



*Università degli Studi di
Firenze*

FACOLTÁ DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO DI RICERCA
XVII CICLO**

**“ONCOLOGIA E TERAPIA ONCOLOGICA
NEL DISTRETTO TESTA-COLLO”**

Coordinatore Prof. Lucio Rucci

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE
OTO-NEURO-OFTALMOLOGICHE
SEZIONE DI OCULISTICA**

Tesi di Dottorato:

**IMPIEGO DELLA FOTODIAGNOSTICA CON
ACIDO δ -5 AMINOLEVULINICO (ALA) NELLA
DEFINIZIONE DEI MARGINI TUMORALI
PALPEBRALI**

Relatore

Ch.mo Prof. Ugo Menchini

Dottorando

Dott. Francesca Ucci

Anno Accademico 2003-2004

INDICE

Introduzione	pag. 2
Obiettivi	pag. 3
Materiali e Metodi	pag. 4
Risultati	pag. 7
Considerazioni	pag. 9
- <i>Acido δ 5-Aminolevulinico</i>	
- <i>Principi fisici della fluorescenza</i>	
- <i>Lunghezza d'onda d'eccitazione</i>	
- <i>Sorgenti luminose per l'eccitazione della fluorescenza con PpIX</i>	
- <i>Acquisizione di immagini e quantificazione della fluorescenza</i>	
- <i>La diagnosi di fluorescenza nella determinazione dei margini di neoplasia</i>	
Conclusioni	pag. 20
Iconografia	pag. 26
Bibliografia	pag. 40

INTRODUZIONE

Il carcinoma a cellule basali è il tumore più comune della regione perioculare, e rappresenta, in alcuni Paesi, Australia e Stati Uniti, il 90% di tutti i tumori maligni palpebrali^{1,2}. Le metastasi del carcinoma basocellulare sono rare, l'invasione locale, invece, può causare una significativa e severa morbidità³⁻⁵. L'asportazione chirurgica è attualmente il trattamento tumorale d'elezione per ottenere la guarigione⁶. La radioterapia, la crioterapia, l'ablazione laser, la terapia fotodinamica e l'immunoterapia, sono provvedimenti terapeutici in grado di ottenere anch'essi apprezzabili risultati, considerati, comunque, alternativi per casi inoperabili o largamente estesi⁷⁻⁹.

Il problema dell'asportazione chirurgica, comune a tutte le lesioni tumorali, è quello di asportare completamente la lesione ed evitare le recidive. Queste sono, invece, frequenti nelle palpebre per la necessità di preservare tessuto sano necessario alla buona funzionalità palpebrale insieme ad un accettabile risultato estetico.

Per effettuare una chirurgia radicale con conservazione di tessuto sano, sono attualmente allo studio tecniche per la demarcazione dei margini tumorali. Una di queste è la diagnosi di fluorescenza (DF), basata sulla rilevazione della fluorescenza, ottenuta da una sostanza fotosensibilizzante applicata sulla lesione, quando viene illuminata da una sorgente luminosa idonea^{10,11}.

OBIETTIVI

Scopo del nostro studio è la possibile applicazione della diagnosi a fluorescenza per la valutazione dei margini tumorali degli epitelomi basocellulari delle palpebre. Questa metodica si basa sul principio che le cellule tumorali, con elevate quantità di acido δ -5-aminolevulinico, sono in grado di produrre alte dosi di protoporfirina IX¹²⁻¹⁴. Questa, eccitata da una sorgente luminosa con particolare lunghezza d'onda, emette una fluorescenza che consente di localizzare con estrema precisione la morfologia della lesione e le sue reali dimensioni¹⁵⁻¹⁸.

Il corretto mappaggio delle lesioni neoplastiche palpebrali ottiene, da una parte, la completa asportazione della massa tumorale, dall'altra il risparmio di tessuto sano peritumorale, due fattori necessari per il risultato estetico che funzionale.

MATERIALI E METODI

Sono stati arruolati in questo studio 5 pazienti (3 uomini e 2 donne) giunti alla nostra osservazione nei mesi di Novembre e Dicembre 2003 con diagnosi di neoformazione della regione palpebrale.

Le biopsie provenienti dalle le lesioni di tutti i pazienti hanno confermato la diagnosi di carcinoma a cellule basali.

I pazienti erano di età compresa tra i 43 e i 72 anni, con una media di 59.2 anni, erano in buone condizioni di salute e non assumevano farmaci per via sistemica.

Il consenso informato è stato ottenuto da ogni paziente.

Le lesioni prese in esame erano 3 forme nodulari e 2 forme nodulo-ulcerative ed erano localizzate a livello della palpebra inferiore in quattro casi e a livello del canto interno della palpebra superiore in un caso. Macroscopicamente le lesioni misuravano, rispettivamente, cm $1,4 \pm 0,1$ per $0,9 \pm 0,2$.

I pazienti sono stati ricoverati in regime di Day-Surgery presso la nostra Clinica.

Tutti i pazienti sono stati operati tra il Gennaio e il Febbraio 2004.

La mattina dell'intervento, le lesioni sono state trattate con acido δ -5-aminolevulico (ALA) localmente, per via topica, sotto forma di crema, e per iniezione intralesionale.

L'acido δ -5-aminolevulico è stato iniettato intralesionalmente, mediante siringa da insulina (circa 1 ml per cm^2 di lesione) in soluzione sterile, apirogena e tamponata all'1% (pH 3) e

successivamente è stato applicato sulla lesione, alla quantità di 50 mg di crema (metil amino-levulinato, METVIX[®], Galderma) per cm² di lesione. La crema è stata applicata uniformemente sulla lesione e sulla cute sana perilesionale per circa 2 mm.

L'area, così preparata, è stata trattata mediante tecnica occlusiva con cerotto adesivo trasparente (Tegaderm[®], 3M, UK) ed è stata coperta con un bendaggio oculare, per evitare l'esposizione a sorgenti luminose ed al sole.

Dopo tre ore si è proceduto alla illuminazione per la individuazione dei margini tumorali mediante l'utilizzo di luce UV a 405 nm allo stato solido. Le immagini sono state acquisite tramite una telecamera ad alta sensibilità con obiettivo di ripresa e filtro ottico di sbarramento, accoppiata ad un sistema di illuminazione per la luce di eccitazione (DICAM-UV, Alpha Strumenti), collegata ad un Personal Computer (PC), per acquisire e convertire in un file grafico l'immagine in fluorescenza.

Sotto la guida della luce, il chirurgo, per mezzo di una penna dermatografica, ha delimitato i margini della neoplasia.

Le lesioni così trattate sono state documentate fotograficamente, previo consenso del paziente, prima e dopo il trattamento chirurgico.

L'intervento chirurgico è stato effettuato in anestesia locale con una miscela di Carbocaina e Marcaina.

Il chirurgo ha asportato la lesione con 1 mm di margine rispetto al disegno della fluorescenza.

Successivamente all'asportazione della lesione, è stato inserito un punto di repere, mediante filo di sutura (seta 6.0), nel campione tissutale per facilitarne l'orientamento.

Il frammento è stato trasferito, entro 30 minuti dall'asportazione, presso il laboratorio del Dipartimento di Patologia Umana ed Oncologia, per lo studio dei margini con sezioni a freddo. Dopo il posizionamento su un porta campioni, sopra il quale, in precedenza, era stata posta una sostanza che accelera il congelamento (OCT), il tessuto è stato inserito nel criostato a -25° / -27°C fino al completo congelamento. Tramite microtomo congelatore sono state effettuate sezioni di tessuto di 5-6 μm . Le sezioni sono state colorate con ematossilina-eosina e il preparato è stato letto al microscopio ottico.

Il frammento cutaneo è stato fissato in formalina al 10% tamponata (pH 7) e conservato per l'esame istopatologico definitivo, in occasione del quale è stato sottoposto a misurazione centimetrica e a valutazione delle caratteristiche macroscopiche. Dopo aver orientato il frammento in base al punto di repere, si è proceduto alla marcatura dei margini di resezione con inchiostro di china e, quindi, al sezionamento ed al campionamento della lesione. Il numero dei prelievi effettuati è proporzionale alla grandezza del frammento cutaneo, sebbene nella maggior parte dei casi siano stati eseguiti tre prelievi a croce: la prima sezione è stata condotta secondo l'asse minore del lembo cutaneo, nel centro della lesione, comprendendo due margini di cute sana ai bordi della lesione, e altre due sezioni sono state condotte perpendicolarmente alla prima, in modo da visualizzare gli altri due margini di resezione. I frammenti così preparati sono stati inclusi in paraffina, e di ciascuna inclusione sono state allestite due sezioni, colorate con ematossilina-eosina, per la diagnosi istopatologica e la valutazione dello stato dei margini chirurgici.

RISULTATI

Il tessuto proveniente dai cinque pazienti, ottenuto ampliando di 1 mm l'area fluorescente ha mostrato margini liberi da malattia. L'esame istologico, eseguito con inclusione del pezzo in paraffina e colorazione con ematossilina-eosina, ha evidenziato l'assenza di malattia nella zona periferica dei frammenti.

In tutti i casi è stato eseguito anche uno studio a freddo dei margini che ha consentito una ricostruzione della palpebra senza dover attendere il risultato dell'istologia tradizionale. Ciò si è reso necessario in quanto la metodica da noi utilizzata non è ancora standardizzata.

I cinque pazienti operati non hanno presentato complicanze intra e postoperatorie.

Il primo caso, un uomo di 43 anni, con una recidiva di basalioma, è stato sottoposto ad asportazione della neoformazione a tutto spessore con ricostruzione della lamella palpebrale posteriore con un innesto libero tarso-congiuntivale e ricostruzione della lamella anteriore mediante un lembo cutaneo di rotazione della palpebra superiore a base temporale (*Fig 1,2,3,4*).

Il secondo paziente, un uomo di 47 anni, con una forma nodulare del terzo interno è stato operato con asportazione a tutto spessore e ricostruzione del difetto con lembo nasogenieno (*Fig 5,6,7,8*).

Gli ultimi tre casi, un uomo, di 67 anni, e due donne, rispettivamente di 72 e 66 anni, sono stati operati e sottoposti a ricostruzione rispettivamente con un lembo di Tenzel (*Fig 9,10,11*)

e con un lembo nasogenieno (*Fig 12,13,14,15,16,17*). Nel terzo caso non abbiamo ricostruito la zona con lembi cutanei ma abbiamo optato per un processo di guarigione per seconda intenzione (*Fig 18,19,20*).

Le visite di controllo dei pazienti effettuate a 7, 15, 60, 180 giorni dall'intervento hanno dimostrato un buon recupero funzionale ed estetico ed assenza di recidiva.

CONSIDERAZIONI

Figge, nel 1948, fu il primo a riportare l'individuazione di un tumore mediante la fluorescenza rossa delle porfirine²⁴. Tuttavia l'ematoporfirina risultò presto un sistema inadatto alla delimitazione di un tumore perché il rapporto tra emissione in fluorescenza del tumore e del tessuto sano circostante si rivelò molto basso.

Un deciso progresso si è avuto con l'introduzione della diagnosi di fluorescenza (DF) basata sull'utilizzo dell'acido δ -5-aminolevulinico (ALA), da cui il termine FDAP "*Fluorescence Diagnosis with δ -Aminolevulinic Acid-Induced Porphyrins*".

L'incidenza dei tumori cutanei è in aumento in tutto il mondo¹⁹, e la necessità di avere un metodo complementare per la visualizzazione e la demarcazione dei tumori cutanei in uno stadio iniziale è fondamentale per limitare il danno causato dalla neoplasia.

La diagnosi di fluorescenza (DF) dei tumori cutanei è basata sulla visualizzazione della fluorescenza provocata da una sostanza fotosensibilizzante.

Si riconoscono tre sottogruppi del carcinoma a cellule basali (BCC): superficiale, nodulare e morfeiforme o sclerosante. Tra questi diversi sottotipi il morfeiforme è quello più difficile da trattare²⁰. Il BCC colpisce soprattutto le aree cutanee fotoesposte, come la testa ed il collo, di soggetti con carnagione chiara^{21,22}. La possibilità di disporre di una metodica utile per delimitare le lesioni localizzate in queste sedi è di importanza fondamentale per la

successiva terapia e la DF si sta rivelando una procedura affidabile e di semplice esecuzione^{12,17,18,23}.

La tecnica permette di evidenziare, infatti, i tessuti tumorali o patologici rispetto alla cute sana circostante.

La DF consiste nella somministrazione per via topica di un cromoforo fluorescente che si accumula selettivamente a livello della lesione tumorale.

A questo punto con una irradiazione luminosa (eccitazione), specifica per il particolare cromoforo utilizzato, si produce una emissione di fluorescenza che permette l'evidenziazione del tessuto patologico in modo più dettagliato di quanto sia possibile clinicamente.

Oltre che sulla cute la DF può essere utilizzata anche per la diagnosi di alcune patologie tumorali della vescica, dell'apparato digerente e del polmone¹⁴.

A differenza delle reazioni fotochimiche, proprie della terapia fotodinamica, che richiedono elevati livelli di potenza luminosa (dell'ordine dei 150 mW/cm²), lo stato di fluorescenza può essere ottenuto con livelli di potenza molto più bassi (0.5-1 mW/cm²).

Acido δ -5-aminolevulinico

L'acido δ -5-aminolevulinico è un metabolita della cascata biosintetica che conduce alla formazione dell'eme. L'ALA ha un'alta selettività per i tessuti neoplastici o displastici²⁵. Introdotto in ambito dermatologico per uso topico nel 1990 da Kennedy, Pottier e Pross, è il precursore naturale della protoporfirina IX (PpIX), un potente fotosensibilizzante endogeno²⁶.

Attualmente questa sostanza è ampiamente utilizzata in terapia fotodinamica dermatologica. I prodotti presenti in commercio sono il Levulan[®] (ALA al 20% in soluzione) e il suo derivato metil-estere Metvix[®] (metil-levulinato al 16%). L'impiego di questa molecola per uso topico ha rappresentato un momento di svolta nella terapia fotodinamica dermatologica. Questa sostanza ha la capacità di penetrare con facilità attraverso uno strato corneo alterato, e di concentrarsi in quantità rilevante nei tessuti neoplastici di origine epiteliale. Questo effetto è del tutto selettivo in quanto la cute sana circostante, ricoperta da uno strato corneo normale, è impermeabile all'ALA. All'interno della cellula neoplastica, l'acido aminolevulinico viene rapidamente metabolizzato in PpIX, che è il fotosensibilizzante vero e proprio e la cui successiva eccitazione, mediante una sorgente luminosa dotata di lunghezza d'onda idonea, induce una fluorescenza ristretta al tessuto danneggiato, consentendone una chiara demarcazione senza causare fotosensibilità sistemica.

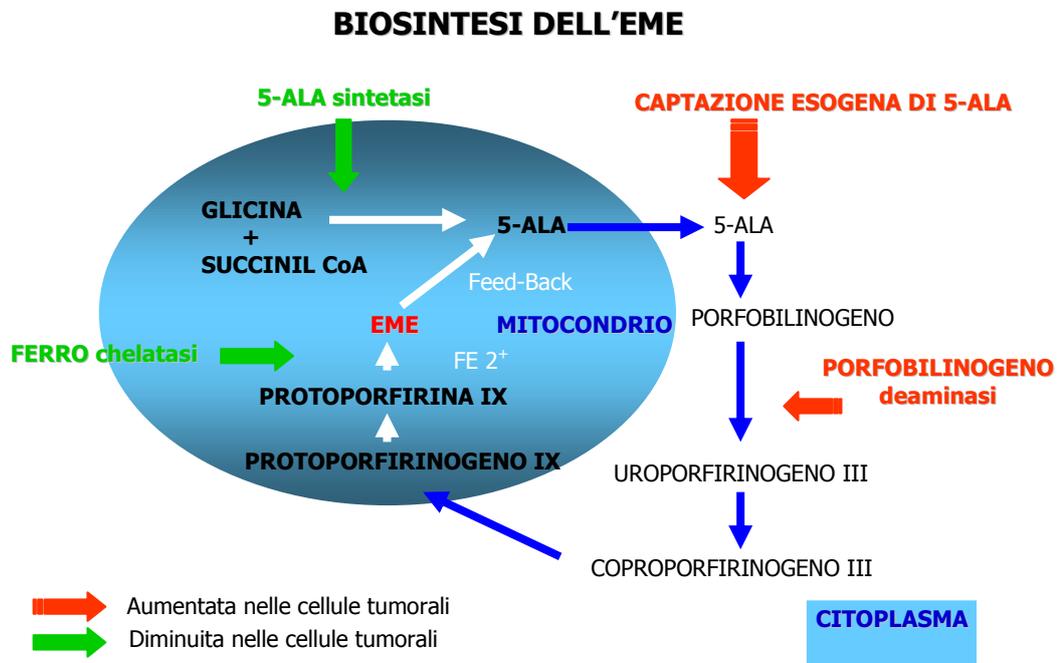
I pazienti devono evitare di esporre le zone trattate alla luce diretta del sole per impedire l'attivazione o il fotodegradamento involontario delle porfirine (*photobleaching*).

La biosintesi dell'eme presenta due tappe limitanti (*schema 1*):

1. la sintesi dell'ALA dalla glicina e dal succinil-CoA;
2. l'incorporazione del ferro nella proporfirina IX, grazie all'enzima ferrochelatasi.

L'applicazione topica di ALA, determina un accumulo di PpIX nei tessuti, soprattutto a carico del tessuto danneggiato o con aumentato metabolismo.

La selettiva concentrazione della molecola in molti tumori di origine epiteliale, è dovuta anche al fatto che l'enzima ferrochelatasi, che catalizza la trasformazione della protoporfirina IX in eme, risulta ridotto, mentre viceversa l'enzima porfobilinogeno deaminasi (che insieme all'uroporfirinogeno III cosintetasi trasforma il porfobilinogeno in uroporfirinogeno III) è aumentato, con conseguente ulteriore e selettivo accumulo del fotosensibilizzante all'interno della cellula neoplastica^{14,27,28}.



Schema 1 riassuntivo della via di biosintesi dell'eme

L'acido 5-aminolevulinico attraversa difficilmente, per le sue proprietà idrofiliche, la barriera epidermica. Per facilitarne la penetrazione, è necessaria l'applicazione in occlusiva per 2-4 ore²⁹⁻³¹, in relazione al danneggiamento dell'epidermide, alla profondità ed allo spessore della lesione.

La somministrazione intralesionale di soluzioni di ALA può aumentare la penetrazione del farmaco nel derma e nelle lesioni sottocutanee³².

I risultati sperimentali indicano che le cellule tumorali sono in grado di accumulare maggiori quantità di ALA rispetto ai tessuti sani ed inoltre mostrano livelli di sintesi delle porfirine più elevati del normale.

La prima dimostrazione dell'ALA come induttore di fluorescenza si è avuta nei tumori della vescica. Recentemente è stata dimostrata la possibilità di successo terapeutico nell'asportazione chirurgica dei tumori cutanei sotto la guida della diagnosi in fluorescenza¹⁰.

Una fluorescenza selettiva è stata osservata nei basaliomi dopo applicazione di ALA¹²⁻¹⁴. Inoltre è stato osservato che l'aumento della fluorescenza della protoporfirina IX correla con l'estensione tumorale se confrontata con la mappatura istologica^{17,18}.

L'accumulo selettivo della protoporfirina IX nella lesione tumorale dopo applicazione di ALA è dipendente da molti fattori: la permeabilità dello strato corneo³³⁻³⁴, la diffusibilità attraverso il derma e l'epidermide³⁴⁻³⁶, l'attività biosintetica che conduce alla formazione di protoporfirina IX^{27,37-41} e il tempo di clearance del farmaco^{33,34}. Tutti questi fattori contribuiscono ad un elevato

accumulo di protoporfirina IX nel tessuto tumorale in confronto al tessuto sano circostante.

Nella diagnosi di fluorescenza è importante che il contrasto tra tumore e tessuto sano sia elevato per ottenere una buona definizione. E' stato dimostrato, sperimentalmente, che tempi di applicazione più lunghi inducono una migliore definizione^{35,36,42}.

Principi fisici della fluorescenza

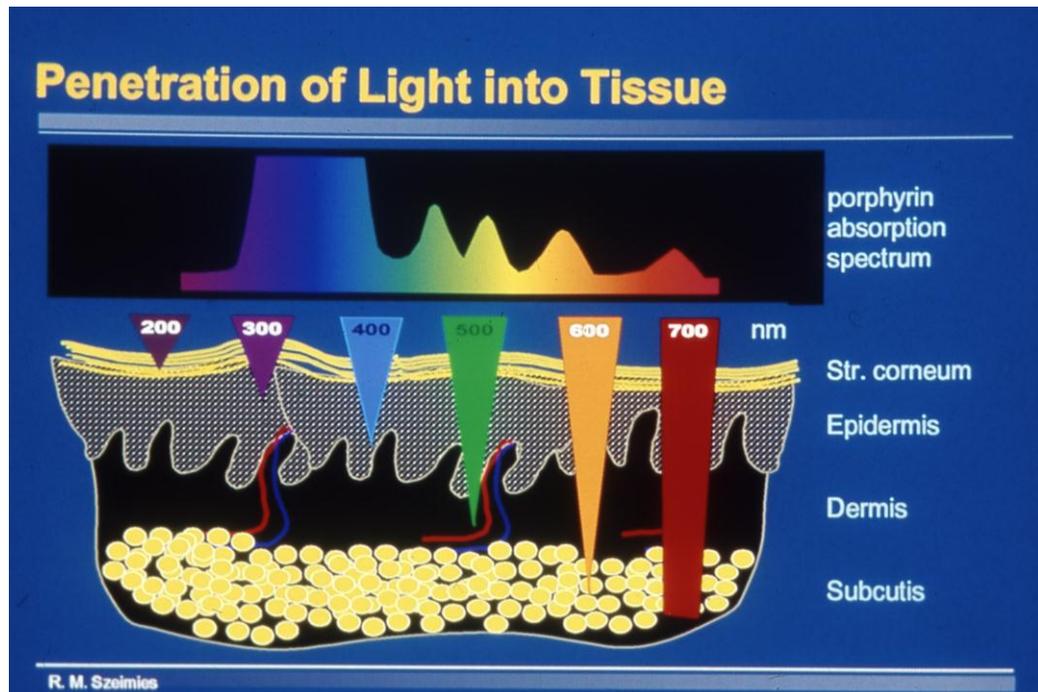
La fluorescenza è una emissione secondaria di luce da parte di una molecola o di un atomo, precedentemente stimolati da energia elettromagnetica, che ne determina il passaggio ad uno stato energetico più elevato. L'emissione ha luogo quando la molecola ritorna al livello energetico di base. Questo processo avviene molto velocemente (alcuni nanosecondi per la PpIX) per cui la fluorescenza cessa quando la luce di eccitazione viene rimossa. L'emissione avviene ad una lunghezza d'onda superiore a quella di eccitazione⁴³.

Lunghezza d'onda di eccitazione

Per ottenere la fluorescenza bisogna irradiare la zona trattata con una sorgente luminosa che emetta una lunghezza d'onda tale da essere compresa nello spettro di assorbimento del fotosensibilizzante.

La sorgente luminosa deve emettere una luce di eccitazione con una lunghezza diversa da quella della fluorescenza provocata, che di solito è di intensità molto debole.

La PpIX mostra diversi picchi di assorbimento lungo tutto lo spettro del visibile. Per la terapia fotodinamica si utilizza il picco localizzato a 632 nm, che ha una maggiore penetrazione nei tessuti, mentre per la DF si utilizza il picco di assorbimento a 405 nm (blu-violetto) (*Schema 2*); si sfrutta questa lunghezza d'onda anche se la penetrazione della luce nell'epidermide è limitata a pochi decimi di mm (0.5-0.7 mm).



Scema 2. Banda di Soret. Spettro di assorbimento della luce da parte delle Porfirine e penetrazione della luce nei tessuti (da R.M. Szeimies)

Questo è normalmente sufficiente per una informazione diagnostica dell'aspetto superficiale della lesione e delle strutture immediatamente sottostanti.

La potenza luminosa da utilizzarsi dipende da vari fattori quali:

- sensibilità del sensore utilizzato per la acquisizione di immagini
- concentrazione di PpIX nei tessuti.

La cute viene osservata attraverso un filtro ottico di sbarramento che fa passare l'emissione in fluorescenza, ma blocca completamente l'eccitazione.

Sorgenti luminose per l'eccitazione della fluorescenza con PpIX

La luce blu-violetta a 405 nm ha la migliore efficacia di eccitazione.

Da un punto di vista pratico, se ci si limita ad una osservazione della fluorescenza (senza acquisizione) si può utilizzare una comune lampada di Wood, anche se l'intensità della fluorescenza risulterà esigua.

Sono oggi disponibili apparati specificamente concepiti per questo scopo. Si tratta di lampade a scarica di gas ad alta pressione (Xenon, Alogenuri Metallici) il cui spettro di emissione viene filtrato otticamente sino ad ottenere la banda di emissioni voluta.

Le caratteristiche costruttive del filtro di sbarramento fanno sì che l'energia di eccitazione sia distribuita in una banda abbastanza ampia, tra i 380 e i 430 nm.

La ripresa avviene mediante una telecamera CCD ad integrazione con tempi di esposizione dell'ordine del secondo.

Recentemente sono stati introdotti apparati basati sulla tecnologia LED (*Light Emitting Diode*) con emissione che si avvicina a quella ideale (*Fig 21*).

Questa tecnologia, interamente allo stato solido, converte efficacemente l'energia elettrica in luce quasi monocromatica, ovviando alla complessità ed al costo delle lampade a scarica.

Se si vuole effettuare una quantificazione della fluorescenza è fondamentale che le condizioni di ripresa (concentrazione ALA, veicolo, tempo di incubazione, potenza di emissione, parametri di acquisizione) si mantengano costanti. Le sorgenti a scarica (inclusa la lampada di Wood) vanno incontro ad un processo di invecchiamento che ne affievolisce l'intensità di emissione (dando luogo a fluorescenze più deboli).

Le sorgenti LED sono invece intrinsecamente stabili per tempi lunghissimi (superiori alle 50.000 ore) e possono essere pilotate in modo da garantire una costanza di emissione nel tempo.

Acquisizione di immagini e quantificazione della fluorescenza

Per una precisa DF è necessario disporre di un sistema di acquisizione e memorizzazione delle immagini.

L'immagine acquisita può servire per discutere e pianificare l'intervento chirurgico oppure per valutare l'entità di regressione della neoplasia dopo terapia fotodinamica.

La configurazione di acquisizione consiste in:

- stativo di ripresa
- telecamera ad alta sensibilità (> 1.5 Mpixel)

- obiettivo di ripresa (medio teleobiettivo)
- sistema di illuminazione per la luce di eccitazione
- filtro ottico di sbarramento.

L'immagine in fluorescenza viene acquisita e convertita in un file grafico che viene archiviato elettronicamente su un PC; i parametri di acquisizione (exposure, gain, white balance, etc) della telecamera digitale possono essere impostati dal medesimo PC in maniera omogenea (*Fig 22*).

Ai fini della riproducibilità delle condizioni di ripresa è utile inserire nella scena una “dima di calibrazione” per effettuare una calibrazione dimensionale delle immagini (*Fig 23*).

Altri parametri di DF che possono essere utilizzati ai fini clinici sono l'intensità della fluorescenza e la tonalità del rosso.

L'intensità della fluorescenza è proporzionale all'attività di malattia, come avviene in alcuni basaliomi.

La tonalità del colore rosso varia con la profondità della lesione: quelle più profonde emettono una tonalità rosso cupo, mentre quelle più superficiali emettono una tonalità rosso brillante. La sostanza distribuita in eccesso oltre i confini lesionali appare di colore rosso chiaro e, successivamente, tenderà a svanire.

Avendo a disposizione immagini digitali, sia l'intensità di fluorescenza che la tonalità del colore possono essere analizzate e quantificate con metodi di analisi automatica dell'immagine.

La DF nella determinazione dei margini di neoplasia

L'utilizzo principale della DF in ambito dermatologico è la definizione dei margini dei tumori epiteliali dal momento che la crescita neoplastica può svolgersi al di sotto dell'epidermide ed anche a distanza dal focolaio iniziale.

L'estrema difficoltà nel definire accuratamente i margini della neoplasia rappresenta la prima causa di recidiva per incompleta eradicazione. Per questa ragione Mohs ha sviluppato la tecnica micrografica, che prevede ripetuti esami istologici intraoperatori per determinare i limiti della neoplasia.

La DF, infatti, consente una buona demarcazione dei margini tumorali e, quindi, una dettagliata pianificazione dell'intervento chirurgico.

Questa procedura si rivela utile negli epiteliomi insorti nelle "aree difficili", come le zone orbitali e periorbitali.

In casi simili, la DF serve per guidare l'intervento chirurgico che può essere effettuato con margine di resezione ristretto all'immagine di fluorescenza⁴⁴.

CONCLUSIONI

Il principale scopo di ogni protocollo terapeutico dei carcinomi è rappresentato dall'asportazione completa della neoplasia, che dovrebbe riflettersi in una bassa percentuale di recidiva. Questo assume particolare significato per il carcinoma basocellulare nel quale è l'outcome estetico-funzionale che prevede il risparmio di tessuto sano per mantenere un adeguato trofismo della superficie oculare.

L'asportazione chirurgica è un trattamento efficace per i BCC primari (non trattati precedentemente⁴⁵⁻⁴⁷) [evidenza A, II-ii] e buoni risultati vengono raggiunti se il tumore è stato asportato completamente⁶.

Le tecniche di asportazione chirurgica della neoplasia sono diverse.

La chirurgia convenzionale dei carcinomi a cellule basali prevede un allargamento dell'area asportata di 3-4 mm rispetto alla lesione neoplastica con ricostruzione della palpebra in una unica seduta operatoria⁴⁸. Qualora la neoplasia coinvolga il margine palpebrale, se è di piccole dimensioni è possibile effettuare l'accollamento diretto dei lembi cutanei; se il tumore invece è di dimensioni maggiori è necessario ricorrere ad una chirurgia ricostruttiva sofisticata. Tuttavia, in alcuni pazienti l'asportazione del carcinoma a cellule basali con 4 mm di margine ha come risultato la rimozione di una quantità significativa di tessuto sano⁴⁹. Per ottenere il miglior risultato sia da un punto di vista estetico che da un punto di vista funzionale è importante minimizzare la perdita di tessuto normale⁵⁰.

Talvolta, anche l'allargamento di 3-4 mm, non è sufficiente a garantire una completa escissione e nel 54% non si sono ottenuti margini liberi da malattia⁵¹. Le percentuali di recidive dei tumori a cellule basali perioculari, trattati con escissione chirurgica non monitorata e con modalità radicale, sono alte, e variano dal 5% al 100%^{2,7}.

Breuninger e Dietz⁵² hanno analizzato più di 2.000 casi di BCC prendendo in considerazione diverse variabili. Gli autori hanno osservato che il BCC presenta un pattern di infiltrazione altamente irregolare ed hanno calcolato una probabilità di positività dei margini, per carcinomi con dimensioni superiori a 10 mm di diametro, pari al 30%, 16% e 5%, rispettivamente con 2, 3 e 5 mm di margine chirurgico.

La probabilità di positività dei margini, relativa a carcinomi nella variante sclerosante, da 10 a 20 mm di diametro, è considerevolmente più elevata: del 48% con 2 mm, del 34% con 3 mm e del 18% con 5 mm di margine chirurgico. Inoltre Breuninger e Dietz hanno rilevato che le forme recidivate presentano una elevata probabilità di positività dei margini.

Rakofsky ha riportato una incompleta asportazione in 47 di 95 casi, e di questi, 11 hanno sviluppato una recidiva, con una percentuale del 12%⁵³.

Collin ha riportato una percentuale di recidive pari al 2.3% quando combinate con un margine di 3-5 mm e istologia negativa per neoplasia in uno studio retrospettivo, escludendo i soggetti che hanno avuto una incompleta asportazione del tumore⁵⁴.

Silverman⁵⁵ ha rilevato che la recidiva dei 5755 casi di BCC, trattati con vari metodi, è del 10% nei tumori primitivi e del 15% nei

casi di recidiva. Gli stessi autori sostengono che l'aumento del diametro delle lesioni e l'insorgenza nelle zone definite ad alto rischio (zona H della faccia che comprende anche le palpebre) rappresentano fattori di rischio indipendenti per un alto tasso di recidiva⁵⁶.

Particolarmente difficili da gestire sono le recidive che coinvolgono il canto mediale, in quanto queste offrono facile accesso al tumore verso l'orbita e la cavità cranica; per cui lesioni non trattate adeguatamente possono richiedere l'exenteratio orbitae⁵⁷. La migliore scelta terapeutica è rappresentata dal tentativo di eradicare completamente la lesione al primo intervento chirurgico.

La tecnica micrografica di Mohs, prevede l'asportazione della massa tumorale, quindi la resezione circonferenziale di un sottile strato di tessuto profondo, in più stadi con lo studio a freddo dei margini in estemporanea, fino a quando i margini non risultino liberi da malattia. Questa tecnica consente di ottenere e di minimizzare la perdita di tessuto sano⁵⁸. In letteratura si ricavano, riguardo a questa tecnica, percentuali di guarigione a 5 anni pari al 99% per i basaliomi primitivi e al 94% per i basaliomi recidivati^{59,60}.

Il metodo di Mohs è tuttavia poco utilizzato in Europa per gli alti costi, i tempi intraoperatori e la necessità di disporre di una equipe dedicata^{61,62}.

L'impiego della DF permette una precisa delimitazione dei margini tumorali e sembra poter rappresentare una valida alternativa alla chirurgia micrografica a giudicare dai risultati incoraggianti del nostro studio.

Nel valutare la scelta dell'opzione terapeutica più adatta ad un determinato tipo di BCC, si devono prendere in considerazione numerosi elementi.

Per i tumori palpebrali, sicuramente il parametro più importante è la sede, il pattern clinico e istologico della lesione. Infatti un tumore nodulare, ben localizzato, verrà trattato in modo meno aggressivo rispetto ad una lesione multiforme maggiormente invasiva, così come un tumore recidivato richiederà una escissione chirurgica più estesa.

Rodriguez-Sains e coll.⁵⁷ hanno riscontrato una percentuale di recidive pari al 1.9% su 318 carcinomi primitivi, e una percentuale di recidiva pari al 6.4% su 313 carcinomi recidivati.

Spinelli e coll.⁶³ hanno inoltre notato che tumori di dimensioni maggiori, che determinano quindi un difetto chirurgico ampio, e tumori che coinvolgono il canto mediale più facilmente comportano complicanze chirurgiche.

Noi abbiamo utilizzato la fluorescenza per lo studio morfologico della lesione neoplastica in quanto questa tecnica è applicabile ai BCC per l'elevata capacità, che le cellule tumorali hanno, di produrre protoporfirina IX a partire dall'ALA⁶⁴.

Quello che è emerso con lo studio della fluorescenza è che i margini macroscopici non sempre corrispondono ai margini microscopici. È importante sottolineare l'utilità della metodica impiegata, che ha fornito all'operatore un buon margine di sicurezza e, tramite la precisa delimitazione della lesione, la possibilità di ridurre al minimo l'estensione dell'area di asportazione con risparmio di tessuto sano. Inoltre, nel secondo e nel quarto caso, le

dimensioni dei frammenti asportati sono state maggiori di quelle risultanti dalla misurazione della lesione macroscopica, a testimonianza della sensibilità della tecnica da noi adottata.

I due principali scopi della diagnosi di fluorescenza sono l'escissione completa della neoformazione e il massimo risparmio di tessuto sano, aspetto, quest'ultimo, di non scarsa rilevanza se si tiene conto del fatto che l'estensione media della palpebra è circa 30 mm, e che un tumore piccolo, per esempio di 2 mm, comporta l'asportazione, con tecnica tradizionale, di circa 10 mm di tessuto palpebrale, che corrispondono ad un terzo di palpebra.

Il metodo da noi proposto si è rivelato efficace per delimitare il margine tumorale. L'anatomopatologo, nell'analisi finale con l'inclusione del pezzo in paraffina e con la colorazione con ematossilina-eosina, grazie all'orientamento del pezzo operatorio, ha confermato la negatività dei margini sia laterali che profondo, in tutti i casi esaminati.

La presenza di margini liberi da malattia, con solo 1 mm di margine dalla fluorescenza, in tutti i casi da noi operati, è incoraggiante nell'utilizzo di questa metodica per l'asportazione chirurgica dei tumori della regione periorbitaria.

Questa tecnica è poco costosa, non richiede un training specifico dei chirurghi e degli anatomopatologi, rimanda solo di alcune ore la ricostruzione palpebrale e consente di poter effettuare l'intervento in anestesia locale e di poter dimettere il paziente nella stessa giornata. Inoltre, tutti i pazienti sono rimasti soddisfatti dei risultati ottenuti dal punto di vista sia estetico che funzionale, con scarse segnalazioni di discomfort oculare.

I risultati ottenuti si avvicinano a quelli della chirurgia micrografica di Mohs, attualmente considerata il gold standard.

Oltre a quanto precedentemente esposto, la fluorescenza può essere utile nei casi in cui i margini siano interessati da malattia, nei soggetti non sottoposti in fase preoperatoria allo studio morfologico della lesione con l'ALA. Essa, infatti, consente di effettuare il follow-up post-operatorio con la possibilità di evidenziare la presenza di eventuale malattia residua. In questo caso, è possibile, sottoporre il paziente a eventuale terapia fotodinamica, evitando un secondo intervento chirurgico, ed ottenerne la guarigione completa con l'eliminazione di cellule tumorali residue.

Un altro campo di applicazione è la diagnostica differenziale delle recidive nei confronti di un tessuto cicatriziale sospetto dal momento che la tecnica a fluorescenza, grazie alla peculiare captazione dell'ALA da parte della cellula neoplastica, consente di distinguere in modo estremamente preciso le recidive di tumori.

In conclusione la metodica da noi studiata sembra offrire alcuni vantaggi per quanto riguarda la delimitazione dell'area da asportare, il risparmio di tessuto sano, la semplicità di esecuzione, i costi e la soddisfazione del paziente ai risultati ottenuti relativamente.

ICONOGRAFIA



Fig 1 Caso1. Aspetto della lesione preoperatoria



Fig 2 Caso 1. Fluorescenza della lesione, dopo trattamento con ALA



Fig 3 Caso 1. Delineamento dei margini della lesione



Fig 4 Caso 1. Aspetto post-operatorio



Fig 5 Caso 2. Aspetto della lesione preoperatoria

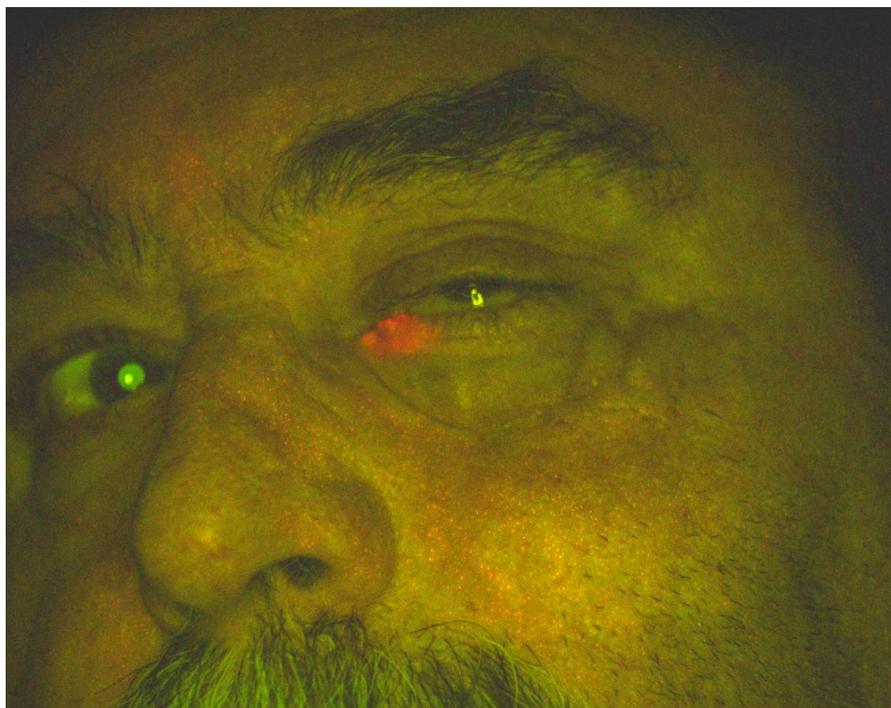


Fig 6 Caso 2. Fluorescenza della lesione dopo applicazione di ALA

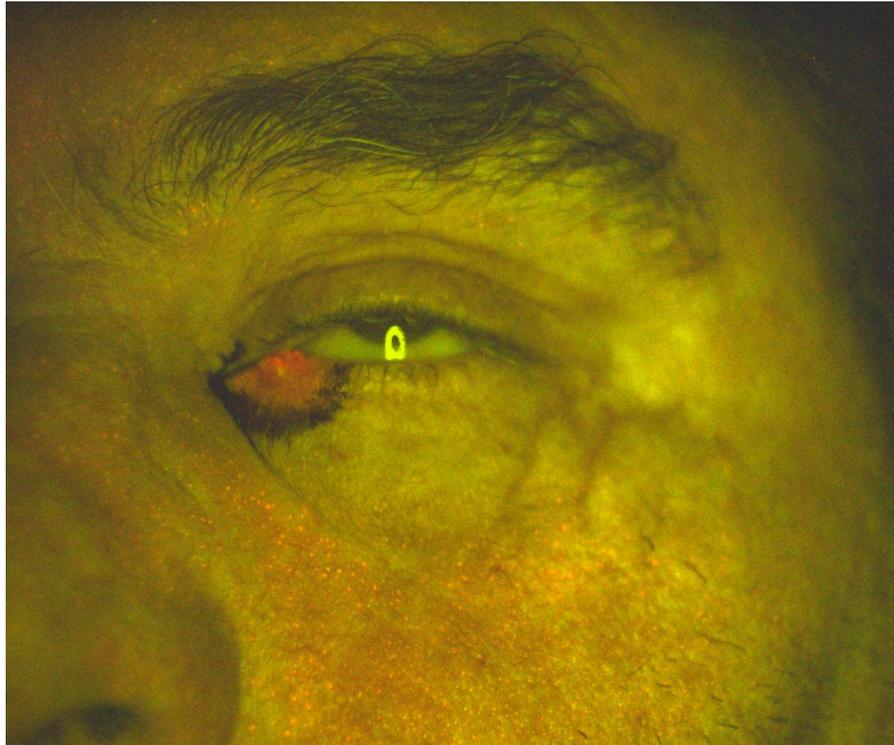


Fig 7 Caso 2. Delimitazione dei margini



Fig 8 Caso 2. Aspetto postoperatorio



Fig 9 Caso 3. Aspetto della lesione preoperatoria



Fig 10 Caso 3. Fluorescenza della lesione dopo trattamento con ALA

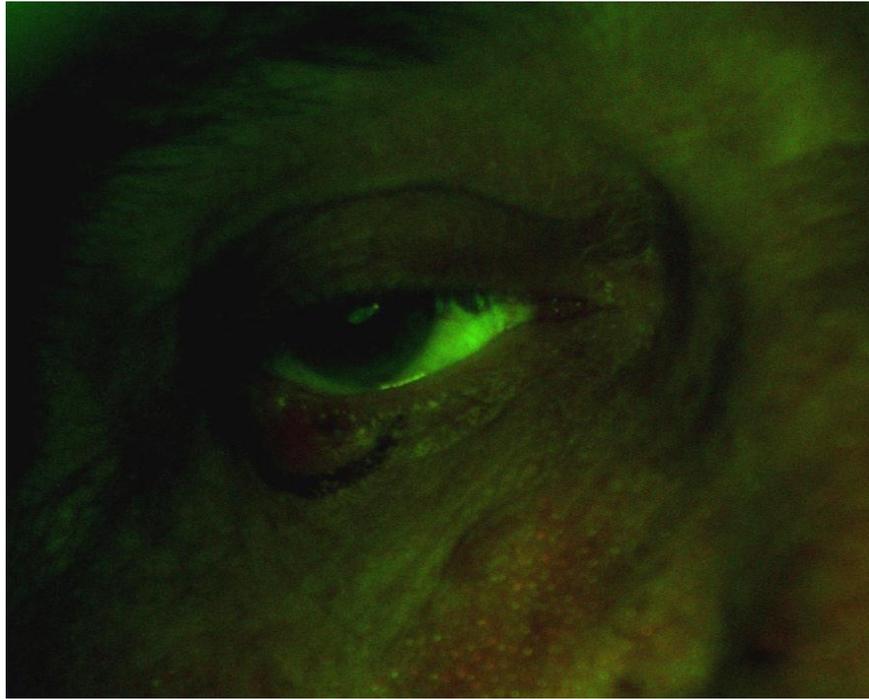


Fig 11 Caso 3. Delimitazione dei margini



Fig 12 Caso 4. Aspetto della lesione preoperatoria



Fig 13 Caso 4. Fluorescenza con marcatura dei margini



Fig 14 Caso 4. Fluorescenza dopo alcune ore con delimitazione dei margini



Fig 15 Caso 4. Foto intraoperatoria dell'intervento



Fig 16 Caso 4. Pezzo intraoperatorio con punto in seta per l'orientamento dello stesso



Fig 17 Caso 4. Aspetto post-operatorio, con ricostruzione tramite lembo nasogenieno

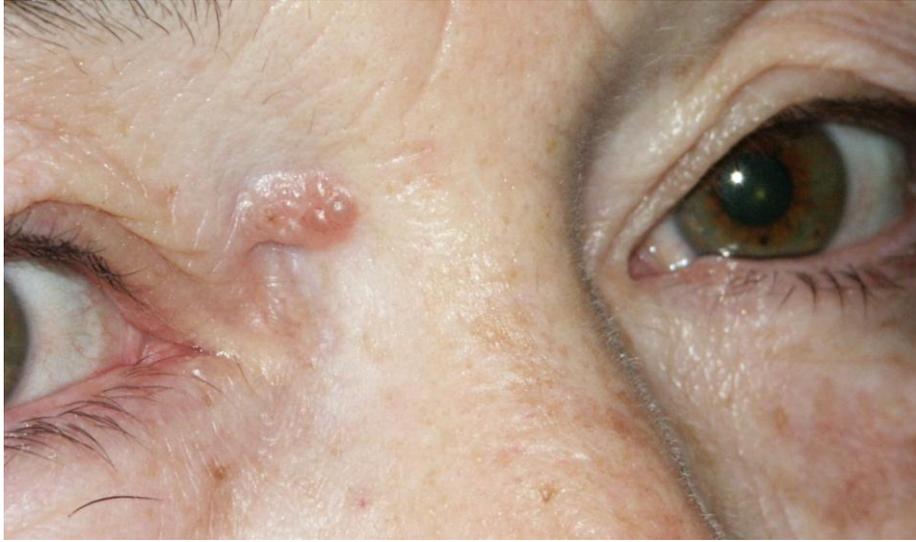


Fig 18 Caso 5. Lesione preoperatoria



Fig 19 Caso 5. Fluorescenza della lesione dopo trattamento con ALA



Fig 20 Caso 5. Delimitazione dei margini

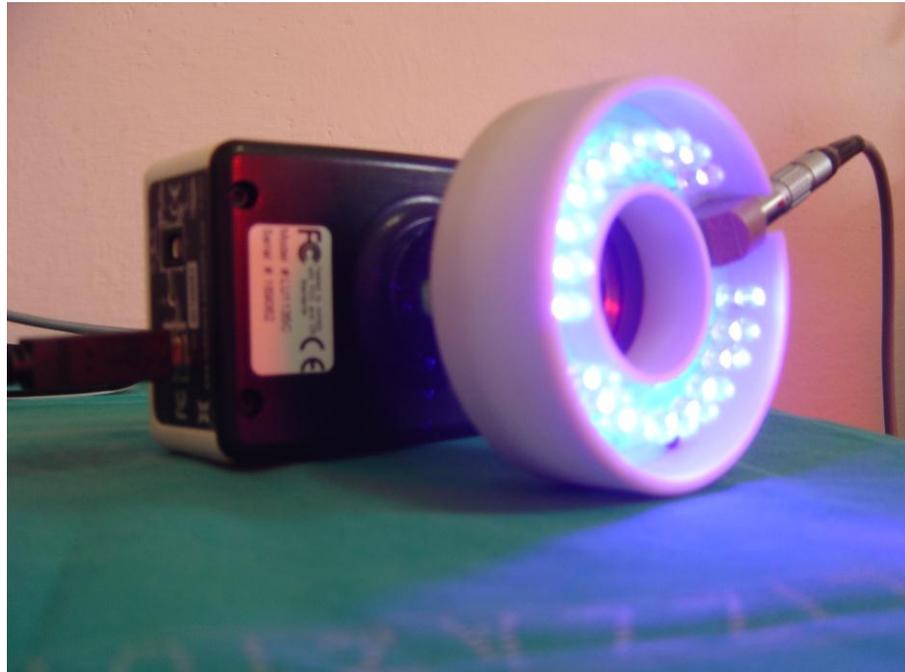


Fig 21 Apparato DICAM-UV[®] - produzione Alpha Strumenti



Fig 22 Sistema di acquisizione d'immagini

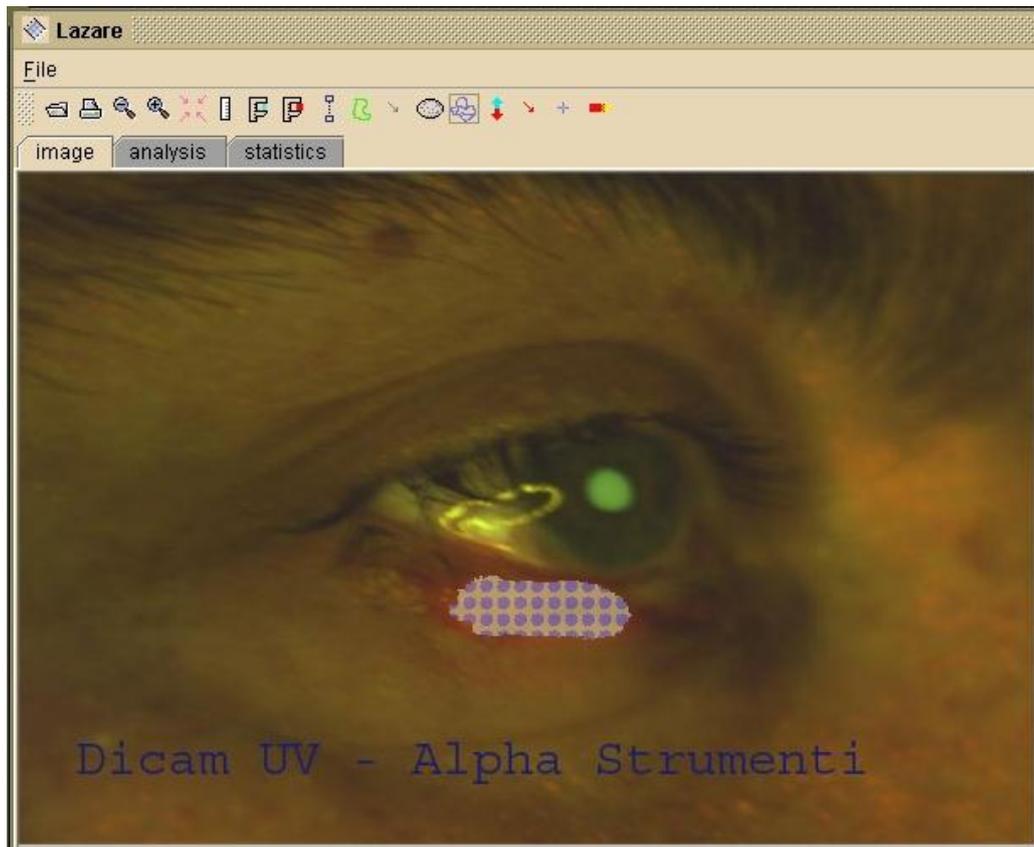


Fig 23 Calibrazione della lesione

BIBLIOGRAFIA

1. Gilbody JS, Aitken J, Green A. What causes basal cell carcinoma to be the commonest cancer? *Aust J Public Health* 1994;18:218-221
2. Cook BE Jr, Bartley GB. Treatment options and future prospects for the management of eyelid malignancies: an evidence-based update. *Ophthalmology* 2001;108:2088-98
3. Aurora AL, Blodi FC. Lesions of the eyelid. A clinicopathologic study. *Surv Ophthalmol* 1970;15:94-104
4. Urbach F. Incidence of nonmelanoma skin cancer. *Dermatol Clin* 1991;9: 751-5
5. Cook BE, Bartley GB. Epidemiologic characteristics and clinical course of patients with malignant eyelid tumours in an incidence cohort in Olmstead County, Minnesota. *Ophthalmology* 1999;106:746-50
6. Doxanas MT, Green WR. Factors in the successful surgical management of basal cell carcinoma for the eyelid. *Am J Ophthalmol* 1981; 91:726-36
7. Margo CE, Waltz K. Basal cell carcinoma of eyelid and periocular skin. *Surv Ophthalmol* 1993;38:169-91
8. Wilson BD, Mang TS, Stoll H, et al. Photodynamic therapy for the treatment of basal cell carcinoma. *Arch. Dermatol.* 1992;128:1597-601

9. Beutner KR, Geisse JK, Helman D et al. Therapeutic response of basal cell carcinoma to the immune response modifier imiquod 5% cream. *J Am Acad Dermatol* 1999;41:1002-7
10. Ninomiya Y, Itoh Y, Henta T, Tajima S, Ishibashi A. Photodynamic diagnosis of basal cell carcinoma on the lower eyelid using topical 5-aminolevulinic acid and desferrioxamine. *British J Dermatol* 1999;141:580-581
11. Becker-Wegerich PM, Fritsch C, Schulte KW, Megahed M, Neuse W, Goerz G, Stahl W, Ruzicka T. Carbon dioxide laser treatment of extramammary Paget's disease guided by photodynamic diagnosis. *British J Dermatol* 1998;138:169-172
12. Andersson-Engels S, Berg R, Svanberg K, Svanger S. Multicolour fluorescence imaging in connection with photodynamic therapy of delta-amino levulinic acid (ALA) sensitised skin malignancies. *Bioimaging* 1995;3:134-143
13. Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1992;14:275-292
14. Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, Neslan JM. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: clinical research and future challenges. *Cancer* 1997;79:2282-2308
15. Peng Q, Warloe T, Moan J et Al. Distribution of 5-aminolevulinic acid- induced porphyrins in noduloulcerative basal cell carcinoma. *Photochem Photobiol* 1995;62:906-13

- 16.Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2000;42 (3):389-412
- 17.Wenberg AM, Gudmunson F, Stenquist B, Ternesten A, Molne L, Rosén A, Larkö O. In vivo detection of basal cell carcinoma using imaging spectroscopy. *Acta Dermatol Venereol* 1999;79:54-61
- 18.Frisch C, Neumann NJ, Ruzicka T, Lehmann P. Photodiagnostic test. 3: Fluorescence diagnosis with delta-aminolevulinic acid-induce porphyrins (FDAP) in dermatology. *Hautarzt* 2000;51:528-543
19. English DR, Armstrong BK, Kricger A, Fleming C. Sunlight and cancer. *Cancer CAUSES Control* 8 1997:271-283
- 20.Wennberg AM, Larkö O, Stenquist B. Five-year results of Mohs' micrographic surgery for aggressive facial basal cell carcinoma in Sweden, *Acta Dermatol Venereol* 1999;79:370-372
- 21.Kopf AW. Computer analysis of 3531 basal-cell carcinomas of the skin. *J. Dermatol* 1979;6:267-281
- 22.Rahbari H, Mehregan AH. Basal cell epitheliomas in usual and unusual sites *J Cutan Pathol* 1979;6:425-431
- 23.Pottier R. In vitro and in vivo fluorescence monitoring of photosensitizer *J Photochem Photobiol B: Biol* 1990;6:103-109
- 24.Figge FHJ, Weiland GS, Manganiello LOJ. Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic embryonic and traumatized tissue for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1948;68:640-1

25. Heyerdahl H, Wang I, Liu DL, Berg R, Andersson-Engels S, Peng Q, Moan J, Svanberg S, Svanberg K. Pharmacokinetics studies on 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in tumours and normal tissue *Cancer Lett.* 1997;12:225-231
26. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC et al. Photodynamic Therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B* 1990;6:143-8
27. Gibson SL, Cupriks DJ, Havens JJ, Nguyen ML, Hilf R. A regulatory role for porphobilinogen deaminase (PBGD) in delta-aminolevulinic acid (delta-ALA)-induced photosensitization. *Br J Cancer* 1998;77:235-43
28. Hurlimann A. F., Hanggi G., Panizzon R.G. Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinomas using topical 5-aminolevulinic acid in a nanocolloid lotion. *Dermatology* 1998;197:248-54
29. Calzavara-Pinton PG, Zane C, Facchetti F et al. Terapia fotodinamica di neoplasie cutanee non-melanoma con applicazione locale di acido delta-aminolevulinico. *G Ital Dermatol Venereol* 1997;132:15-21
30. Pinzi C, Campolmi P, Moretti S et al. Terapia fotodinamica di tumori cutanei (non melanoma) primitivi e secondari con applicazione topica di acido 5-aminolevulinico. *G Ital Dermatol Venereol* 2000;135:427-31
31. Stefanidou M, Tosca A, Themelis G, Vazgiouraki E, Balas C. In vivo fluorescence kinetics and photodynamic therapy efficacy of delta-aminolevulinic acid-induced porphyrins in

- basal cell carcinomas and actinic keratoses; implications for optimization of photodynamic therapy. *Eur J Dermatol* 2000;10:351-6
32. Cappugi P, Mavilia L, Campolmi P, Reali EF, Mori M, Rossi R. New proposal for the treatment of nodular basal cell carcinoma with intralesion 5-aminolevulinic acid *J of Chemother* 2004;16(5):491-3
33. Svaasand LO, Wyss P, Wyss MT, Tadir Y, Tromberg BJ, Berns MW. Dosimetry model for photodynamic therapy with topically administered photosensitizer. *Laser Surg Med* 1996;18:139-149
34. Moan J, Ma LW, Iani V. On the pharmacokinetics of topically applied 5-aminolevulinic acid and two of its ester. *Int J Cancer* 2001;92:139-143
35. Abels C, Heil P, Dellian M, Kuhnle GE, Baumgarten R, Goetz AE. In vivo kinetics and spectra of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescence in an amelanotic melanoma of the hamster. *Br J Cancer* 1994;70:826-833
36. Ackermann G, Abels C, Baumler W, Langer S, Landthaler Mlang EW, Szeimies RM. Simulations on the selectivity of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in vivo. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1998;47:121-128
37. Dailey HA, Smith A. Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. *Biochem J* 1984;223:441-445
38. Hua Z, Gibson SL, Foster TH, Hilf R. Effectiveness of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin as a

- photosensitizer for photodynamic therapy in vivo. *Cancer Res* 1995;55:1723-1731
39. Berg K, Anholt H, Bech O, Moan J. The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolaevulinic acid-treated cells. *Br J Cancer* 1996;74:688-697
40. Gibson SL, Nguyen ML, Haven JJ, Barbarin A, Hilf R. Relationship of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels to mitochondrial content in neoplastic cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:315-321
41. Hilf R, Havens JJ, Gibson SL. Effect of delta-aminolevulinic acid on protoporphyrin IX accumulation in tumor cells transfected with plasmid containing porphobilinogen deaminase DNA. *Photochem Photobiol* 1999;70:334-340
42. van der Veen N, de Bruijn HS, Berg RJ, Star WM. Kinetics and localisation of PpIX fluorescence after topical and systemic ALA application, observed in skin and skin tumours of UVB-treated mice. *Br J Cancer* 1996;73:925-930
43. Monti M, Motta S, Villa G. Diagnosi in fluorescenza nella terapia fotodinamica. In *Terapia fotodinamica nella pratica clinica. Manuale pratico e testo-atlante dermatologico*. Cappugi P, Rossi R, Mavilia L, Campolmi P. Ed. SEE, Firenze, 2004,114-24
44. Fritsch C, Lehmann P, Stahl W, et al. Optimum porphyrin accumulation in epitelial skin tumors and psoriatic lesions after topical application of δ -Aminolevulic Acid. *Br J Cancer* 1999;79:1603-1608

45. Dubin N, Kopf AW. Multivariate risk score for recurrence of cutaneous basal cell carcinomas. *Arch Dermatol* 1983; 119:373-7
46. Bart RS, Schragger D, Kopf AW, Bromberg J, Dubin N. Scalpel excision of basal cell carcinomas. *Arch Dermatol* 1978;114:739-42
47. Marchac D, Papadopoulos O, Duport G. Curative and aesthetic results of surgical treatment of 138 basal cell carcinomas. *J Dermatol Surg Oncol* 1982;8: 379-87.
48. Wolf DJ, Zitelli JA. Surgical margins for basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 1987;123:340-4
49. Anderson RL. Comment on Glatt HJ, Olsen JJ, Putterman AM. Conventional frozen sections in periocular basal-cell carcinoma: a review of 236 cases. *Ophthalmic Surg* 1992;23:6-9
50. Scholda C, Collin JRO. Value of histological clearance of eyelid basal cell carcinomas. *Orbit* 1990;9:3-5
51. Chalfin J, Putterman AM. Frozen section control in the surgery of basal cell carcinoma of the eyelid. *Am J Ophthalmol* 1979;87:802-9
52. Breuninger H, Dietz K. Prediction of subclinical tumor infiltration in basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol* 1991;17:574-578
53. Rakofsky SI. The adequacy of the surgical excision of basal cell carcinoma. *Ann Ophthalmol* 1973;5:596-600
54. Collin JRO. Basal cell carcinoma in the eyelid region. *Br J Ophthalmol* 1976;60:806-9

55. Silverman MK, Kopf AW, Grin CM, Bart RS, Levenstein MJ. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 1: Overview. *J Dermatol Surg Oncol* 1991;17:713-718
56. Silverman MK, Kopf AW, Grin CM, Bart RS, Levenstein MJ. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 2: Curettage-electrodesiccation. *J Dermatol Surg Oncol* 1991;17:720-726
57. Rodriguez-Sainz RS, Robin P, Smith B. Radiotherapy or periocular basal cell carcinoma: recurrence rates and treatment with special attention to the medial cantus. *Br J Ophthalmol* 1998;72:134
58. Mohs FE. Micrographic surgery for the microscopically controlled excision of eyelid cancers. *Arch Ophthalmol* 1986; 104: 901-9
59. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: Implications for patient follow up. *J Dermatol Surg Oncol* 1989;15:315-328
60. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL, Jr. Mohs surgery is the treatment of choice for recurrent (previously treated) basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol* 1989;15:424-431
61. Downes RN, Walker NPJ, Collin JRO. Micrographic (Mohs') surgery in the management of periocular basal cell epitheliomas. *Eye* 1990;4:160-8
62. Callahan MA, Callahan A, Monheit GD. Mohs fresh-tissue technique for periorbital skin cancer. In: Hornblass A, ed. *Oculoplastic, orbital and reconstructive surgery, Vol 1:*

Eyelids. Baltimore: Lippincott, Williams and Wilkins
1998:643-50

63. Spinelli HM, Jelks GW. Periocular reconstruction: a systematic approach. *Plast Reconstr Surg* 1993;91:1017

64. Ericson MB, Sandberg C, Gudmundson F, Rosén A, Larkö O, Wennberg AM. Fluorescence contrast and threshold limit: implications for photodynamic diagnosis of basal cell carcinoma. *J Photochem Photobiol B: Biology* 2003;69:121-127