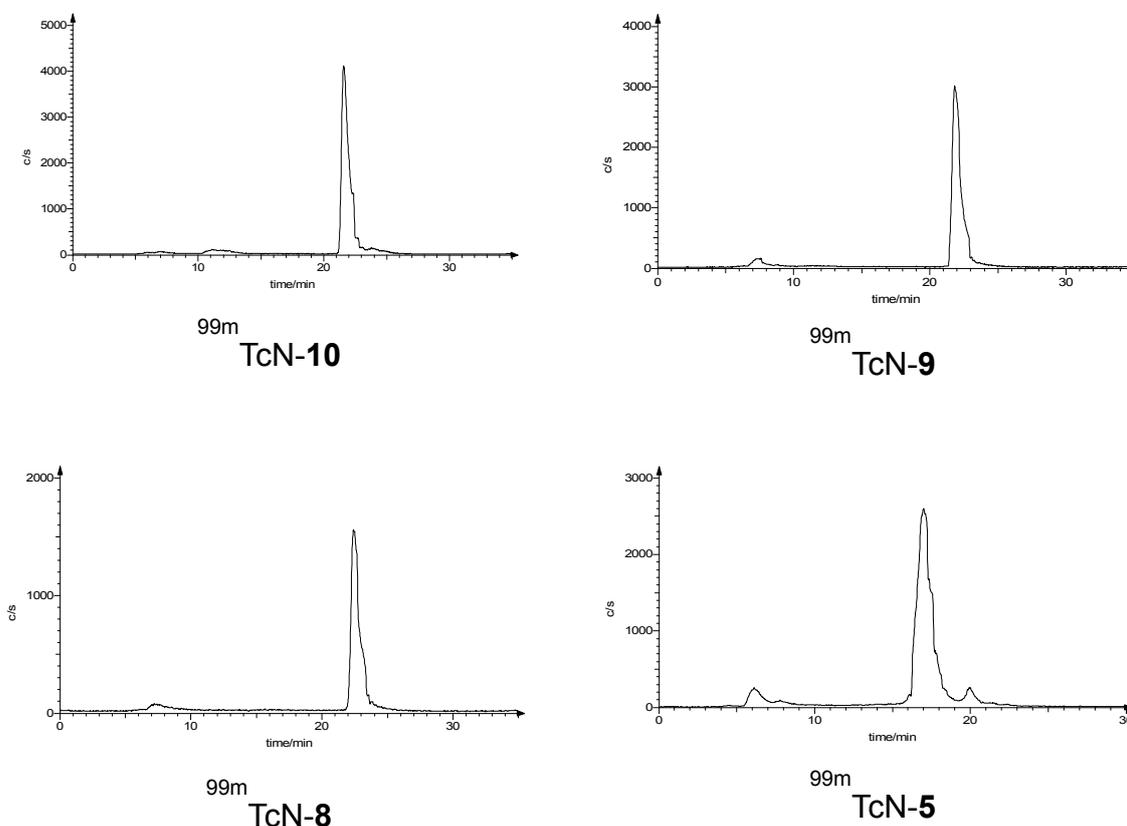
## 9.6 Cromatografia HPLC

Le analisi HPLC sono state effettuate utilizzando un "Beckman System Gold" munito di "Programmable Solvent Module 126", detector "Module UV 166" e detector per radioisotopi "Module 170". Il sistema cromatografico, costituito da una

precolonna (4.6x45 mm) ed una colonna (4.6x250) C18 (Zorbax), è stato fatto eluire ad un flusso di 1mL/min utilizzando come fase mobile A, 0.1% TFA in acqua, B: 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN secondo il seguente gradiente.

Time (min)	% B
0	0
0 - 25	100
25-30	100
30-35	0

Il tempo di ritenzione osservato è varia tra 18 e 22 minuti come illustrato in figura 9.9.



**Figura 9.9.** Cromatogrammi HPLC di <sup>99m</sup>Tc(N)5 e <sup>99m</sup>Tc(N)8-10

Come si può notare i cromatogrammi dei composti 8-10 siano sovrapponibili cioè presentino gli stessi picchi e quindi gli stessi tempi di ritenzione. Per la biodistribuzione in vivo è stato selezionato il composto 9.

I valori di purezza radiochimica ottenuti si sono rivelati superiori al 90% ed i complessi risultanti mostrano un'elevata stabilità in soluzione fisiologica (> 6 h).

## 9.7 Studi di stabilità dei complessi $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\mathbf{5}$ e $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\mathbf{8-10}$

La stabilità *in vitro* dei complessi  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\mathbf{5}$  e  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\mathbf{8-10}$  è stata valutata utilizzando la seguente procedura e monitorando la RCP a tempi differenti (15, 30, 60, 120 e 240 minuti). Dopo la preparazione 100  $\mu\text{L}$  di soluzione marcata sono stati incubati a 37°C con 900  $\mu\text{L}$  di salina, tampone fosfato e siero di ratto. La purezza radiochimica è stata determinata mediante cromatografia HPLC.

In particolare le analisi HPLC del marcato incubato con siero di ratto, sono state effettuate dopo aver precipitato la parte cellulare con 300  $\mu\text{L}$   $\text{CH}_3\text{CN}$ . Aliquote del surnatante sono state iniettate dopo aver centrifugato alla massima velocità per 15 minuti.

Gli esperimenti di scambio con cisteina e glutatione (GSH) sono stati effettuati secondo la seguente procedura. 100  $\mu\text{L}$  di complesso sono stati incubati a 37°C con 250  $\mu\text{L}$  di tampone fosfato (0.2 M, pH 7.4), 50  $\mu\text{L}$  di una soluzione fresca di L-cisteina (0.01 M) o in alternativa di GSH (0.01 M) e 100  $\mu\text{L}$  di acqua deionizzata. Il bianco è stato preparato sostituendo un volume uguale di acqua al posto della cisteina o del GSH. La stabilità dei complessi  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\mathbf{5}$  e  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\mathbf{8-10}$  è stata quindi valutata mediante cromatografia HPLC, monitorando la RCP a tempi differenti (15, 30, 60, 120 e 240 minuti). I complessi sono risultati stabili in tutte le condizioni appena descritte.

## 9.8 Studi di Imaging tramite lo Scanner per piccoli animali **YAP-(S)PET**

Presso il laboratorio si trova il tomografo ibrido "YAP-(S)PET", prototipo realizzato dal Gruppo di ricerca di Fisica Medica dell'Università di Ferrara.

Questo tomografo, infatti, ha la peculiarità di funzionare sia in modalità PET (Positron Emission Tomography) sia in modalità SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)<sup>157</sup>.

Il fine ultimo di un tomografo dedicato a studi su piccoli animali è quello di poter sostituire e migliorare la tradizionale tecnica delle biodistribuzioni che è ancora oggi il principale metodo per effettuare studi di cinetica dei radio traccianti. I limiti di questa ultima tecnica sono evidenti: un grande numero di animali viene sacrificato ad ogni biodistribuzione e questo è dispendioso sia in termini etici che di tempo,

nonché in termini economici; inoltre le analisi sono eseguite *ex vivo*.

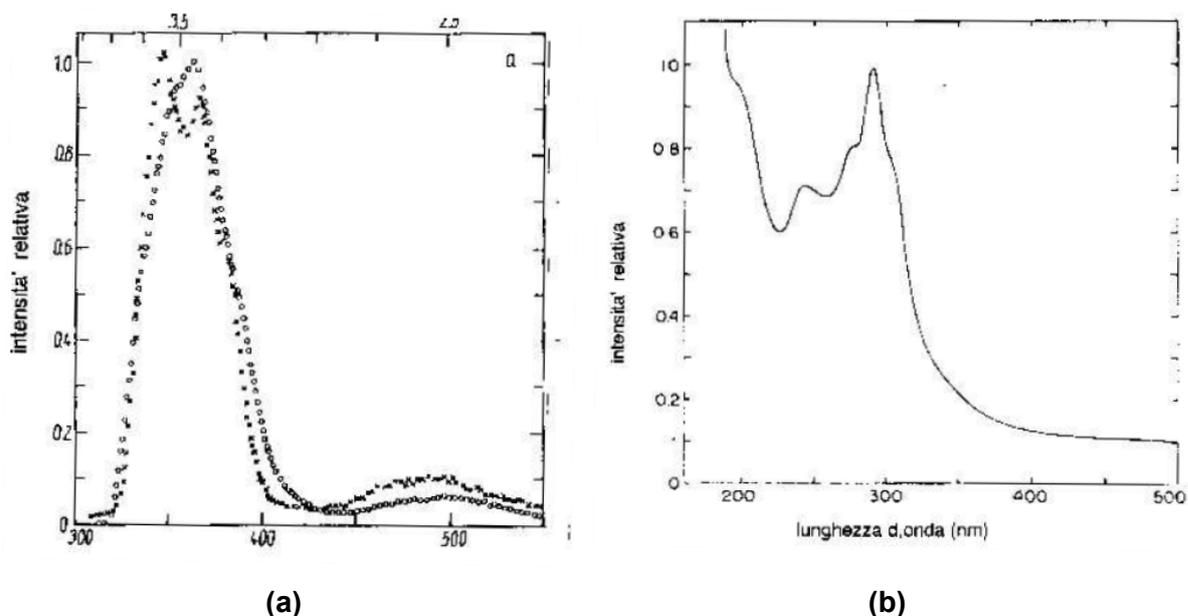
### **9.8.1 Prototipo del tomografo ibrido YAP-(S)PET**

Presso il laboratorio di Medicina Nucleare (Sezione di Diagnostica per immagini) di Ferrara è presente il tomografo per piccoli animali basato sullo scintillatore YAP (Ortoalluminato di Ittrio Perovskite), in grado di funzionare sia nella modalità PET che in quella SPECT, da cui il nome di YAP-(S)PET.

Il Tomografo YAP-(S)PET è costituito da due rivelatori disposti su un sistema meccanico rotante; ogni testa di rivelazione consiste in una matrice ( $4 \times 4 \times 3 \text{ cm}^3$ ) di  $\text{YAIO}_3:\text{Ce}$  (YAP) composta da 400 cristallini delle dimensioni di  $2 \times 2 \times 30 \text{ mm}^3$ . Ogni matrice è accoppiata otticamente ad un Fotomoltiplicatore Sensibile alla Posizione (PSPMT), mentre il sistema di acquisizione è gestito da un'elettronica modulare controllata da un programma realizzato ad hoc. Il prototipo aveva inizialmente la sola modalità di funzionamento PET, in cui la coppia di rivelatori funzionava in coincidenza, a questa si è aggiunta poi la modalità SPECT, in cui la coppia di rivelatori viene dotata di collimatori ad alta risoluzione spaziale. Il Tomografo YAP-(S)PET possiede un campo di vista di forma cilindrica con altezza di 4 cm e diametro di 4 cm anch'esso sia in PET che in SPECT.

L'Ortoalluminato di Ittrio ( $\text{YAIO}_3$ ) viene drogato con ioni trivalenti di terre rare, in particolare con lo ione  $\text{Ce}^{3+}$ , la cui percentuale, espressa in moli, è dello 0.6%. L' $\text{YAIO}_3$  è un monocristallo che presenta la struttura della perovskite e per questo esso viene anche indicato con il nome di Yttrium-Aluminium Perovskit, cioè YAP. Se lo ione attivatore appartiene al gruppo delle terre rare, come nel caso del Cerio, esso si sostituisce nel reticolo cristallino ad uno ione  $\text{Y}^{3+}$ , il cristallo di YAP mostra ottime proprietà meccaniche, un'elevata durezza, è chimicamente stabile e non è igroscopico. Questo cristallo offre inoltre la possibilità di essere lavorato in barrette sottili dell'ordine di 0.3 mm di lato e 10 mm di lunghezza e le sue superfici possono essere ricoperti da un sottile strato riflettente.

La scintillazione del cristallo YAP:Ce è dovuta a transizioni tra il livello 5d e il livello 4f dell'elemento attivatore ed il suo spettro di emissione ha il suo massimo di intensità alla lunghezza d'onda di 370 nm.



**Figura 9.10:** (a) Spettro di emissione del cristallo YAP a due diverse temperature; (b) Spettro di assorbimento a 300 Kelvin

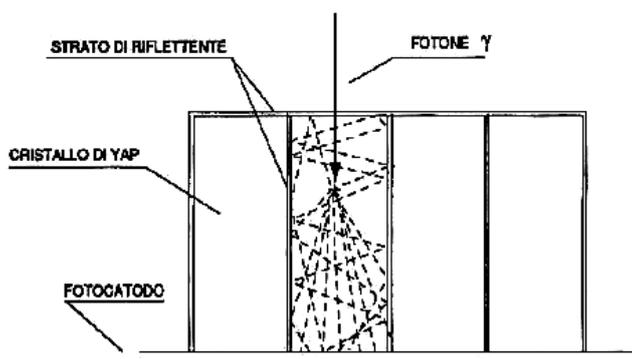
Se il cristallo viene irraggiato con radiazione  $\gamma$  il tempo di decadimento della scintillazione è di 27 ns. In tabella 7.1 sono riportate le principali caratteristiche dello YAP:Ce paragonate a quelle dei cristalli di NaI(Tl), di BGO, LSO e del CsI(Tl).

**Tabella 9.1. Caratteristiche dello YAP:Ce**

Material	NaI(Tl)	BGO	LSO	CsI(Tl)	YAP:Ce
Density g/cm <sup>3</sup>	3.76	7.13	7.4	4.51	5.37
Atomic numbers	11,53	83,32,8	71,32,8	55,53	39,13,8
Photoelectric fraction @					
140.5 keV	84%	94%	92%	87%	46%
@ 511 keV	18%	44%	34%	22%	4.4%
Light yield %NaI(Tl)	100	15	75	45	55
Decay time (ns)	230	300	40	1000	27
Peak emission wavelength (nm)	410	480	480	565	370
Index of refraction	1.85	2.15	1.82	1.80	1.95
Comments	Hygroscopic	low light and slow	intrinsic background 400 cps/cm <sup>3</sup>	high light but slow for PET	medium Z scintillator

Per i tomografi ad anello (con rivelatori discreti) la risoluzione spaziale è legata alle dimensioni trasverse del cristallo perciò, grazie alle caratteristiche dello YAP:Ce, il cristallo ha la forma di una matrice composta da tanti piccoli cristallini isolati otticamente tra loro da uno strato di 5  $\mu\text{m}$  di materiale riflettente, che ricopre tutte le facce eccetto quella a contatto col fotomoltiplicatore, in questo modo la luce prodotta in un cristallino rimane confinata in esso, evitando le perdite di luce in cristalli contigui, e tramite riflessioni sulle superfici laterali raggiunge il fotocatodo

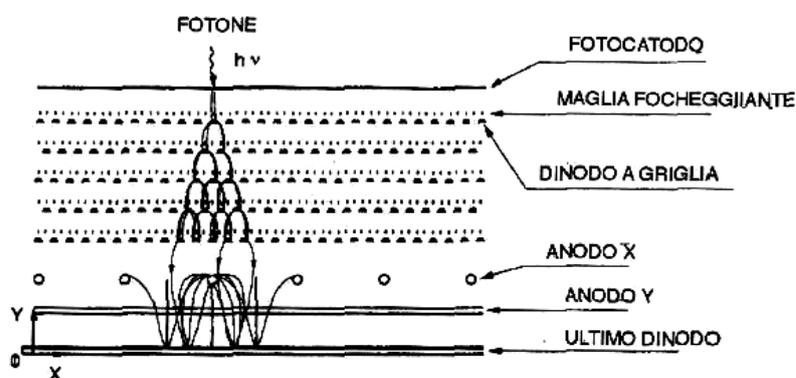
su un'area grande al massimo quanto la sezione della bacchetta.



**Figura 9.11.** *Trasporto della luce di scintillazione in un elemento di una matrice di YAP:Ce.*

La matrice, detta multi-crystal, viene poi accoppiata con un opportuno grasso ottico ad un fotomoltiplicatore sensibile alla posizione.

Il tipo di Position Sensitive PhotoMultiplier Tube (PSPMT) utilizzato nel Tomografo YAP-(S)PET è a sezione circolare con diametro anodico di 60 mm ed un'area attiva del fotocatodo di 50 mm di diametro. Il PSPMT utilizza griglie di dinodi e un anodo a fili incrociati per fornire un buon guadagno ed un'alta risoluzione spaziale.

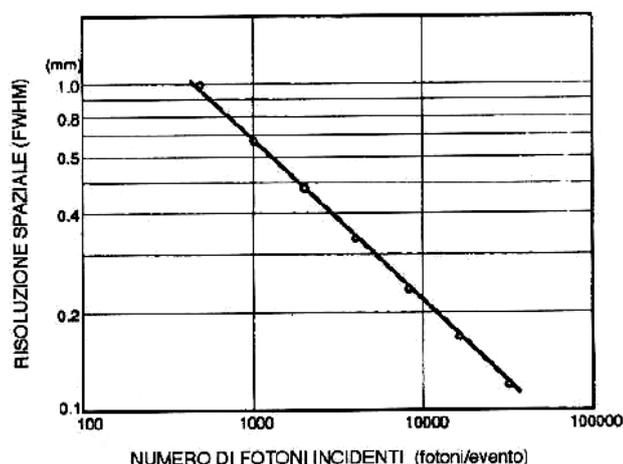


**Figura 9.12.** *Struttura degli elettrodi del fotomoltiplicatore sensibile alla posizione.*

Nella Figura 9.12 sono illustrati i principali componenti del fototubo e visualizzate le traiettorie degli elettroni attraverso i dinodi. I fotoelettroni emessi dal fotocatodo vengono moltiplicati da una serie di dinodi a griglia che producono un'amplificazione di un fattore 105. La nube di elettroni raggiunge l'ultimo dinodo, dal quale viene riflessa indietro e quindi raccolta sull'anodo. L'anodo è costituito da fili paralleli disposti su due piani: i fili di un piano incrociano in modo ortogonale quelli dell'altro, in modo tale da definire due direzioni X ed Y. Il primo dinodo si

trova in prossimità del fotocatodo e la struttura dei successivi è molto compatta; inoltre tra un dinodo e l'altro è presente una maglia per il focheggiamento degli elettroni. Questo tipo di configurazione tende a minimizzare l'allargamento della nube di elettroni durante la moltiplicazione, in modo che la distribuzione di carica sui fili anodici conservi l'informazione sulla posizione (X ed Y) di emissione dei fotoelettroni e quindi sulla posizione del punto di arrivo dei fotoni di scintillazione sul fotocatodo. La casa produttrice fornisce un valore dell'allargamento intrinseco della distribuzione di carica compreso tra 1.5 mm (FWHM) e 4 mm (FWHM) tra il primo e l'ultimo dinodo. In base a questo valore il passo tra i fili anodici è fissato a 3.75 mm.

La risoluzione spaziale intrinseca del fotomoltiplicatore in funzione del numero di fotoni incidenti è stata calcolata dalla casa produttrice irradiando il fotocatodo con fotoni di  $\lambda = 565$  nm concentrati in uno spot di 1 mm di diametro. Con uno spot così ridotto l'allargamento della nube di elettroni è limitato al valore intrinseco di 4 mm, mentre il contributo alla risoluzione spaziale del numero di fotoni incidenti il fotocatodo è compreso tra 0.9 mm e 0.12 mm rispettivamente per 500 e 30000 fotoni. Il valore medio della risoluzione spaziale è di 0.3 mm per 4000 fotoni incidenti. Si può notare che la risoluzione spaziale è inversamente proporzionale alla radice quadrata del numero di fotoni, come previsto dalla teoria statistica.



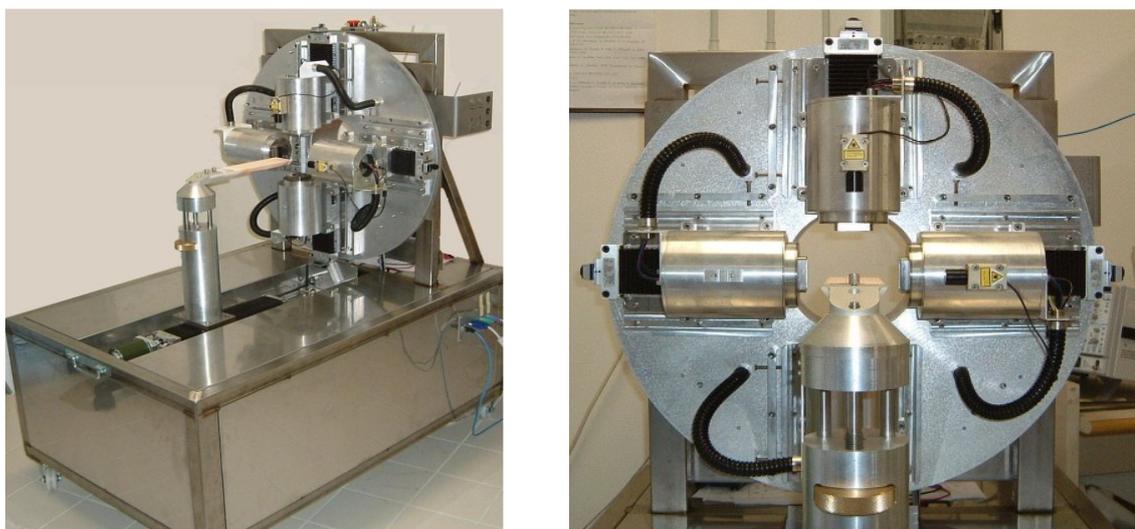
**Figura 9.13.** Risoluzione spaziale vs numero di fotoni incidenti sul fotocatodo.

Quando un fotone raggiunge il rivelatore viene depositata dell'energia in uno dei cristallini: la posizione che viene assegnata al fotone in un cristallino è data dalle coordinate del centro del cristallo interessato all'evento di scintillazione.

I collimatori usati nel Tomografo YAP-(S)PET sono a fori paralleli ad alta

risoluzione, che sono stati montati sui due rivelatori opposti, sono in piombo, la loro lunghezza è di 20 mm, i fori sono di 0.6 mm e di forma esagonale. I setti misurano 0.15 mm, mentre l'area attiva è di  $6 \times 6 \text{ cm}^2$ .

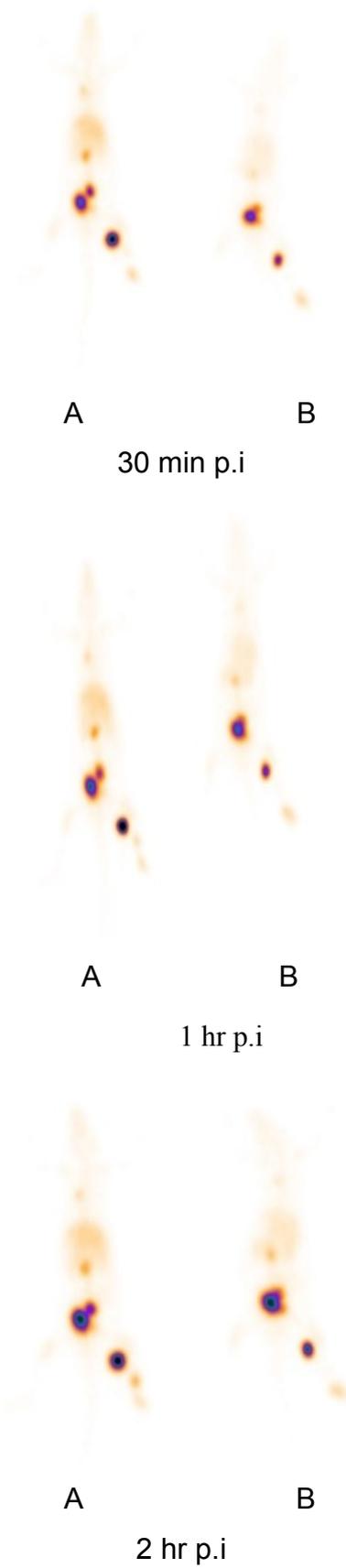
Per le schermature sono impiegate delle lastre di 0.5 cm di spessore: a contatto con il fototubo è posta una lastra di piombo incollata ad una lastra di rame, che a sua volta incollata ad una di alluminio. La parte posteriore presenta una schermatura di piombo+alluminio, con le opportune fessure per il passaggio dei fili elettrici.



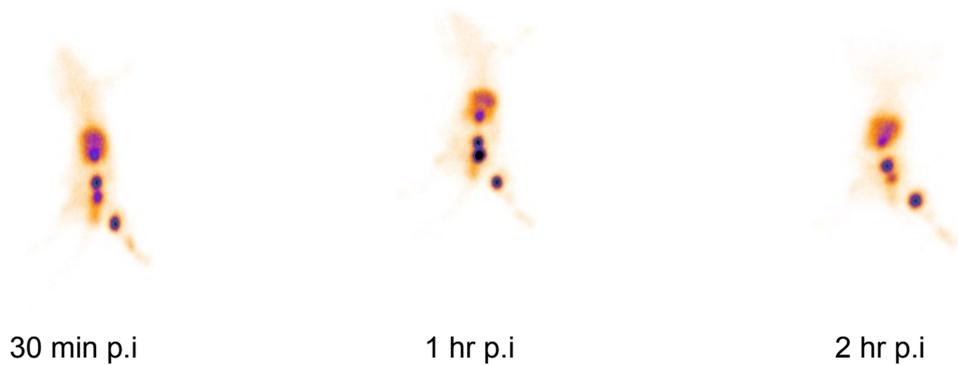
**Figura 9.14.** Scanner YAP-(S)PET

Le immagini tomografiche dei complessi con  $^{99m}\text{Tc}$  sono state acquisite a tempi diversi dall'iniezione sottocutanea dei traccianti in ratti sprague dawley precedentemente anestetizzati e raccogliendo i dati in modalità SPECT.

In Figura 9.15 e 9.16 sono riportate le immagini ricostruite dei 2 ratti iniettati rispettivamente con  $^{99m}\text{Tc(N)9}$  e  $^{99m}\text{Tc(N)5}$ .



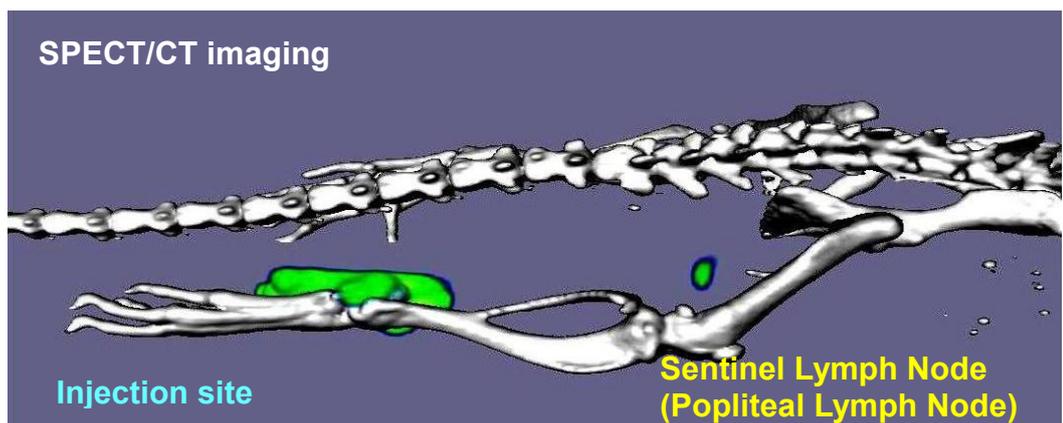
**Figura 9.15.** Immagini nel ratto di  $^{99m}\text{Tc}(N)5$  (A)  $^{99m}\text{Tc}(N)9$  (B)



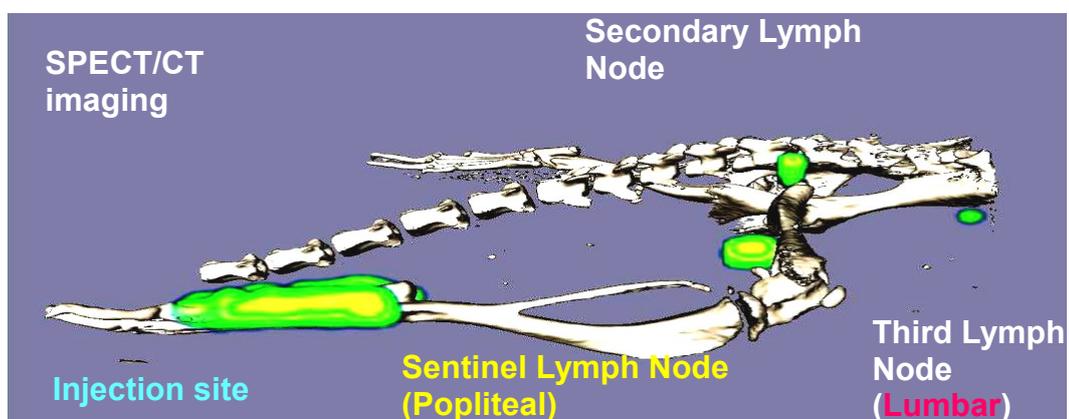
**Figura 9.16.** Immagini nel ratto di  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})5$

Le immagini SPECT/CT di un topo dopo iniezione sottocutanea di 100  $\mu\text{Ci}$  di Tc(N)9 e Tc(N)5 sono state ottenute dal gruppo ungherese del Prof. Korney e sono mostrate in Figura 9.17a e Figura 9.17b rispettivamente.

Le immagini evidenziano chiaramente il sito d'iniezione e il linfonodo sentinella (a) ma per il Tc(N)5 anche il secondo ed il terzo linfonodo (b).



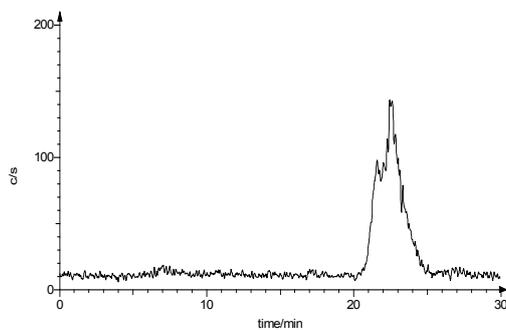
(a)



(b)

**Figura 9.17.** Immagini SPECT/CT nel topo di (a)  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})9$  e (b)  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})5$

Dopo l'iniezione del  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\mathbf{5}$  e del  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\mathbf{9}$  sono stati raccolti campioni di urina per la valutazione della stabilità in vivo e l'individuazione di eventuali metaboliti. Tali campioni sono stati analizzati con l'HPLC. Il profilo cromatografico dei complessi escreti si è dimostrato paragonabile a quello dei coniugati marcati originali indicando che entrambi i complessi sono stabili in vivo (Figura 9.18).



**Figura 9.18.** *Metabolismo dell'urina del  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\mathbf{9}$*

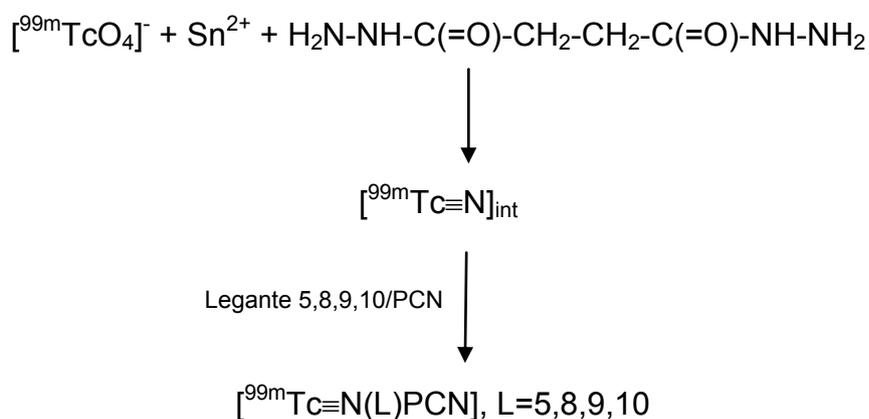
## 10. DISCUSSIONE

La sintesi dei leganti destrano-mannosio derivati utilizzabili per la formazione di composti contenenti il “core”  $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$  da impiegare nella rilevazione del Linfonodo Sentinella (SLND) è stata effettuata utilizzando due differenti strategie sintetiche nominate “*linear approach*” e “*branched approach*”.

L'applicazione del primo approccio ha condotto alla formazione del derivato multifunzionale **5**, ottenuto legando in maniera lineare direttamente sullo scheletro del destrano sia la parte biologicamente attiva rappresentata dal mannosio e affine ai recettori che si trovano sulla superficie dei macrofagi nei linfonodi, che il sistema chelante Cys-Cys per una stabile coordinazione al metallo.

Il secondo approccio sintetico ha invece condotto alla formazione dei leganti multifunzionali **8, 9, 10**. Questi, ottenuti utilizzando diverse strategie sintetiche a partire da derivati di destano differientemente funzionalizzati, hanno la caratteristica comune di portare il gruppo chelante e quello biologicamente attivo, in catene ramificate appese alla macromolecola di destrano.

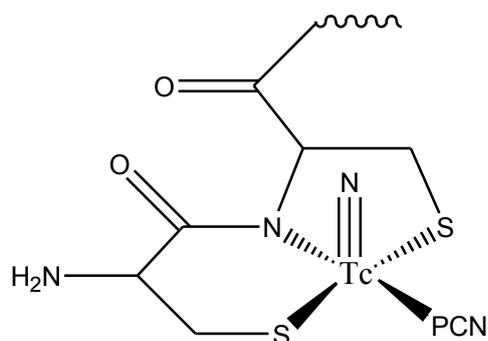
La preparazione dei complessi  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\mathbf{5,8,9,10}$  è stata effettuata utilizzando la procedura a due step riportata nello schema seguente:



Nel primo step di reazione il  $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ , eluito da generatore, viene fatto reagire a temperatura ambiente per 15 minuti con SDH (diidrazide succinica) in presenza di stagno, per formare una miscela di composti intermedi caratterizzati dalla presenza del core  $[^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$ . Lo stagno cloruro viene utilizzato come agente riducente per abbassare lo stato di ossidazione del metallo da +7, nel  $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ , a +5 nel composto finale. La diidrazide succinica invece viene impiegata per la

formazione del triplo legame  $[^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$ . Successivamente alla soluzione vengono aggiunti contemporaneamente un appropriato quantitativo di legante di destrano-mannosio derivato e la tris-cianoetilfosfina (PCN). La vial di reazione viene quindi scaldata a  $80^\circ\text{C}$  per 15 minuti. La purezza radiochimica dei complessi finali, determinata mediante cromatografia HPLC è circa 90%. Le analisi cromatografiche dei prodotti di reazione rivelano che durante il primo step della sintesi si formano, in alta resa, prodotti intermedi di natura chimica non completamente stabilita che reagiscono in presenza dei leganti L=5,8,9,10 e PCN per dare i complessi finali asimmetrici del tipo  $[^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}(\text{L})\text{PCN}]$  che per semplicità in precedenza sono stati indicati con Tc(N)**5**, Tc(N)**8**, Tc(N)**9** e Tc(N)**10**.

La strategia di sintesi che è stata utilizzata per la preparazione di tali composti, e sviluppata precedentemente nel laboratorio di Imaging Molecolare dell'Università di Ferrara, prende il nome di "metodo 3+1". Tale strategia infatti prevede l'utilizzo contemporaneo di un legante tridentato ed uno monodentato per la coordinazione e stabilizzazione del metallo (Tc). Nel nostro caso il legante tridentato è il derivato di destrano-mannosio L costruito in modo tale da contenere nella sua struttura chimica il raggruppamento molecolare Cys-Cys, ovvero due cisteine terminali condensate per formare il sistema tridentato di tipo SNS. Esso viene così indicato per sottolineare che di tal raggruppamento molecolare due atomi di zolfo ed uno di azoto sono impegnati nella coordinazione al metallo. Il legante monodentato è la monofosfina PCN. È stato infatti precedentemente dimostrato che sistemi chelanti di questo tipo reagiscono selettivamente con il raggruppamento metallico  $(^{99m}\text{TcN})^{2+}$  per formare complessi asimmetrici del tipo  $[^{99m}\text{TcN}(\text{SNS})\text{P}]$  in cui il legante  $\text{H}_2\text{SNS}$  si coordina al metallo mediante due atomi di zolfo deprotonati ed un atomo di azoto neutro mentre la monofosfina si coordina utilizzando l'atomo di fosforo neutro (Figura 8.1). In questo modo tutti i siti di coordinazione della geometria pentacoordinata, caratteristica dei composti di  $\text{Tc}\equiv\text{N}$ , vengono saturati dalla coordinazione di tre atomi del primo legante e da un atomo del secondo, dando vita ad un complesso stabile. Questa strategia di sintesi si è dimostrata estremamente utile per la marcatura di molecole biologicamente attive con  $^{99m}\text{Tc}$ . Infatti la marcatura di una biomolecola di interesse, potrà essere realizzata semplicemente associando la stessa a due cisteine, scelte per formare un sistema chelante adatto alla coordinazione al metallo. La fosfina monodentata viene invece utilizzata come legante ausiliare per la formazione di complessi stabili.



**Figura 10.1.** *Struttura dei complessi [ $^{99m}\text{TcN}(\text{SNS})\text{P}$ ]*

Gli studi imaging sono stati effettuati acquisendo le immagini tomografiche dei complessi  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\mathbf{5}$ , e  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\mathbf{9}$  al fine di paragonare le due differenti strategie sintetiche precedentemente illustrate per la realizzazione dei leganti multifunzionali di destrano-mannosio. Le immagini, ottenute dopo un'ora dall'iniezione dei traccianti su ratti precedentemente anestetizzati e acquisite utilizzando il tomografo per piccoli animali YAP(S)PET presente nel laboratorio di Imaging molecolare di Ferrara insieme a quelle SPECT/CT realizzate presso il laboratorio del Prof. Korney in Ungheria, hanno evidenziato una selettiva localizzazione linfonodale con chiara visualizzazione del primo linfonodo per il composto  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\mathbf{9}$ , ma anche del secondo e terzo linfonodo per il composto  $^{99m}\text{Tc}(\text{N})\mathbf{5}$ .

## 11. CONCLUSIONI

L'attività sperimentale svolta nel presente lavoro di tesi ha permesso di raggiungere l'obiettivo di mettere a punto nuovi Traccianti scintigrafici contenenti il core  $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$  che possiedono la capacità di legarsi ai recettori per il mannosio presenti sulla superficie dei macrofagi in sede linfonodale secondo un'interazione molecolare specifica con il target.

Nella strategia formulativa si è rivelato di particolare interesse il *branched approach*, che consente di ottenere ligandi trifunzionali con un più attento controllo del numero di gruppi funzionali introdotti nella macromolecola finale rispetto al *linear approach*.

Queste nuove molecole si dimostrano quindi potenzialmente utili per sostituire i colloidali attualmente in uso nella linfo-scintigrafia, abbreviando in questo modo i tempi dell'indagine.

Infatti solitamente con i colloidali tecnezati la somministrazione viene effettuata circa 3-4 ore prima dell'acquisizione delle immagini; al contrario questi nuovi traccianti, avendo dimensioni molto più piccole, migrano velocemente dal sito di deposito al primo linfonodo e già dopo circa un'ora dall'iniezione può essere ottenuta l'immagine linfo-scintigrafica.

Ciò permette di accelerare i tempi della diagnosi e, cosa non di minore importanza, di arrecare il minor fastidio al paziente.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- 
- <sup>1</sup> Donald L.Morton, Duan-Ren Wen, Jan H.Wong, James S.Economou, Leslie A. Cagle, F.Kristian Storm, Leland J.Foshag, Alistair J. Cochran "Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma" Arch Surg. 1992;127(4):392-399
- <sup>2</sup> Newmann L.A., "Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients: a comprehensive review of variations in performance and technique". (2004), J. Am. Coll. Surg. 199 804-816.
- <sup>3</sup> Veronesi U, Zurrída S, Galimberti V. Consequences of sentinel node in clinical decision making in breast cancer and prospects for future studies. Eur J Surg Oncol. 1988 Apr;24(2):93-5
- <sup>4</sup> Karpozilos A, Pavlidis N. The treatment of cancer in Greek antiquity. Eur J Cancer 2004;40:2033-2040.
- <sup>5</sup> Gerota D, Zur Technik der Lymphgefassinjection. Eine neue injection masse fur lymphgefass. Polychrom Inject Anat Anzeiger. 1896; 12:216-224
- <sup>6</sup> Cabanas RM El tratamiento ganglionar en el cancer del pene [tesi] New York: 1975
- <sup>7</sup> Cabanas RM An approach for the treatment of penile carcinoma. Cancer 1977;39:456-566
- <sup>8</sup> Sayegh E, Brooks T, Sacher E. et al Lymphangiography of the retroperitoneal lymph nodes through the inguinal route. J Urol 1966;95:102-107
- <sup>9</sup> Gould EA, Winship T, Philbin PH et al Observation on a 'sentinel node' in cancer of the parotid. Cancer 1960;20:77-18
- <sup>10</sup> Braithwaite LR The flow of lymph from the ileocaecal angle, and its possible bearing on the cause of duodenal and gastric ulcer. Br J Surg 1923;11:7-26
- <sup>11</sup> Hudack SS, McMaster PD The lymphatic participation in human cutaneous phenomena. J Exp Med 1933;57:751-775
- <sup>12</sup> Walker L Localization of radioactive colloids in lymph nodes J Lab Clin Med 1950; 36:440.449
- <sup>13</sup> Sherman AL, Ter-Pogossian M, Tocus EC. Lymph node concentration of radioactive colloidal gold following interstitial injection. Cancer 1953;6:1238-1240
- <sup>14</sup> Sage HH, Gozun BV. Lymphatic scintigrams: a method for studying the functional pattern of lymphatics and lymph nodes. Cancer. 1958;11:200-203
- <sup>15</sup> Aitken DR, Hinkle GH, Thurston MO et al. A gamma-detecting probe for radioimmune detection of CEA-producing tumors. Successfull experimental use and clinical case report. Dis Colon rectum 1984;27:279-282
- <sup>16</sup> Holmes EC, Moseley HS, Morton DL et al A rational approach to the surgical management of melanoma. Ann Surg 1977;186:481-490
- <sup>17</sup> Cochran AJ, Wen DR, Herschman HR, et al Detection of S-100 protein as an aid to the

---

identification of melanocytic tumors. *Int J Cancer* 1982;30:295-297

<sup>18</sup> "Trattato di senologia" di Stefano Modena - Piccin (2006)

<sup>19</sup> Petronis J.D., Lafrance N.D. Kaelin W., "Lymphoscintigraphy". *Eur. J. Nucl. Med.* 1985; 10;560-562.

<sup>20</sup> Wilhemein A.J., Mijnhout G.S. Franssen E.J., "Radiopharmaceuticals in sentinel lymph-node detection - an overview". *Eur. J. Nucl. Med.* 1999;26; S36-42.

<sup>21</sup> Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR et al. American society of clinical oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early stage breast cancer *J Clin Oncol.* 2005; 23:7703-7720

<sup>22</sup> Chatterjee A., Serniak N., Czerniecki BJ Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer a work in progress *The Cancer J* 2015, 21 7:10

<sup>23</sup> Lyman GH, Termin S, Edge SB, et al. Sentinel lymph node biopsy for patients with early stage breast cancer. American society of clinical oncology practice guidelines update

<sup>24</sup> Filippakis GM, Zografos G Contraindications of sentinel lymph node biopsy: are they any real? *World j surg oncol* 2007; 5:10

<sup>25</sup> Cody HS 3rd, Fey J, Akhust T et al. Complementarity of of blue dye and radioisotope in sentinel node localisation of breast cancer: univariate and multivariate analysis of 966 procedures. *Ann Surg Oncol* 2001; 8:13-9

<sup>26</sup> Chen RC, Lin NU, Golshan M et al. Internal mammary nodes in breast cancer: diagnosis and implication for patient management – a systematic review *J Clin Oncol* 2008; 177:445-449

<sup>27</sup> Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, et al. Sentinel Lymph node resection compared with axillary lymph node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial *Lancet Oncol* 2010; 11:927-933

<sup>28</sup> Veronesi U, Viale G, Paganelli G, et al. Sentinel Lymph node biopsy in breast cancer: ten-years result of a randomized control study. *Ann Surg* 2012; 251:595-600

<sup>29</sup> Mansel RE, Fallowfield L., Hissin M et al Randomized multicentric trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the almanac trial *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:599-575

<sup>30</sup> Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel-node micrometastasis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2011; 305:569-575

<sup>31</sup> Galimberti V, Cole BF Zurrida S, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women in patients with sentinel node micrometastasis (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial

<sup>32</sup> Kuahn T, Bauerfeind I, Fehm T, et al. Sentinel Lymph node biopsy in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): a prospective, multicenter cohort study. *Lancet Oncol.* 2013; 14:609-618

<sup>33</sup> Boughey JC, Suman VJ, Mittendorf EA, et al. Sentinel lymph node surgery after neoadjuvant chemotherapy in patients with node-positive breast cancer: the ACOSOG

---

Z1071 (Alliance) clinical trial JAMA 2013; 310:1455-1461

<sup>34</sup> Bilde A, Von buchwald C, Mortensen J, et al Acta Otolaringol 2006; 126: 1096-1103

<sup>35</sup> Varmeen L, Valdés Olmos RA, Klop WM, et al. Head Neck 2011; 33:1-6

<sup>36</sup> Alkrazi N, Glass EC, Castronovo F et al. J Nucl Med 2002; 43:1414-1418

<sup>37</sup> Balasubramanian SP, Harrison BJ, Systematic review and methanalysis of sentinel node biopsy in thyroid cancer. Br J Surg 2012; 23:1087-1089

<sup>38</sup> Huang O, Wu W, Wang O, et al. Sentinel lymph node biopsy is unsuitable for routine practice in younger female patients with unilateral low-risk papillary thyroid carcinoma BMC Cancer 2011, 11:386

<sup>39</sup> Carcoforo P, Portinari M, Feggi L. et al, Radio guided selective compartment neck dissection improves staging in papillary thyroid carcinoma: a prospective study on 345 patients with a 3-year follow-up Surgery 2014; 156:147-157

<sup>40</sup> Roh JL1, Koch WM. Role of sentinel lymph node biopsy in thyroid cancer. Expert Rev Anticancer Ther. 2010;10:1429-37

<sup>41</sup> Filip B, Scarpa M, Cavallin F et al. Minimally invasive surgery for esophageal cancer: a review in sentinel node concept. Surg Endosc 2014; 28(4):306-313

<sup>42</sup> Takeuchi H, Kawakubo H, Takeda F, et al. Sentinel node navigation surgery in early-stage esophageal cancer. Ann Thorac Cardiovasc Surg 2012;18(4):306-313

<sup>43</sup> Takeuchi H, Kitagawa Y Sentinel Lymph node biopsy in gastric cancer The Cancer Journal 2015; 21:21-24

<sup>44</sup> Tajima Y, Murakami M, Yamazaki K, et al. Sentinel node mapping guided by indocyanine green fluorescence imaging during laparoscopic surgery in gastric cancer Ann Surg Oncol 2012; 17:1787-1793

<sup>45</sup> Ishikawa K, Yasuda K, Shiromizu T, et al. Laparoscopic sentinel node navigation achieved by infrared ray endoscopic electronic system in patients with gastric cancer Surg Endosc 2007; 21:1131-1134

<sup>46</sup> Saha S, Johnston G, Korant A et al, Aberrant drainage of sentinel lymph nodes in colon cancer and its impact on staging and extent of operation Am J Surg. 2013; 205:302-305

<sup>47</sup> Huynh KT, Bilchik A, Sentinel Lymph Node Biopsy and modal ultrastaging in Colorectal Cancer The Cancer Journal 2015; 21:11-16

<sup>48</sup> Wood TF, Nora DT, Morton DL et al. One hundred consecutive cases of sentinel lymph node mapping in early colorectal carcinoma: detection of missed micrometastases; J G Surg 2002; 191:305,310

<sup>49</sup> Tsioulis GJ, Wood TF, Morton DL et al. Lymphatic mapping and focused analysis of sentinel lymph nodes upstage gastrointestinal neoplasms. Arch Surg 2000; 135:926-932

<sup>50</sup> Tausch C., Baege A., Rageth C. Mapping lymph nodes in cancer management – role of Tc99m-tilmanocept injection. OncoTargets and Therapy 2014;7: 1151-1158

<sup>51</sup> Bilchik AJ, DiNome M, Saha S et al. Prospective multicentric trial of staging adequacy in colon cancer Arch Surg 2006; 141:527-534

- 
- <sup>52</sup> Nissan A, Proctic M, Bilchij AJ, et al. United states Military Cancer Institute Clinica Trials Group (USMCI GI-01) randomized controlled trial comparing targeted nodal assesement and ultrastaging with standard pathological evaluation for colon cancer *Ann Surg* 2012; 256:412-427
- <sup>53</sup> Stojadinovic A, Nissan A, Proctic M, et al. Prospective randomised study comparing sentinel lymph node evaluation with standard pathologic evaluation for the staging of colon carcinoma: results from the united states military cancer institute clinical study roup study GI-01 *Ann Surg*, 2007; 245:846-857
- <sup>54</sup> Bertagnolli M, Miedema B, Redston M, et al Sentinel node staging for resectable colon cancer: results of a multicentric study. *Ann Surg* 2004; 4:624-628
- <sup>55</sup> Liptay MJ, Grondin SC, Fry WA, et al. Intraoperative sentinel lymph node mapping in non-small cell lung cancer improves detection of micromethastasis *J Clin Oncol*, 2009; 4:198-202
- <sup>56</sup> Shersher DD, Liptay MJ status of sentinel lymph node mapping in non small cell lung cancer 2015 *Cancer J* 21 17-20
- <sup>57</sup> Winter A, Kneib T, Henke RP, et al. Sentinel lymph node dissection in more than 1200 prostate cancer cases; rare and prediction of lymph node involvement depending on preoperative tumor characteristics *Int J Urol* 2014, 21(1)58-63
- <sup>58</sup> van der Berg NS, Valdes-Olmos RA, van der Poel HG et al. Sentinel lymph node biopsy for prostate cancer; a hybrid aproch
- <sup>59</sup> Sadeghi R1, Ghoalami H, Zakawi SR, et al. Accuracy of sentinel lymph node biopsy for inguinal lymph node staging of penile squamos cell carcinoma: systematic review and meta-analysis of the leterature *J Urol* 2012; 187(1) 25-31
- <sup>60</sup> Giammarile F., Vidal Sicart S., Valdés Olmos R.A. Uncommon application of lymph node mapping: urogenital cancers. *Q J Nucl Med Nucl Imaging* 2014; 58:161-79
- <sup>61</sup> Tanis PJ, Horenblas S, Valdés Olmos RA, Hoefnagel CA, Nieweg 97. OE. Feasibility of sentinel node lymphoscintigraphy in stage I testicular cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29:670- 3.
- <sup>62</sup> Brouwer OR, Valdés Olmos RA, Vermeeren L, Hoefnagel CA, Nieweg OE, Horenblas S. SPECT/CT and a portable gamma- camera for image-guided laparoscopic sentinel node biopsy in testicular cancer. *J Nucl Med* 2011;52:551-4.
- <sup>63</sup> Bex A, Vermeeren L, Meinhardt W, Prevoo W, Horenblas S, Valdés Olmos RA Intraoperative sentinel node identification and sampling in clinically node-negative renal cell carcinoma: initial experience in 20 patients. *World J Urol* 2011;29:793-9.
- <sup>64</sup> Sherif A, De La Torre M, Malmström PU, Thörn M. Lymphatic mapping and detection of sentinel nodes in patients with bladder cancer. *J Urol* 2001;166:812-5.
- <sup>65</sup> Liedberg F, Chebil G, Davidsson T, Gudjonsson S, Mansson W. Intraoperative sentinel node detection improves nodal staging in invasive bladder cancer. *J Urol* 2006;175:84-8.
- <sup>66</sup> Lerner SP, Skinner DG, Lieskovsky G, Boyd SD, Groshen SL, Ziogas A et al. The rationale for en bloc pelvic lymph node dissection for bladder cancer patients with nodal metastases: long term results. *J Urol* 1993;149:758-64.
- <sup>67</sup> Stein JP, Skinner DG. Radical cystectomy for invasive bladder cancer: long-term results

---

of a standard procedure. *World J Urol* 2006;24:296-304.

<sup>68</sup> Palla VV, Karaolanis G, Moris D et al. Sentinel lymph node biopsy on uterine cervical cancer patients: ready for clinical use? *Gynecol oncol.* 2012 130: 237-245

<sup>69</sup> van de Lande J, Torrenga B, Raijmakers PG et al. Sentinel lymph node detection in early stage uterine cervix carcinoma: a systematic review.2007 *Gynecol Oncol* 106:604-13

<sup>70</sup> Hassazade M, attaran M, Treglia G et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in women with squamous cell carcinoma of the vulva: a gynecologic oncology group study *J Clin Oncol* 2012; 30 (31) 3786 – 3791

<sup>71</sup> Hassazade M, attaran M, Treglia G et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in women with squamous cell carcinoma of the vulva: a gynecologic oncology group study *J Clin Oncol* 2012; 30 (31) 3786 – 3791

<sup>72</sup> Robison K, Roque D, McCourt C Long term follow-up of vulvar cancer patients evaluated with sentinel lymph node biopsy alone *Gynecol Oncol.* 2014 Jun;133(3):416-20

<sup>73</sup> Van der Zee Ag, Oonk;H. de Hullu JA et al. Sentinel node dissection is safe in the treatment of early stage vulvar cancer 2008 *J Clin Oncol* 26(6): 884-9

<sup>74</sup> Cass I, Li AJ, Runowicz CD, Fields AL, et al. Pattern of lymph node metastases in clinically unilateral stage I invasive epithelial ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 2001;80:56

<sup>75</sup> Negishi H, Takeda M, Fujimoto T, et al. Lymphatic mapping and sentinel node identification as related to the primary sites of lymph node metastasis in early stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004;94:161-6.

<sup>76</sup> Yamauchi K, Kogashiva Y, Nkamura T, et al. Diagnostic evaluation of sentinel lymph node biopsy in early head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Head Neck.* 2015 Jan;37(1):127-33.

<sup>77</sup> Tausch C, Baege A, Rageth C. Mapping lymph nodes in cancer management – role of 99mTc-tilmanocept injection. *Onco Targets and Therapy* 2014;7;1151-1158

<sup>78</sup> Levenback CF, Ali S, Coleman RL, et al. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early head and neck squamous cell carcinoma; A meta analysis. *Head Neck Epub* 2013 Oct 25

<sup>79</sup> Gershenwald JE, Ross MI. Sentinel-lymph-node biopsy for cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 2011;364:1738–45.

<sup>80</sup> Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Costantino JP, et al. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:927–33.

<sup>81</sup> Salhab M, Patani N, Mokbel K. Sentinel lymph node micrometastasis in human breast cancer: an update. *Surg Oncol* 2011;20:e195–206.

<sup>82</sup> Mansel RE, Khonji NI, Clarke D. History, present status and future of sentinel node biopsy in breast cancer. *Acta Oncol* 2000;39:265–8.

- 
- <sup>83</sup> Hayashi H, Tangoku A, Suga K, Shimizu K, Ueda K, Yoshino S, et al. CT lymphography-navigated sentinel lymph node biopsy in patients with superficial esophageal cancer. *Surgery* 2006;139:224–35.
- <sup>84</sup> Ball CG, Sutherland F, Kirkpatrick AW, Dixon E, MacLean AR, Mack LA, et al. Dramatic innovations in modern surgical subspecialties. *Can J Surg* 2010;53:335–41.
- <sup>85</sup> Rao DA, Forrest ML, Alani AWG, Kwon GS, Robinson JR. Biodegradable PLGA based nanoparticles for sustained regional lymphatic drug delivery. *J Pharm Sci* 2010;99:2018–31.
- <sup>86</sup> Kobayashi H, Kawamoto S, Bernardo M, Brechbiel MW, Knopp MV, Choyke PL. Delivery of gadolinium-labeled nanoparticles to the sentinel lymph node: comparison of the sentinel node visualization and estimations of intra-nodal gadolinium concentration by the magnetic resonance imaging. *J Control Release* 2006;111:343–51.
- <sup>87</sup> Tsopeles C. Particle size analysis of Tc-99 m-labeled and unlabeled antimony trisulfide and rhenium sulfide colloids intended for lymphoscintigraphic application. *J Nucl Med* 2001;42:460–6.
- <sup>88</sup> Cong L, Takeda M, Hamanaka Y, Gonda K, Watanabe M, Kumasaka M, et al. Uniform silica coated fluorescent nanoparticles: synthetic method, improved light stability and application to visualize lymph network tracer. *PLoS One* 2010;5:e13167.
- <sup>89</sup> Johnson L, Charles-Edwards G, Douek M. Nanoparticles in sentinel lymph node assessment in breast cancer. *Cancers* 2010;2:1884–94.
- <sup>90</sup> Hiraiwa K, Ueda M, Takeuchi H, Oyama T, Irino T, Yoshikawa T, et al. Sentinel node mapping with thermoresponsive magnetic nanoparticles in rats. *J Surg Res* 2012;174:48–55.
- <sup>91</sup> Tsopeles C, Bevington E, Kollias J, Shibli S, Farshid G, Coventry B, et al. Tc-99m-Evans blue dye for mapping contiguous lymph node sequences and discriminating the sentinel lymph node in an ovine model. *Ann Surg Oncol* 2006;13:692–700.
- <sup>92</sup> Manolova V, Flace A, Bauer M, Schwarz K, Saudan P, Bachmann MF. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur J Immunol* 2008;38:1404–13.
- <sup>93</sup> Hutteman M, Mieog JSD, van der Vorst JR, Liefers GJ, Putter H, Lowik C, et al. Randomized, double-blind comparison of indocyanine green with or without albumin premixing for near-infrared fluorescence imaging of sentinel lymph nodes in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2011;127:163–70.
- <sup>94</sup> Jimenez IR, Roca M, Vega E, Luisa Garcia M, Benitez A, Bajen M, et al. Particle sizes of colloids to be used in sentinel lymph node radiolocalization. *Nucl Med Commun* 2008;29:166–72.
- <sup>95</sup> Goesmann H, Feldmann C. Nanoparticulate functional materials. *Angew Chem Int Ed* 2010;49:1362–95.
- <sup>96</sup> Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WCW. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *J Am Chem Soc* 2012;134:2139–47.
- <sup>97</sup> Subramanian S, Dandekar P, Jain R, Pandey U, Samuel G, Hassan PA, et al. Technetium-99m-labeled poly(DL-Lactide-co-Glycolide) nanoparticles as an alternative for

---

sentinel lymph node imaging. *Cancer Biother Radiopharm* 2010;25:637–44.

<sup>98</sup> Bembenek A, Gretschel S, Schlag PM. Sentinel lymph node biopsy for gastrointestinal cancers. *J Surg Oncol* 2007;96:342–52.

<sup>99</sup> Lerman H, Lievshitz G, Zak O, Metser U, Schneebaum S, Even-Sapir E. Improved sentinel node identification by SPECT/CT in overweight patients with breast cancer. *J Nucl Med* 2007;48:201–6.

<sup>100</sup> Rzyman W, Hagen OM, Dziadziuszko R, Kobierska-Gulida G, Karmolinski A, Lothe MI, et al. Blue-dye intraoperative sentinel lymph node mapping in early non-small-cell lung cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:462–5.

<sup>101</sup> Bustos MEF, Camargo JJP, Resin Geyer G, Feijo Andrade C. Intraoperative detection of sentinel lymph nodes using Patent Blue V in non-small cell lung cancer. *Minerva Chir* 2008;63:29–36.

<sup>102</sup> Alex JC, Krag DN. Gamma-probe guided localization of lymph nodes. *Surg Oncol Oxford* 1993;2:137–43.

<sup>103</sup> Vanderveen H, Hoekstra OS, Paul MA, CuestaMA, Meijer S. Gamma probe-guided sentinel node biopsy to select patients with melanoma for lymphadenectomy. *Br J Surg* 1994;81:1769–70.

<sup>104</sup> Frangioni JV. New technologies for human cancer imaging. *J Clin Oncol* 2008;26:4012–21.

<sup>105</sup> Van de Ven C, De Leyn P, Coosemans W, Van Raemdonck D, Lerut T. Three-field lymphadenectomy and pattern of lymph node spread in T3 adenocarcinoma of the distal esophagus and the gastro-esophageal junction. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;15:769–73.

<sup>106</sup> Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, Kubo A, Kitajima M. Sentinel lymph node mapping in esophageal and gastric cancer. *Cancer Treat Res* 2005;127:123–39.

<sup>107</sup> Aarsvold JN, Alazraki JP. Update on detection of sentinel lymph nodes in patients with breast cancer. *Semin Nucl Med* 2005;35:116–28.

<sup>108</sup> Johnson L, Charles-Edwards G, Douek M. Nanoparticles in sentinel lymph node assessment in breast cancer. *Cancers* 2010;2:1884–94

<sup>109</sup> Jain R, Dandekar P, Patravale V. Diagnostic nanocarriers for sentinel lymph node imaging. *J Control Release* 2009;138:90–102

<sup>110</sup> Polom K, Murawa D, Rho YS et al. Current trends and emerging future of indocyanine green usage in surgery and oncology: a literature review. *Cancer* 2011;117:4812–22

<sup>111</sup> Fujiwara M, Mizukami T, Suzuki A, et al. Sentinel lymph node detection in skin cancer patients using real-time fluorescence navigation with indocyanine green: preliminary experience. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2009;62:E373–8

<sup>112</sup> Yamashita S-i, Tokuishi K, Anami K, et al. Video-assisted thoracoscopic indocyanine green fluorescence imaging system shows sentinel lymph nodes in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;141:141–4

<sup>113</sup> Hutteman M, Mieog JSD, van der Vorst JR, et al. Randomized, double blind comparison of indocyanine green with or without albumin premixing for near-infrared fluorescence imaging of sentinel lymph nodes in breast cancer patients. *Breast Cancer*

- <sup>114</sup> Pan D, Pramanik M, Senpan A, et al. Near infrared photoacoustic detection of sentinel lymph nodes with gold nano beacons. *Biomaterials* 2010;31:4088-93
- <sup>115</sup> Pan D, Cai X, Yalaz C, et al. Photoacoustic sentinel lymph node imaging with self-assembled copper neodecanoate nanoparticles. *ACS Nano* 2012;6:1260-7
- <sup>116</sup> Agarwal A, Huang SW, O'Donnel M, et al. Targeted gold nanorod contrast agent for prostate cancer detection by photoacoustic imaging. *J Appl Phys* 2007;102
- <sup>117</sup> Sever AR, Mills P, Weeks J, et al. Preoperative needle biopsy of sentinel lymph nodes using intradermal microbubbles and contrast-enhanced ultrasound in patients with breast cancer. *A J R Am J Roentgenol.* 2012;199:465-70
- <sup>118</sup> Hyung WJ, Kim YS, Lim JS, et al. Preoperative imaging of sentinel lymph nodes in gastric cancer using T lymphography. *Yonsei Med J* 2010;51:407-13
- <sup>119</sup> Chung YE, Hyung WJ, Kweon S, et al. Feasibility of interstitial CT lymphography using optimized iodized oil emulsion in rats. *Invest Radiol* 2010;45:142-8
- <sup>120</sup> Hainfeld JF, Slatkin DN, Focella TM, et al. Gold nanoparticles: a new x-ray contrast agent. *Br J Radiol* 2006;79:248-53
- <sup>121</sup> Boote E, Fent G, Kattumuri V, et al. Gold nanoparticle contrast in a phantom and juvenile swine: models for molecular imaging of human organs using x-ray computed tomography. *Acad Radiol* 2010;17:410-17
- <sup>122</sup> Popovtzer R, Agrwal A, Kotov NA, et al. Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer. *Nano Lett* 2008;8:4953-6
- <sup>123</sup> Kobayashi H, Kawamoto S, Bernsrd M, et al. Delivery of gadolinium-labeled nanoparticles to the sentinel lymph node: comparison of the sentinel node visualization and estimation of intra-nodal gadolinium concentration by the magnetic resonance imaging. *J Control Release* 2006;111:343-51
- <sup>124</sup> Kou G, Wang S, Cheng C, et al. Development of SM5-1 conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles for hepatoma detection. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374:194:192-7
- <sup>125</sup> Sun C, Lee JSH, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1252-65
- <sup>126</sup> Jun Y, Huh Y, Choi J, et al. Nanoscale size effects of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. *J Am Chem Soc* 2005;127:5732-3
- <sup>127</sup> Pinna N, Grancharov S, Beato P, et al. Magnetite nanocrystals: nonaqueous synthesis, characterization, and solubility. *Chem Mater* 2005;17:3044-9
- <sup>128</sup> Corot C, Robert P, Idee J-M, et al. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:1471-504
- <sup>129</sup> Shiozawa M, Lefor A, Hozumi Y, et al. Sentinel lymph node biopsy in patients with breast cancer using superparamagnetic iron oxide and a magnetometer. *Breast Cancer* 2013;20:223-9

- 
- <sup>130</sup> Wallace AM, Hoh CK, Ellner SJ, et al. Lymphoseek: a molecular imaging agent for melanoma sentinel lymph node mapping. *Ann Surg Oncol* 2007;14:913-21
- <sup>131</sup> Leong SP, Kim J, Ross M, et al. A phase 2 study of (99m)Tc-Tilmanocept in the detection of sentinel lymph nodes in melanoma and breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2011b;18:961-9
- <sup>132</sup> Liu TQ, Cousins A, Chien CC, et al. Immunospecific targeting of CD45 expressing lymphoid cells: towards improved detection agents of the sentinel lymph node. *Cancer Lett* 2013;328:271-7
- <sup>133</sup> Nagashima T, Sakakibara M, Nakano S, et al. Sentinel node micrometastases and distant failure in breast cancer patient. *Breast Cancer* 2006;13:186-91
- <sup>134</sup> Eck V, Nicholson AI, Zentgraf H, et al. Anti-CD4-targeted gold nanoparticles induce specific contrast enhancement of peripheral lymph nodes in x-ray computed tomography of live mice. *Nano Lett* 2010;10:2318-22
- <sup>135</sup> Heuveling DA, Visser GWM, Baclayon M, et al. 89Zr-Nanocolloidal albumin-based PET/CT lymphoscintigraphy for sentinel node detection in head and neck cancer: preclinical results. *J Nucl Med* 2011;52:1580-84
- <sup>136</sup> Heuveling DA, van Schie A, Vugts DJ, et al. Pilot study of the feasibility of PET/CT lymphoscintigraphy with 89Zr-nanocolloidal albumin for sentinel node identification in oral cancer patients. *J Nucl Med* 2013;54:585-589
- <sup>137</sup> Stroup SP, Kane CJ, Farchshchi-Heydari S, et al. Preoperative sentinel lymph node mapping of the prostate using PET/CT fusion imaging and Ga-68-labeled tilmanocept in animal model. *Clin Exp Metastasis* 2012 Oct;29(7):673-80
- <sup>138</sup> Schwochau K. "Technetium: Chemistry and Radiopharmaceutical Applications 2000 Wiley-VCH, Weinheim (Germany)
- <sup>139</sup> Kung, H.F., "Development of Tc-99m labeled tropanes: TRODAT-1, as a dopamine transporter imaging agent" (2001), *Nucl. Med. Biol.* **28** 505.
- <sup>140</sup> Fritzberg A.R., Kasina S., Eshima D. Johnson D.L. "Synthesis and Biological Evaluation of Tc-99m Mag3 as a Hippuran" (1986), *Replacement. J. Nucl. Med.* **27** 111.
- <sup>141</sup> Bolzati C, Boschi A, Uccelli L, et al. Chemistry of the strong electrophilic metal fragment [<sup>99</sup>Tc(N)(PXP)<sup>2+</sup>] (PXP = diphosphin ligand): A novel tool for the selective labeling of small molecule. *J Am Chem Soc.* 2002; **124**:11468-11479
- <sup>142</sup> Blok D., Feitsma H.I.J., Kooy Y.M.C., et al. New Chelation Strategy allows for Quick and Clean Tc-99m-labeling of Synthetic Peptides. *Nucl. Med. Biol.* 2004; **31**: 815.
- <sup>143</sup> Burns *et al.*, "Synthesis of tetradentate aminothiols and their technetium complexes". *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 1981; **18**, 54-55.
- <sup>144</sup> Walther M., Jung C.M., Bergmann R., Pietzsch J., et al. Synthesis and biological evaluation of a new type of <sup>99m</sup>Technetium-labeled fatty acid for myocardial metabolism imaging. *Bioconjugate Chem.* 2007;18: 216.
- <sup>145</sup> Harapanhalli RS (2010) Food and Drug Administration requirements for testing and approval of new radiopharmaceuticals. *Semin Nucl Med* 40(5):364-384
- <sup>146</sup> Hahn MA, Singh AK, Sharma P et al (2011) Nanoparticles as contrast agents for in-vivo

---

bioimaging: current status and future perspectives. *Anal Bioanal Chem* 399(1):3-27

<sup>147</sup> Robinson S, Delongas JL, Donald E et al (2008) A European pharmaceutical company initial challenging the regulatory requirement for acute toxicity studies in pharmaceutical drug developing.

<sup>148</sup> EMEA – CPMP (2009) ICH Topic M3 (R2) Non-clinical safety studies for the conduct of buse clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals (CPMP/ICH/286/95)

<sup>149</sup> National Center for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (2002) Challenging requirement for acute toxicity studies: A workshop report

<sup>150</sup> Biomarkers Definitions Working Group (2001) Biomarkers and surrogate end-points: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69(3):89-95

<sup>151</sup> Tomino C (2004) *Manuale Tecnico-Pratico sulla sperimentazione clinica dei medicinali*. CMP, Roma

<sup>152</sup> Abraham J. W., Mijnhout G. S., Eric J. F. F. “Radiopharmaceuticals in sentinel lymph node detection – an overview”, *Eur J Nucl Med* 1999:26 S36-S42.

<sup>153</sup> Vera D.R., Wallace A.M., Hoh, C.K. Mattrey R.F., “A synthetic macromolecule for sentinel node detection: <sup>99m</sup>Tc-DTPA-mannosyl-dextran”. *J. Nucl. Med.* 2001: 42 951-959.

<sup>154</sup> Vera D.R., Wallace A.M. Hoh C.K., “[<sup>99m</sup>Tc]MAG3-mannosyl-dextran: A receptor-binding radiopharmaceutical for sentinel node detection”.(2001), *Nuclear Medicine and Biology* **28** 493-498

<sup>155</sup> Wallace A.M., Hoh C.K., Ellner S.J., Darrah D.D., Schulteis G., Vera D.R., “Lymphoseek: a molecular imaging agent for melanoma sentinel lymph node mapping”. (2007) *Ann. Surg. Oncol.* **14** 913-921.

<sup>156</sup> Wallace A.M., Hoh C.K., Ellner S.J., Darrah D.D., Schulteis G., Vera D.R., “Lymphoseek: a molecular imaging agent for melanoma sentinel lymph node mapping”. (2007) *Ann. Surg. Oncol.* **14** 913-921.

<sup>157</sup> Damiani C, Del Guerra A, Didomenico G, et al., “An integrated PET-SPET imager for small animals”. (2001), *Nucl Instrum Methods Fis Res A*461:416-419.