

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA**



**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**Dottorato di ricerca in Fisiopatologia Chirurgica - XXIV Ciclo**

**RUOLO DELL'ERITROPOIETINA NELLA  
PREVENZIONE DELL'ISCHEMIA DEL TUBULO  
GASTRICO DOPO ESOFAGECTOMIA: RAZIONALE  
FISIOPATOLOGICO E PROPOSTA DI  
PROTOCOLLO CLINICO**

**COORDINATORE: CHIAR.MO PROF. ALESSANDRO CAPPELLANI**

**RELATORE: CHIAR.MO PROF. MARCO MONTORSI**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA DI:**

**PIETRO MUSELLI**

**ANNO ACCADEMICO 2010/2011**

## SOMMARIO

1. INTRODUZIONE.....	4
2. RAZIONALE.....	20
3. MATERIALI E METODI.....	21
4. PROPOSTA DI PROTOCOLLO.....	24
5. ANALISI STATISTICHE.....	29
6. RIIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	31

## RINGRAZIAMENTI

Il primo, e più grande, ringraziamento va al Prof. Riccardo Rosati per avermi consentito di utilizzare la sua geniale intuizione come oggetto di questo studio e per avermi permesso di avvalermi della sua esperienza nello sviluppo del progetto.

Desidero ringraziare il Prof. Marco Montorsi per avermi dato la preziosa opportunità di partecipare a questo dottorato di ricerca.

Ai colleghi che hanno partecipato con il loro lavoro e la loro professionalità alla realizzazione di questo protocollo, un caloroso grazie.

Un grazie a tutti gli splendidi professionisti dell'Unità Operativa di Chirurgia Mininvasiva per la loro collaborazione; più che colleghi sono stati dei veri amici nell'assistermi nella realizzazione del mio lavoro. Grazie anche a Matteo e Simonetta: i vostri lavori sono stati preziosissimi.

Ringrazio, in particolare, Andrea e Lavinia; senza di voi non avrei concluso niente, mi avete aiutato e supportato (oltre che sopportato, ovviamente). Grazie Marty.

Ringrazio Chiara, Giacomo e Celeste, per esserci, sempre.

## INTRODUZIONE

L'esofagectomia, nel trattamento carcinoma dell'esofago e del cardias con approccio toracico e addominale, è un intervento di chirurgia maggiore che espone al rischio di complicanze severe come la formazione di una fistola, la stenosi o la deiscenza dell'anastomosi.

Le complicanze spesso originano dalla devascularizzazione e dall'ischemia del viscere che sostituisce il tratto resecato detto anche "interponato" o nel caso dello stomaco "tubulo" e meno comunemente, dalla necrosi trans murale secondaria all'ischemia.

Le alternative disponibili per il confezionamento del neo-esofago sono stomaco, colon o digiuno; spesso tali opzioni possono risultare limitate da una pregressa chirurgia e, a seconda della sede del tumore, non sono di volta in volta tutte ugualmente valide ai fini di ottenere un buon risultato chirurgico.

Ad esempio, per tumori a localizzazione particolarmente alta nell'esofago toracico medio-superiore, un'ansa digiunale potrà raggiungere meno facilmente il moncone esofageo residuo, rispetto ad un tubulo confezionato con lo stomaco; pertanto, un viscere sottoposto ad una tensione maggiore, presenterà assai maggiori difficoltà di vascularizzazione, in particolare a livello del suo estremo prossimale, su cui cadrà l'anastomosi con l'esofago.

Il presupposto fondamentale per la buona guarigione di qualsiasi anastomosi, è infatti, una soddisfacente vascularizzazione di entrambi i monconi che la costituiscono.

E' per questo motivo che un'approfondita conoscenza di incidenza, fattori di rischio, diagnosi, trattamento e prevenzione dell'ischemia/necrosi dell'interponato, rappresenta la condizione necessaria per una corretta gestione perioperatoria di qualsiasi paziente che venga avviato a tale chirurgia.

Numerosi studi clinici hanno rilevato che la ridotta perfusione del viscere migliora a cinque giorni dall'operazione demolitiva, è dunque di fondamentale importanza, tenere conto delle comorbilità in grado di comprometterla, condizionando un deficit di ossigenazione dei tessuti, come il diabete, le malattie cardiovascolari (ipertensione, aritmie, alterazioni della contrattilità miocardica) e la BPCO.

I dati disponibili in letteratura non permettono di stabilire con univocità quale delle tecniche ricostruttive comporti una minore incidenza di complicanze post operatorie e dunque un maggior successo terapeutico.

Lo stomaco è ormai divenuto senza dubbio il viscere utilizzato più spesso nel sostituire l'esofago resecato, grazie ad alcune caratteristiche che lo contraddistinguono. (6,10,30)

È ormai accettato che lo stomaco possa essere utilizzato come tubulo sostitutivo sia in pazienti con patologie esofagee maligne sia, seppur con una minor frequenza, per il trattamento di disturbi benigni.

La buona vascolarizzazione gastrica rappresenta il cardine nella scelta di quest'organo: esso, infatti, possiede un apporto sanguigno da parte di vasi che risultano di un buon calibro e che presentano una variabilità anatomica non rilevante.

È inoltre facilmente mobilizzabile e, dopo essere stato tubulizzato, richiede una sola anastomosi per ricostituire la continuità digestiva e può essere all'occorrenza anche di notevole lunghezza se viene adeguatamente liberato dai suoi punti di fissità.

Lo stomaco infine costituisce un trapianto durevole, in grado di rimanere vitale e di conservare la propria dimensione, forma e funzionalità nel tempo.

Per consentire la trasposizione toracica dello stomaco tubulizzato, è necessario sacrificare tre dei cinque peduncoli vascolari che assicurano la fisiologica perfusione del viscere; questo passaggio implica una deprivazione di flusso ematico di cui la quota maggiore interessa il fondo gastrico, ovvero il sito predisposto dell'anastomosi.

Le arterie che vengono legate sono la gastrica sinistra, la gastroepiploica sinistra e le gastriche brevi; è stato dimostrato su modelli animali (1) che tali legature comportano la pressoché esclusiva dipendenza della vascolarizzazione del tubulo gastrico dal flusso sanguigno dell'arteria gastroepiploica di destra, mediante l'arcata vascolare che da essa origina e che decorre lungo la grande curvatura all'interno della radice del grande omento, attraverso una rete capillare intra-murale.

Quanto detto a favore del tubulo gastrico resta valido anche a costo di accettare un'incidenza di complicanze sull'anastomosi esofago-gastrica piuttosto alta, che in vari lavori si attesta su percentuali più alte di quelle dell'anastomosi confezionata col secondo viscere in ordine di frequenza di utilizzo, ovvero il colon.

A tal proposito, citando la nutrita casistica di Briel e coll., sia le complicanze anastomotiche precoci sia quelle tardive, sarebbero più comuni dopo ricostruzione gastrica rispetto all'utilizzo del colon. Dopo la trasposizione dello stomaco, le fistole sono più frequenti (14,3% contro 6,1%) e le stenosi sono più severe, oltreché più frequenti (31,3% contro 8,7%). Le stenosi sono più frequenti dopo ricostruzione tramite tubulo gastrico anche nel gruppo di pazienti senza evidenza clinica di ischemia o fistola.

Di contro, molti autori riportano una più alta incidenza di complicanze anastomotiche con l'uso del colon come sostituto, (1) e in generale, l'incidenza riportata di complicanze ischemiche sul colon interposto va dal 2 al 13%.(2,3)

Complessivamente, una fistola anastomotica si presenta con una frequenza che va dal 15 al 20% nei pazienti sottoposti ad esofagectomia, anche se tale incidenza può variare dallo 0 al 70% a seconda delle casistiche prese in esame. (4,5,6,7,8,9) (tabella 1)

Le modificazioni ischemiche che avvengono nel fondo gastrico, sede dell'anastomosi, risultanti da un alterato apporto arterioso e drenaggio venoso, sono state implicate nello sviluppo delle complicanze anastomotiche. (10,11,12,13,14,15)

Alcuni studi mirati a quantificare la vascolarizzazione gastrica hanno dimostrato una diminuita perfusione causata da una riduzione della densità capillare nella porzione prossimale del tubulo. (10,11)

Si suppone che ciò porti direttamente a un'ischemia del moncone dell'organo e, conseguentemente, alla formazione di fistole e stenosi anastomotiche.

Da vario tempo, grande attenzione è stata pertanto rivolta, dai centri ad alto volume che si occupano di tale chirurgia, ad escogitare varie strategie che consentano di minimizzare il più possibile le conseguenze di tale mutilazione del circolo gastrico.

In uno studio condotto da Urschel (16) sui ratti, la legatura in via preliminare di alcune arterie dello stomaco permetteva un aumento relativo dell'81% del flusso sanguigno dopo 14 giorni.

Successivamente, Urschel ha dimostrato una minore incidenza di fistole anastomotiche e un'augmentata tenuta qualora l'anastomosi esofagogastrica venisse completata 3 settimane dopo la devascularizzazione gastrica.

Reavis e coll. (17) hanno dimostrato, confezionando delle esofagogastroplastiche su esemplari di opossum, una marcata riduzione del flusso sanguigno a livello del fondo gastrico dopo devascolarizzazione dello stomaco e un successivo aumento dello stesso tre volte maggiore negli animali sottoposti a ricostruzione dopo un intervallo di 28 giorni, rispetto a quelli operati subito dopo la devascolarizzazione.

Gli autori hanno inoltre dimostrato un aumento dell'angiogenesi ed una diminuzione della deposizione di collagene dopo la devascolarizzazione seguita dall'intervallo temporale.

Fra gli altri, Akiyama e coll. (18) hanno osservato l'aumento del flusso sanguigno verso l'apice del tubulo gastrico in seguito all'embolizzazione preoperatoria delle arterie gastrica destra, gastrica sinistra e splenica.

I pazienti che venivano sottoposti ad una procedura di embolizzazione efficace seguita dall'esofagectomia, avevano un'incidenza di fistola anastomotica del 2%, rispetto all'8% dei pazienti che venivano sottoposti all'intervento ricostruttivo senza una precedente devascolarizzazione gastrica.

Nonostante l'apparente miglioramento della perfusione gastrica, questa metodica era peraltro associata ad alcuni effetti collaterali come dolori addominali, nausea, vomito, infarto splenico e pancreatite.

Recentemente, Hölscher e coll. (2) hanno eseguito la devascolarizzazione gastrica seguita solo 4 giorni più tardi da esofagectomia transtoracica ed hanno così dimostrato che la devascolarizzazione può essere eseguita in maniera sicura con un'incidenza di fistole anastomotiche del 6%.

In un'altra casistica è stato dimostrato che il condizionamento ischemico, eseguito 2 settimane prima dell'esofagectomia, riduceva la morbilità legata al tubulo gastrico dal 20% al 10% se confrontata con quella dei pazienti sottoposti a ricostruzione immediata (19).

Procedendo quindi in via preliminare alla devascularizzazione dello stomaco, si permetterebbe al fondo gastrico di compensare la deprivazione di flusso ematico prima del confezionamento dell'anastomosi.

La guarigione dell'anastomosi verrebbe così favorita dall'aumentata perfusione del fondo gastrico e ciò potrebbe abbattere la morbilità associata all'intervento di esofagectomia.

Per completare il quadro delle possibili complicanze legate agli interventi di esofagectomia, non si può poi prescindere dal citare le stenosi anastomotiche, coi relativi fattori di rischio.

Sebbene alcuni autori abbiano riportato l'implicazione da una parte dell'ischemia dell'interponato e dall'altra delle fistole anastomotiche nel successivo sviluppo di una stenosi, (20,21,22,23,24,25,26) la correlazione fra tali complicanze non è ancora stata indagata a fondo.

In base ai risultati riportati da Briel e coll. (26) su una casistica di 393 esofagectomie, si può ragionevolmente affermare che dei pazienti che abbiano presentato un'ischemia con manifestazioni cliniche, un terzo guarirà senza complicanze, un terzo svilupperà una stenosi senza fistola e un terzo, presenterà una fistola anastomotica, con solo la metà di questi ultimi che soffrirà di una complicanza stenotica.

Conseguentemente, la somma di una complicanza ischemica e di una fistolosa, dà esito con un'alta probabilità, ad una stenosi.

Dei pazienti che presentino una fistola senza ischemia associata, la metà circa svilupperà una stenosi, mentre la restante metà guarirà senza complicanze.

In aggiunta, l'aumento ponderale del paziente è associato ad un'aumentata incidenza di stenosi; curiosamente, il peso non è un fattore di rischio per l'ischemia del tubulo e le fistole anastomotiche.

Il grasso in eccesso presente sullo stomaco dei pazienti più pesanti, potrebbe portare ad una compressione del tubulo da parte delle strutture presenti in spazi limitati come il mediastino posteriore e lo stretto toracico superiore.

Ciò potrebbe dar luogo ad un deficit di vascolarizzazione segmentario e quindi alla stenosi.

In aggiunta a ciò, la conformazione anatomica dei pazienti più pesanti, potrebbe contribuire a difficoltà tecniche nell'esecuzione dell'anastomosi che portano alla stenosi.

La tecnica di ricostruzione esofagea mediante esofagogastroplastica, sebbene pressoché universalmente accettata, porta quindi con sé un'alta morbilità postoperatoria, con la comparsa di una fistola anastomotica in una percentuale di casi che arriva in varie casistiche al 20% (27,28,29,30,31,32,33).

I fattori di rischio per l'insorgenza di fistole anastomotiche sono le condizioni in grado di compromettere i processi di guarigione dei tessuti, prime fra tutte la stessa ischemia dell'interponato, una pregressa terapia neoadiuvante e le patologie ad essa associate.

TABELLA 1 .

	n	fistole	STOMACO		COLON	
			Cervicali	Toraciche	Cervicali	Toraciche
Escofet 2010	240	20 (8,3%)	5/93 (5,4%)	15/147 (10,4%)		
Briel 2004	393	43 (10,9%)	33/230 (14,3%)		10/163 (6,1%)	
Griffin 2001	291	19 (6,5%)		19/291 (6,5%)		
Orringer 1999	1085	146 (13%)	146/1085 (13%)			

Nella tabella 1 è riportata l'incidenza di fistole anastomotiche in alcune delle casistiche più numerose, ripartita fra viscere utilizzato e sede dell'anastomosi. (26,27,34,35)

Nella Nostra esperienza la fistola anastomotica e l'ischemia del tubulo sono state la complicanza post operatoria di 23 pazienti sui 144 sottoposti ad esofagectomia (16%).

La sopravvivenza spesso dipende da un repentino riconoscimento della complicanza e dal suo trattamento definitivo.

Le fistole cliniche, solitamente, si manifestano entro 10 giorni dall'intervento e sono responsabili del 25-50% dei decessi legati alla chirurgia.

Per tale motivo, molti chirurghi eseguono routinariamente un esame radiologico con contrasto idrosolubile per os attorno alla 5°-7° giornata post-operatoria o più precocemente in caso di sospetto clinico.

Tale esame tuttavia è dotato di una ridotta sensibilità e specificità, non riuscendo spesso ad identificare fistole manifeste clinicamente e mostrando talora immagini di pseudo-spandimenti dovuti a particolarità morfologiche della regione anastomotica, che vengono facilmente confusi con fistole. (36,37)

Per tale motivo, molti sostengono ormai da tempo che l'esecuzione routinaria della radiografia con contrasto per os debba essere abbandonata. (34,38,39,40)

Lavori più recenti hanno dimostrato piuttosto la superiorità della TC con contrasto per os nella diagnosi della complicanza anastomotica. (41,42)

I risultati di tali studi indicherebbero che la metodica ha un elevato valore predittivo negativo, anche se la specificità rimane non elevata. Inoltre non vi sono dati che indichino la sua utilità nella diagnosi dell'ischemia del viscere trasposto.

Fra i primi a confrontare l'efficacia degli esami radiologici con mezzo di contrasto per os con quella dell'endoscopia flessibile, Griffin e coll. (34) hanno mostrato come quest'ultima sia più accurata nello studio delle fistole post-esofagectomia, in particolare qualora il problema all'origine della complicanza sia un'ischemia/necrosi dello stomaco trasposto.

Più di recente, altri dati provenienti da ampie casistiche analizzate retrospettivamente, hanno contribuito a rinforzare tale evidenza, confermando anche la sicurezza di un'endoscopia eseguita precocemente nel postoperatorio. (3,43)

Spesso deiscenze anastomotiche compaiono dopo l'esecuzione di un esame con mezzo di contrasto per os risultato negativo, quando la progressione dell'ischemia determina la deiscenza dell'anastomosi. L'endoscopia, eseguita da un operatore esperto con insufflazione di una minima quantità d'aria e sotto sedazione, risulterebbe perciò utile in quei malati critici che non possono essere sottoposti ad esami radiologici o in quelli in cui si pone il sospetto clinico di una fistola non confermata dalla radiologia.

Uno studio condotto da Werner et al. ha dimostrato che un controllo postoperatorio precoce, mediante endoscopia, dell'interponato è realizzabile con basso rischio in tutti i pazienti: l'endoscopia si è dimostrata superiore rispetto al controllo radiologico nella rilevazione di reperti patologici a livello della ricostruzione esofagea. (12)

L'endoscopia sembra quindi essere lo strumento diagnostico potenzialmente più efficace nella diagnosi della complicanza ischemica e anastomotica del tubulo gastrico a seguito di un intervento di esofagectomia.

Esperienze preliminari, anche presso il Nostro Centro, hanno dimostrato che la metodica endoscopica ha la più alta accuratezza diagnostica nella diagnosi di queste complicanze e non sono stati registrati eventi avversi significativi correlati a tale procedura.

L'endoscopia consente inoltre il prelievo biotico della mucosa dell'interponato gastrico e quindi uno studio istologico mirato alla valutazione del grado di perfusione/ischemia del tubulo stesso.

L'ischemia acuta e cronica del tratto gastroenterico più frequentemente si verifica a carico dei tratti inferiori del tubo digerente, dunque sono meno indagati in letteratura i meccanismi

fisiopatologici che regolano l'ischemia a livello gastrico ed esofageo e le lesioni istologiche ad essa correlate.

Tuttavia, le lesioni istologiche elementari dovute a diminuzione del fabbisogno di ossigeno classicamente descritte per l'intestino, dovrebbero potersi riscontrare in maniera sovrapponibile anche nello stomaco (e nello stomaco tubulizzato), che in quanto organo cavo, si suppone sia soggetto a meccanismi fisiopatologici analoghi, se non del tutto sovrapponibili.

Da un punto di vista istologico, si ipotizza che l'ipoperfusione del fondo gastrico in seguito a tubulizzazione, si instauri mediamente con meccanismi intermedi per tipologia ed andamento temporale tra quelli caratteristicamente descritti nel tratto gastroenterico inferiore per l'ischemia acuta (stop improvviso al flusso sanguigno) e quelli descritti per l'ischemia cronica (riduzione cronica graduale del flusso sanguigno), ovvero una riduzione del flusso (non uno stop), ma in tempi piuttosto rapidi.

Dovrebbero pertanto potersi riscontrare nel viscere ed in particolare a carico della tonaca mucosa (oggetto dell'osservazione su prelievo biptico), lesioni istologiche precoci e lesioni istologiche tardive da danno ischemico; si può supporre inoltre, che queste siano diversamente correlate all'entità e alla diminuzione del flusso sanguigno e quindi, in qualche modo, espressione della "gravità" del difetto di vascolarizzazione.

La letteratura in merito alla vascolarizzazione del tubulo gastrico, fa riferimento essenzialmente a studi sul sistema macrovascolare, seppur esistano accurati studi delle modificazioni del sistema microvascolare del tubulo dopo devascularizzazione, condotti su modelli animali (17).

Il lavoro in questione ha indagato gli effetti ritardati della devascularizzazione gastrica condotta su alcuni esemplari di opossum, sia sul macrocircolo (tramite laser-flussimetria

Doppler), sia su modificazioni istologiche microscopiche come densità del collagene, preservazione delle tonache muscolare propria e muscularis mucosae, e infine numero di capillari sanguigni a livello dell'anastomosi.

Al fine di raccogliere informazioni che potessero essere utili nella comprensione delle modificazioni istologiche che avvengono a livello del tubulo gastrico nel postoperatorio e quindi valutare il "grado di vascolarizzazione" della tonaca mucosa e il suo trofismo è stato condotto, nel Nostro Centro, uno studio, in collaborazione con gli endoscopisti e gli anatomici patologi.

Esso prevedeva il confronto tra i 2 prelievi biotici eseguiti preoperatoriamente a random sul tubulo gastrico e le biopsie eseguite in occasione di endoscopie tra la III e V e quindi tra la VII e IX giornata postoperatoria.

Sono stati studiati vetrini alla ricerca di parametri indicativi di danno da sofferenza ischemica della mucosa del tubulo come la presenza di edema, emorragie, trombi, erosioni, ulcerazioni, flogosi lamina propria, attività, aspetti rigenerativi, fibrosi, presenza di siderofagi.

È stato quindi calcolato uno score ottenuto dalle evidenze microscopiche associato ai rilievi endoscopici macroscopici del trofismo della mucosa del tubulo gastrico e dello stato dell'anastomosi.

I risultati ottenuti, sembrerebbero indicare un'effettiva validità dell'esame istologico della mucosa del tubulo, nel rilevare quelle modificazioni dapprima in senso ischemico e poi neoangiogenetico della parete del fondo gastrico che seguono la sua devascularizzazione, seppur non raggiungendo una validità statistica per l'esiguità del campione.

La linea tracciata da questo studio ha ulteriormente contribuito ad intensificare gli sforzi per sviluppare nuove tecniche allo scopo di proteggere dall'ischemia il tubulo e prevenire la

formazione di fistole anastomotiche, ottenendo un impatto significativo sulla mortalità e morbilità dell'esofagectomia e rimanendo un campo ancora aperto a future investigazioni.

Dalla scoperta del meccanismo che conduce a un aumento della sofferenza su base vascolare dell'anastomosi, molti sforzi sono stati compiuti per favorire una maggior perfusione del tubulo gastrico in seguito all'intervento demolitivo.

L'embolizzazione pre operatoria dei vasi gastrici di sinistra in preparazione ad una esofagectomia è stato dimostrato stimolare l'afflusso di sangue da parte dei vasi collaterali al tubulo gastrico e potrebbe ridurre la frequenza delle deiscenze anastomotiche conseguenti al suddetto intervento. (18)

L'esperienza di Miyazaki et al ha mostrato che la somministrazione parenterale di Prostaglandina E1 nel periodo perioperatorio non era abbastanza efficace nella prevenzione dell'insufficienza anastomotica.

Precedenti studi clinici hanno dimostrato che un indebolito microcircolo dell'interponato si verifica nella maggioranza dei casi entro la quinta giornata post operatoria. (2,3,16)

I dati ricavati dallo studio istopatologico della vascolarizzazione del tubulo nel periodo peri-operatorio eseguito nel Nostro Centro, sono stati utilizzati come punto di riferimento per indagare l'effetto di eventuali farmaci con provato potere neoangiogenetico nel migliorare il trofismo del fondo gastrico e quindi la guarigione dell'anastomosi.

L'eritropoietina (EPO) è un ormone glicoproteico a basso peso molecolare (circa 30 kDa) prodotto dal fegato fetale e, nel periodo extrauterino, dal rene e si localizza nella frazione plasmatica delle alfa-globuline. È codificata dal gene ipossia-relato più studiato e la sua regolazione avviene principalmente a livello dell'mRNA tramite un fattore indotto dall'ipossia (HIF-1).

L'azione dell'EPO si esplica principalmente a livello del midollo osseo aumentando la produzione di globuli rossi, legandosi al suo recettore specifico (Epo-R), un membro della superfamiglia dei recettori delle citochine. Tali recettori sono ampiamente distribuiti nel sistema cardiovascolare, incluso l'endotelio, il muscolo liscio, il miocardio e altri tipi di cellule come quelle del mesangio o i neuroni. Sono inoltre in continua scoperta gli effetti non ematopoietici; per esempio, l'Epo aumenta il numero di progenitori cellulari funzionalmente attivi, quindi aumenta la neoangiogenesi, processo con cui si sviluppano nuovi vasi da quelli preesistenti.

La relazione che lega le cellule ematopoietiche a quelle endoteliali è stata valutata come indice della duplice azione del progenitore comune, l'emangioblasto, nella formazione di vasi sia nel sacco vitellino, iniziale sito dell'emopoiesi, sia nel mammifero adulto.

Un meccanismo proposto per spiegare la stimolazione della neoangiogenesi tissutale propone che l'Epo stimoli la mobilizzazione delle cellule progenitrici ematopoietiche nel circolo.

L'Epo porterebbe alla regolazione della cicatrizzazione fisiologica, associata ad un incremento della neoangiogenesi e del contenuto di VEGF e di collagene nella ferita. Infatti l'Epo interagisce con il VEGF e stimola la motilità e le mitosi delle cellule endoteliali.

Uno studio di Jaquet et al ha dimostrato che l'Eritropoietina Ricombinante Umana (rHuEpo) stimola la crescita dei capillari in un campione di angiogenesi in vitro e rivela lo stesso potenziale angiogenico del VEGF nelle cellule endoteliali.

Sayan et al hanno dimostrato che il trattamento con rHuEpo in topi da laboratorio è efficace nel migliorare la guarigione delle ferite grazie all'inibizione della perossidasi lipidica, al deposito di collagene e all'espressione di VEGF.

Alcuni autori hanno dimostrato che gli effetti dell'Epo sulla protezione del tessuto e nella prevenzione della necrosi sono direttamente dipendenti all'attivazione della Ossido Nitrico-Sintetasi endoteliale (e NOS).

L'Ossido Nitrico è un potente vasodilatatore prodotto nelle cellule endoteliali a partire dalla L-arginina ad opera della eNOS costitutivamente espressa. È stato riconosciuto come una biodisponibilità ridotta di NO sia uno dei principali meccanismi responsabili dell'inizio e della progressione della disfunzione nella malattia vascolare.

Gli autori hanno dimostrato che il trattamento preventivo con Epo, aumenti gli effetti della NOS inducibile e della eNOS nei tessuti criticamente perfusi. Quindi, l'Epo aumenta la sopravvivenza del tessuto mediante la dilatazione arteriolare NO-mediata, la protezione della perfusione capillare e la neoangiogenesi indotta da VEGF.

Gli effetti dell'Epo sulla cicatrizzazione dell'anastomosi colica è stata studiata con studi sperimentali portando a risultati discordanti.

È stato osservato un aumento della cicatrizzazione mediante l'aumento del numero di fibroblasti e l'accelerazione della maturazione di nuovi vasi in esperienze effettuate da Fatouros et al, mentre solo una prevenzione degli effetti negativi dell'ostruzione nella cicatrizzazione nell'esperienza condotta da Mora et al.

Inoltre, è stato dimostrato come l'Epo abbia un effetto neuroprotettivo nei confronti dell'ischemia in cellule in coltura e in modelli animali.

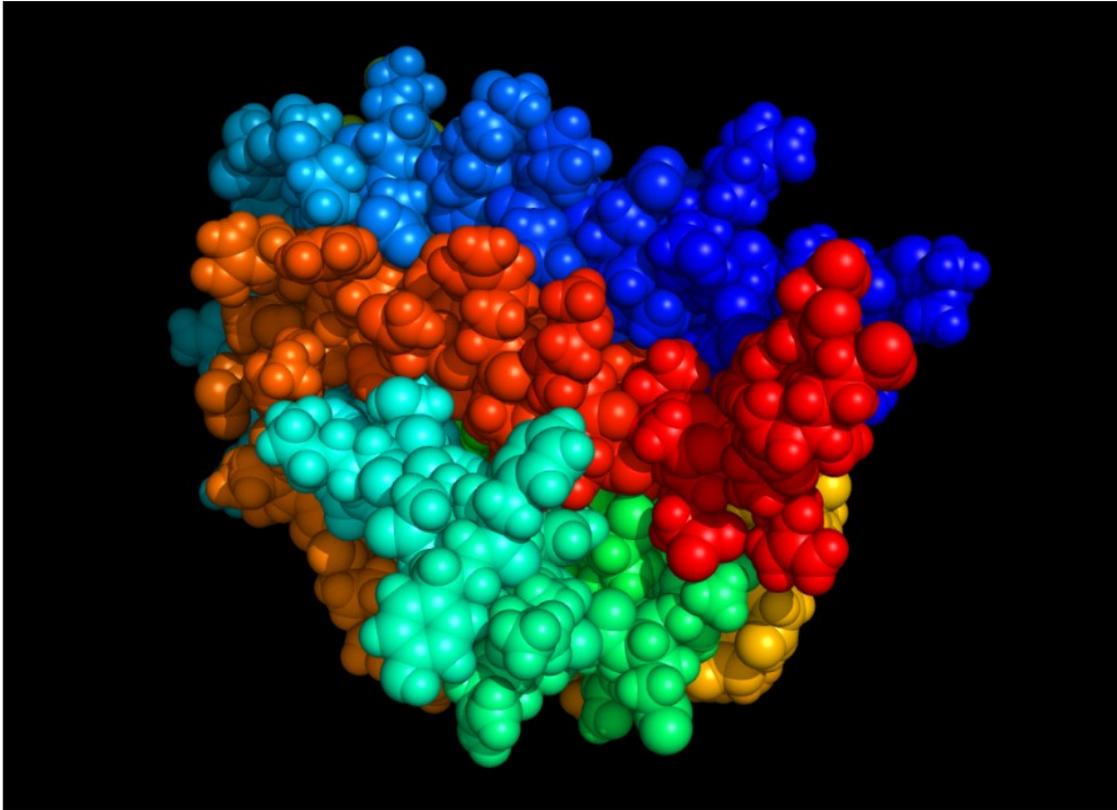


FIG 1: ricostruzione tridimensionale della macromolecola di Eritropoietina

## RAZIONALE

L'eritropoietina è in primo luogo uno stimolatore dell'eritropoiesi. E' stato tuttavia dimostrato che possiede la capacità di modulare le risposte delle cellule ospiti così da attivare molte altre funzioni extra-emopoietiche, fra le quali quella neoangiogenetica.

La neoangiogenesi costituisce un processo assai articolato, che coinvolge diversi tipi di cellule e di mediatori che interagiscono per creare un microambiente specifico, adatto alla formazione di nuovi vasi.

Il potenziale ruolo dell'EPO nella neoangiogenesi può essere considerato un presupposto per il suo possibile utilizzo nel migliorare l'ossigenazione dei tessuti in generale. Inoltre, l'interazione fra EPO, VEGF e NO-S può essere di particolare importanza nella rivascolarizzazione e cicatrizzazione delle ferite.

Il miglioramento dell'ossigenazione tissutale, della rivascolarizzazione, della cicatrizzazione e della neoangiogenesi sono tutti elementi che possono rappresentare un razionale per pre-trattare con EPO quei pazienti affetti da carcinoma dell'esofago e del cardias che siano candidati ad un intervento di esofagectomia: in questi pazienti il "precondizionamento" con EPO potrebbe giocare un ruolo nel diminuire l'incidenza della formazione di fistole anastomotiche e quella di ischemia del viscere utilizzato come sostituto dell'esofago.

# MATERIALI E METODI

## **Obiettivo primario**

Questo studio è stato progettato per:

- Stabilire se l'Epo sia in grado di ridurre il rischio di sviluppare una fistola e l'ischemia del tubulo dopo esofagectomia nei pazienti trattati rispetto al gruppo dei controlli

## **Obiettivo secondario**

Valutazione dei seguenti dati:

- Complicanze intra-operatorie
- Complicanze post-operatorie
- Necessità di un re intervento
- Durata della degenza

### **Criteri di inclusione**

- Carcinoma primitivo dell'esofago
- Carcinoma primitivo del cardias
- Tumore non metastatico
- Età compresa tra 18-80 anni

### **Criteri di esclusione**

- Tumore metastatico
- Presenza di altri tumori primitivi
- Casi di urgenza o emergenza chirurgica
- Pazienti HIV positivi
- Pazienti con disturbi psichiatrici
- Pazienti con patologie connettivali

## **Popolazione**

I Pazienti affetti da un carcinoma dell'esofago o dello stomaco a sede cardiale, candidabili ad un intervento di esofagectomia ed esofagogastroplastica (interposizione del tubulo gastrico) sono arruolabili nello studio; il gruppo dei pazienti trattati con Eritropoietina verrà confrontato con un gruppo controllo di pazienti non trattati con la suddetta molecola.

## **Tecnica chirurgica**

I pazienti di entrambe i gruppi arruolati nello studio verranno sottoposti ad un intervento chirurgico di esofagectomia transjatale e transtoracica e ricostruzione con esofagogastroplastica, sia con un approccio videolaparoscopico che mediante chirurgia laparotomia

## **Modalità di somministrazione**

L'Eritropoietina verrà somministrata in tre dosi uguali:

- Prima dose trenta minuti prima dell'intervento chirurgico
- Seconda dose durante l'intervento
- Terza dose in prima giornata post operatoria

## PROPOSTA DI PROTOCOLLO

### **Studio di fase prima**

I pazienti affetti da un carcinoma dell'esofago e del cardias candidabili a esofagectomia con esofagogastroplastica, verranno suddivisi in tre bracci:

- Primo braccio: tre pazienti consecutivi trattati somministrando 2000 unità di EPO x 3 (2000 U trenta minuti prima dell'intervento chirurgico, 2000 U durante l'intervento chirurgico e 2000 U in prima giornata post operatoria).

Durante l'intervento chirurgico e la prima settimana post operatoria verranno valutati I seguenti parametri:

- Perdite ematiche intraoperatorie ed eventuali modificazioni dell'ematocrito e dell'emoglobina agli esami ematici
- Monitoraggio giornaliero degli esami ematici ed in particolare dell'emocromo

Il criterio di tossicità del farmaco che imponga la sospensione della sua somministrazione viene stabilito in base all'aumento dei valori dell'ematocrito e dell'emoglobina agli esami ematici seriati. Questa dose costituirà la dose limite di tossicità (DLT).

Qualora non vi fossero delle modificazioni dell'ematocrito ai controlli ematici si costituirà:



- Secondo braccio: tre pazienti consecutivi trattati somministrando 3000 unità di EPO x 3 (3000 U trenta minuti prima dell'intervento chirurgico, 3000 U durante l'intervento chirurgico e 3000 U in prima giornata post operatoria).

Durante l'intervento chirurgico e la prima settimana post operatoria verranno valutati i seguenti parametri:

- Perdite ematiche intraoperatorie ed eventuali modificazioni dell'ematocrito e dell'emoglobina agli esami ematici
- Monitoraggio giornaliero degli esami ematici ed in particolare dell'emocromo

Qualora non vi fossero delle modificazioni dell'ematocrito ai controlli ematici si costituirà:



- Terzo braccio: tre pazienti consecutivi trattati somministrando 5000 unità di EPO x 3 (5000 U trenta minuti prima dell'intervento chirurgico, 5000 U durante l'intervento chirurgico e 5000 U in prima giornata post operatoria).

Durante l'intervento chirurgico e la prima settimana post operatoria verranno valutati i seguenti parametri:

- Perdite ematiche intraoperatorie e le eventuali modificazioni dell'ematocrito e dell'emoglobina agli esami ematici
- Monitoraggio giornaliero degli esami ematici ed in particolare dell'emocromo

Qualora non vi fossero delle modificazioni dell'ematocrito ai controlli ematici, la dose di EPO pari a 5000 Unità ripetute in tre somministrazioni verrà considerata la massima dose tollerata (MTD) e costituirà la dose da somministrare nello studio di fase seconda.

### **Studio di fase seconda**

Se lo studio di fase prima ha fornito dei risultati positivi, verrà somministrata ad ottantotto pazienti consecutivi una dose di eritropoietina pari a 5000 Unità ripetute per tre somministrazioni.

Durante l'intervento chirurgico e la prima settimana post operatoria verranno valutati I seguenti parametri:

- Perdite ematiche intraoperatorie e le eventuali modificazioni dell'ematocrito e dell'emoglobina agli esami ematici
- Monitoraggio giornaliero degli esami ematici ed in particolare dell'emocromo

## **Diagnosi di fistola e di ischemia**

Tutti i pazienti arruolati nello studio verranno sottoposti due volte, nella prima settimana post operatoria, ad un esame endoscopico con strumento flessibile, per valutare l'eventuale presenza di una fistola e/o di un quadro macroscopico di ischemia del tubulo gastrico.

In aggiunta, una radiografia tubo digerente con gastrographin assunto per os, verrà eseguita in quinta giornata post operatoria.

La presenza di un leak in sede anastomotica o di una fistola vengono definite dalla dimostrazione endoscopica di una soluzione di continuo dell'anastomosi, dalla presenza di aria nel sacchetto di raccolta del drenaggio cervicale o dalla palpazione di un enfisema sottocutaneo a livello del collo o del terzo superiore del torace al termine della procedura.

L'ischemia del tubulo gastrico viene diagnosticata endoscopicamente dall'evidenza di una mucosa di colore grigio, blu o nero, uno strato di mucosa di colore verde o argento che non viene rimosso al lavaggio endoscopico, o un tratto di mucosa chiaramente demarcata con una ulcerazione.

La necrosi del tubulo viene definita come la presenza di una mucosa grigiastra o di colore giallo-marrone, all'apparenza quasi liquefatta.

## **Rilievi anatomo patologici**

Determinazione e quantificazione del fenomeno di neoangiogenesi:

- valutazione semiquantitativa dei capillari presenti per area di mucosa e studio mediante immunistochemica dei capillari neoformati.

- Determinazione di uno score istologico basato sulla identificazione nei preparati istologici, di parametri indicativi di danno da sofferenza ischemica della mucosa del tubulo, come edema, emorragie, trombi, erosioni, ulcerazioni, flogosi della lamina propria, attività, aspetti rigenerativi, fibrosi, presenza di siderofagi, a cui verrà attribuito un punteggio.

### **Dosaggio plasmatico di VEGF (vascular endothelial growth factor)**

Il Plasma viene raccolto e conservato ad una temperatura di -20°C prima di essere analizzato per determinare il livello di VEGF.

La stima del VEGF plasmatico pre e post operatorio, viene effettuata mediante il test ELISA.

## ANALISI STATISTICHE

### **Determinazione del campione**

Questo protocollo propone uno studio open-label, di fase seconda, multicentrico, a singolo braccio.

Lo scopo primario, dal punto di vista statistico, è la determinazione della percentuale di eventuali fistole che verranno diagnosticate dopo il trattamento chirurgico

Verrà utilizzato un “Fleming single stage design” applicato alla percentuale binomiale (27).

Verrà considerato un campione di 78 pazienti ed un valore critico di 4 fistole, con una potenza di studio del 90% e un rischio di fistola maggiore o uguale al 10%; se si verificasse una percentuale maggiore o uguale al 3% verrà utilizzato un one-side significance level del 10%.

## **Considerazioni statistiche**

Tutti i pazienti che verranno inclusi nello studio e riceveranno il trattamento, saranno considerati come gruppo trattato, “the intention to treat (ITT) population”. La popolazione in analisi per i risultati di tutte le variabili sarà la “ ITT population”.

Le statistiche descrittive saranno fornite per tutte le caratteristiche di base.

L’ “endpoint” discreto primario e secondario verrà determinato in base alla percentuale e al relativo intervallo di confidenza, mentre le variabili di continuo, come la degenza ospedaliera, verrà stabilita mediante l’utilizzo di mediane e range.

Per quanto riguarda la verifica delle complicanze, gli AEs (adverse events) and SAEs (serious adverse events) saranno raccolti rilevando i numeri e le percentuali di pazienti in cui si è verificato un AE (o SAE) o mediante l’utilizzo della mediana e del range, se appropriato.

Il resto dei dati e delle informazioni raccolte verranno inclusi e catalogati, se appropriate.

## **Periodo di reclutamento e durata dello studio**

Lo studio è multicentrico, la cui durata è stimata di un anno; lo studio verrà protratto per 3 mesi dal reclutamento dell’ultimo paziente.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Nguyen NT, Longoria M, Sabio A, Chalifoux S, Lee J, Chang K, Wilson SE. Preoperative laparoscopic ligation of the left gastric vessels in preparation for esophagectomy. *Ann Thor Surg* 2006; 81: 2318-2320.
2. Hölscher AH, Schneider PM, Gutschow C, Schröder W. Laparoscopic ischemic conditioning of the stomach for esophageal replacement. *Ann Surg* 2007; 245: 241-246
3. Maish MS, DeMeester SR, Choustoulakis E, Briel JW, Hagen JA, Peters JH, Lipham JC, Bremner CG, DeMeester TR. The safety and usefulness of endoscopy for evaluation of the graft and anastomosis early after esophagectomy and reconstruction. *Surg Endosc* 2005; 19: 1093-1102
4. Bruce J, Krukowski ZH, Al-Khairiy G, Russell EM, Park KGM. Systematic review of the definition and measurement of anastomotic leak after gastrointestinal surgery. *Br J Surg* 2001; 88(8):1122–6
5. Urschel JD . Esophagogastronomy anastomotic leaks complicating esophagectomy: A review. *Am J Surg*; 1995 169:634–40
6. Bardini R, Asolati M, Ruol A, Bonavina L, Baseggio S, Peracchia A . Anastomosis. *World J Surg*. 1994;18:373–8
7. Paterson IM, Wong J. Anastomotic leakage: an avoidable complication of Lewis–Tanner oesophagectomy. *Br J Surg*. 1989; 76:127–129
8. Machens A, Busch C, Bause H, Izbicki JR. Gastric tonometry and drain amylase analysis in the detection of cervical oesophogastric leakage. *Br J Surg*. 1996 ; 83:1614–15

9. Obertop H, Bosscha K, De Graaf PW. Mediastinitis from anastomotic disruption after esophageal resection and reconstruction for cancer: results of salvage surgery. *Dis Esophagus*. 1994; 7:184–7
10. Liebermann-Meffert DMI, Meier R, Siewert JR. Vascular anatomy of the gastric tube used for esophageal reconstruction. *Ann Thorac Surg*. 1992; 54:1110–1115.
11. Pierie JP, De Graaf PW, Poen H, et al. Impaired healing of cervical esophagogastrostomies can be predicted by estimation of gastric serosal blood perfusion by laser Doppler flowmetry. *Eur J Surg* 1994. 160:599–603.
12. Urschel JD. Esophagogastrotomy anastomotic leaks complicating esophagectomy: a review *Am J Surg*. 1995; 169:634–640.
13. Boyle NH, Pearce A, Hunter D, et al. Scanning laser Doppler flowmetry and intraluminal recirculating gas tonometry in the assessment of gastric and jejunal perfusion during oesophageal resection. *Br J Surg* 1998 ; 85:1407–1411.
14. Schroder W, Stippel D, Lacher M, et al. Intraoperative changes of mucosal pCO<sub>2</sub> during gastric tube formation. *Langenbecks Arch Surg*. 2001 ; 386:324–327.
15. Schroder W, Beckurts KTE, Stähler D, et al. Microcirculatory changes associated with gastric tube formation in the pig. *Eur Surg Res*. 2002 ; 34:411–417.
16. Urschel JD. Esophagogastric anastomotic leaks: the importance of gastric ischemia and therapeutic applications of gastric conditioning. *J Invest Surg*. 1998 ;11:245–250.
17. Reavis KM, Chang EY, Hunter JG, Jobe BA. Utilization of the delay phenomenon improves blood flow and reduces collagen deposition in esophagogastric anastomoses. *Ann Surg*. 2005; 241:736–745.
18. Akiyama S, Ito S, Sekiguchi H, et al. Preoperative embolization of gastric arteries for esophageal cancer. *Surgery*. 1996; 120:542–546.
19. Berrisford RG, Veeramootoo D, Parameswaran R, et al. Laparoscopic ischaemic conditioning of the stomach may reduce gastric-conduit morbidity following total minimally invasive esophagectomy. *Eur J Cardiothorac Surg* 2009 ; 36:888–893.

20. Parkin DM, Laara E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancer in 1980. *Int J Cancer* 1988; 41: 184
21. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991; 265: 1287
22. Rizk MP, Bach PB, Schrag D, Bains MS, Turnbull AD, Karpeh M, et al. The impact of complications on outcome after resection for esophageal and gastroesophageal junction carcinoma. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 42-50
23. Cassivi SD. Lraks, strictures, and necrosis: a review of anastomotic complications following esophagectomy. *Sem Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 16: 124-132
24. Pickleman J, Warson W, Cunningham J, Fisher SG, Gamelli R. The failed gastrointestinal anastomosis: an inevitable catastrophe. *J Am Coll Surg* 1999; 188: 473-482
25. Akiyama S, Kodera Y, Sekiguchi H, et al. Preoperative embolization therapy for esophageal operation. *J Surg Oncol* 1998; 69: 219-223
26. Briel JW, Tamhankar AP, Hagen JA, et al. Prevalence and risk factors for ischemia, leak, and stricture of esophageal anastomosis: gastric pull-up versus colon interposition. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 536-542
27. Orringer MB, Marshall B, Jannetoni MD. Transhiatal esophagectomy: clinical experience and refinements. *Ann Surg.* 1999 ; 230:392–403.
28. Ando N, Ozawa S, Kitagawa Y, et al. Improvement in the results of surgical treatment of advanced squamous cell esophageal carcinoma during 15 consecutive years. *Ann Surg.* 2000; 232:225–230.
29. Siewert JR, Stein HJ, Feith M, et al. Histologic tumor type is an independent prognostic parameter in esophageal cancer: lessons from more than 1,000 consecutive resections at a single center in the western world. *Ann Surg.* 2001; 234:360–369.
30. Holscher AH, Schroder W, Bollschweiler E, et al; How safe is high intrathoracic esophagogastrostomy? *Chirurg.* 2003 ; 74:726–733.

31. McCulloch P, Ward J, Tekkis PP. Mortality and morbidity in gastrooesophageal cancer surgery: initial results of ASCOT multicenter prospective cohort study. *BMJ* 2003 ; 327:1192–1197.
32. Rentz J, Bull D, Harpole D, et al. Transthoracic versus transhiatal esophagectomy: a prospective study of 945 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:1114–1120.
33. Valverde A, Hay JM, Fingerhut A, et al. Manual versus mechanical esophagogastric anastomosis after resection for carcinoma: a controlled trial. *Surgery*. 1996; 40 120:476–483
34. Griffin SM, Lamb PJ, Dresner SM, Richardson DL, Hayes N. Diagnosis and management of a mediastinal leak following radical oesophagectomy. *Br J Surg* 2001; 88:1346–1351
35. Escofet X, Manjunath A, Twine C, Havard TJ, Clark GW, Lewis WG. Prevalence and outcome of esophagogastric anastomotic leak after esophagectomy in a UK regional cancer network. *Dis Esoph*. 2010; 23:112-116
36. Sauvanet A, Baltar J, Le Mee J, Belghiti J. Diagnosis and conservative management of intrathoracic leakage after oesophagectomy. *Br J Surg*. 1998; 85:1446–9
37. Vigneswaran WT, Trastek VF, Pairoleo PC, Deschamps C, Daly RC, Allen MS. Transhiatal esophagectomy for carcinoma of the esophagus. *Ann Thorac Surg*. 1993; 56:838–46
38. Wong J, Cheung H, Lui R, Fan YW, Smith A, Siu KF. Esophagogastric anastomosis performed with a stapler: the occurrence of leakage and stricture. *Surgery*. 1987; 101:408–15
39. Goel AK, Sinha S, Chattopadhyay TK. Role of gastrograffin study in the assessment of anastomotic leaks from cervical oesophagogastric anastomosis. *Aust NZ J Surg*. 1995; 65:8–10
40. Lamb PJ, Griffin SM, Chandrashekar MV, Richardson DL, Karat D, Hayes N. Prospective study of routine contrast radiology after total gastrectomy. *Br J Surg*. 2004; 91(8):1015–9

41. Hogan BA, Winter D, Broe D, et al. Prospective trial comparing contrast swallow, computed tomography and endoscopy to identify anastomotic leak following oesophagogastric surgery. *Surg Endosc.*2008;22:767–771.
42. Strauss C, Mal F, Perniceni T, Bouzar N, Lenoir S, Gayet B, Palau R. Computed Tomography Versus Water-Soluble Contrast Swallow in the Detection of Intrathoracic Anastomotic Leak Complicating Esophagogastrectomy (Ivor Lewis). *Ann Surg.*2010; 251: 647-651.
43. Oezcelik A, Banki F, Ayazi S, Abate E, Zehetner J, Sohn HJ, Hagen JA, DeMeester SR, Lipham JC, Palmer SL, DeMeester TR. Detection of gastric conduit ischemia or anastomotic breakdown after cervical esophagogastrostomy: the use of computer tomography scan versus early endoscopy. *Surg Endosc.* 2010; 24:1948–1951.