

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA PREVENZIONE
XXIII Ciclo

**CARATTERIZZAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA
IN BIOPSIE PLEURICHE DI PAZIENTI AFFETTI DA
MESOTELIOMA EPITELIALE E SARCOMATOSO**

Coordinatore
Chiar.mo Prof. A. Mutti

Tutor
Chiar.ma Prof.ssa G. Bertorelli

Dottoranda
Dott.ssa Lisa Lasagna

INDICE

RIASSUNTO	1
1. INTRODUZIONE	4
1.1. LA PLEURA	5
1.1.1. SVILUPPO EMBRIONALE DELLA PLEURA	5
1.1.2. ANATOMIA MACROSCOPICA DELLA PLEURA	5
1.1.3. ANATOMIA MICROSCOPICA DELLA PLEURA	8
1.1.4. FISILOGIA E FISIOPATOLOGIA DELLA PLEURA	9
1.2. PATOLOGIA DELLA PLEURA	11
1.2.1 PLEURITI E VERSAMENTI PLEURICI	12
1.2.1.1 DIAGNOSI	12
1.2.1.2 EZIOLOGIA	14
1.2.1.3 PATOLOGIE ASSOCIATE A TRASUDATI PLEURICI	15
1.2.1.4 PATOLOGIE ASSOCIATE A ESSUDATI PLEURICI	15
1.2.1.5 ANATOMIA PATOLOGICA E FISIOPATOLOGIA	17
1.2.2. PLEURITE TUBERCOLARE	18
1.2.2.1 EPIDEMIOLOGIA ED EZIOLOGIA DELLA PLEURITE TUBERCOLARE	18
1.2.2.2 DIAGNOSI DI PLEURITE TUBERCOLARE	18
1.2.2.3 PATOGENESI DELLA PLEURITE TUBERCOLARE	19
1.2.3. MESOTELIOMA	19
1.2.3.1 EPIDEMIOLOGIA ED EZIOLOGIA DEL MESOTELIOMA	20
1.2.3.2.PATOGENESI DEL MESOTELIOMA	21
1.2.3.3. CLASSIFICAZIONE: ANATOMIA PATOLOGICA ED IMMUNOISTOCHEMICA	23
1.2.3.4 STADIAZIONE DEL MESOTELIOMA	26
1.2.3.5.DIAGNOSI, PROGNOSI E TERAPIA DEL MESOTELIOMA	27
1.3. RISPOSTA IMMUNITARIA Th1 E Th2	30
1.3.1 MOLECOLE ESPRESSE DAI Th1	33
1.3.1.1. CXCR3	33
1.3.1.2. T-bet	34
1.3.1.3. STAT4	35
1.3.2 MOLECOLE ESPRESSE DAI Th2	35

1.3.2.1 GATA3	35
1.3.2.2. CRTH2	35
1.3.2.3. STAT6	36
1.3.2.4. CCR4	36
1.3.3 Foxp3	36
2. SCOPO DELLA TESI	37
3. MATERIALI E METODI	40
3. 1. SOGGETTI	41
3. 2. TORACOSCOPIA MEDICA	42
3. 3. ANALISI DEL LIQUIDO PLEURICO	43
3. 4. ANALISI DELLE BIOPSIE PLEURICHE	43
3.4.1. COLORAZIONI ISTOLOGICHE	43
3.4.2. IMMUNOISTOCHEMICA	44
3.4.3. CONTEGGIO DELLE CELLULE PER LE COLORAZIONI ISTOLOGICHE ED IMMUNOISTOCHEMICHE EFFETTUATE	47
3.5. ANALISI STATISTICA	47
4. RISULTATI	48
4.1 DATI CLINICI	49
4.2. INFILTRATO INFIAMMATORIO E IMMUNITARIO	49
4.3. INFILTRATO LINFOCITARIO Th1 Th2 e Treg	56
4.3.1 LINFOCITI Th1	56
4.3.2 LINFOCITI Th2	59
4.3.3 LINFOCITI Treg	61
4.4 CORRELAZIONI TRA I MARKERS STUDIATI	61
5. DISCUSSIONE	63
6. BIBLIOGRAFIA	70
PUBBLICAZIONI	80

RIASSUNTO

RIASSUNTO

Il mesotelioma è un tumore raro ad elevata mortalità e terapia-resistente che origina dalle cellule mesoteliali. Generalmente, il mesotelioma colpisce gli individui di età compresa tra i 60 e i 70 anni. Nei paesi industrializzati il mesotelioma maligno pleurico è spesso associato all'esposizione ad asbesto, tuttavia in circa il 30% dei casi, l'esposizione non è documentata. La prognosi è severa e la mediana della sopravvivenza si aggira attorno ai 9 mesi. Poco è noto sui meccanismi che portano alla trasformazione neoplastica delle cellule mesoteliali pleuriche, tuttavia è stato dimostrato che ripetuti tentativi da parte dei macrofagi di fagocitare le fibre di asbesto provoca la formazione continua di molecole infiammatorie. E' stato visto che la ripetuta produzione di molecole infiammatorie, a sua volta, è in grado di provocare la trasformazione neoplastica di cellule mesoteliali in vitro.

In questo studio si è voluto caratterizzare lo stato dell'infiltrazione delle cellule infiammatorie ed immunitarie in biopsie pleuriche ottenute da 15 pazienti con diagnosi di mesotelioma maligno pleurico epitelioidale (E-MESO) e 8 pazienti con diagnosi di mesotelioma maligno sarcomatoso (S-MESO) paragonati a due gruppi di controllo con diagnosi certa di pleurite tubercolare (PLTB, 14 pazienti) e flogosi aspecifica (NSP, 12 pazienti). Lo studio dell'infiltrato infiammatorio è stato effettuato tramite colorazione istologica ed immunoistochimica per i marcatori delle principali cellule infiammatorie: eosinofili, mastociti, neutrofili, macrofagi, linfociti T CD3, CD4 e CD8. Lo studio dell'infiltrato delle cellule del sistema immunitario, invece, è stato svolto valutando, tramite immunoistochimica, l'espressione di alcuni specifici marcatori Th1, Th2 e Treg. Sono stati ricercati CXCR3, T-bet e STAT4 per identificare i linfociti Th1, CCR4, CRTH2, GATA3 e STAT6 per identificare i linfociti Th2 e foxp3 per i linfociti Treg, al fine di valutare la presenza di un'eventuale polarizzazione nella risposta immunitaria presente nel mesotelioma maligno di tipo Th1/Th2.

Sono state individuate differenze statisticamente significative tra i gruppi per quanto riguarda i neutrofili, gli eosinofili, i mastociti, i linfociti T CD3 e CD8. L'analisi degli specifici marcatori per i linfociti Th1 ha mostrato differenze statisticamente significative tra i gruppi per i marcatori CXCR3 e STAT4, mentre per quanto riguarda i marcatori specifici

per Th2 sono state identificate differenze statisticamente significative per i marcatori CRTH2, STAT6 e GATA3.

Il presente studio fornisce una caratterizzazione dell'infiltrazione infiammatoria e immunitaria presente nelle pleura di pazienti affetti da mesotelioma maligno. L'analisi delle molecole caratterizzanti i due sottotipi dei linfociti T helper, Th1 e Th2, non ha portato all'identificazione di una polarizzazione in senso Th1 o Th2 nei gruppi di pazienti esaminati. Dai dati analizzati, i due sottotipi di mesotelioma maligno non mostrano una polarizzazione in un senso o nell'altro, tuttavia sono state identificate differenze di espressione tra i due gruppi per quanto riguarda alcune molecole e non solamente rispetto ai gruppi di controllo.

1. INTRODUZIONE

1. INTRODUZIONE

1.1. LA PLEURA

Nonostante la pleura ed i polmoni siano organi ben separati caratterizzati da diversa origine embrionale e da differenti funzioni, essi sono fisicamente e funzionalmente associati, e per tale motivo molte condizioni patologiche colpiscono entrambi gli organi.

1.1.1. SVILUPPO EMBRIONALE DELLA PLEURA

Nei vertebrati tre differenti cavità mesodermiche primarie (la cavità pleurica, pericardica e peritoneale) derivano dalla cavità celomatica durante l'embriogenesi primaria. Durante lo sviluppo embrionale, i polmoni si accrescono all'interno delle cavità pleuriche e si ritrovano inglobati dalla pleura [1] La porzione di cavità celomatica che circonda direttamente la gemma polmonare darà origine alla pleura viscerale, mentre la porzione di cavità celomatica che è connessa alla parete toracica, al diaframma e al mediastino darà origine alla pleura parietale.

1.1.2. ANATOMIA MACROSCOPICA DELLA PLEURA

La pleura parietale e viscerale sono in continuità l'una con l'altra a livello dell'ilo polmonare. Una volta che i polmoni hanno raggiunto il completo sviluppo, la pleura viscerale e parietale si ritrovano intimamente vicine, delimitando uno spazio virtuale, praticamente nullo, separate solamente da un sottile strato di fluido ricco di glicoproteine pari a 10-20uL di volume che permette lo scivolamento dei due foglietti l'uno sull'altro.

La pleura parietale viene distinta in quattro parti: cervicale, costovertebrale, mediastinica e diaframmatica.

La pleura cervicale non è altro che la continuazione della pleura costovertebrale a livello

dell'apice dei polmoni. Si estende inferiormente a partire al margine inferiore della prima costa e si porta superiormente fino a ricoprire l'apice del polmone corrispondente, a livello del margine inferiore del collo della prima costa. Lateralmente, prosegue inferiormente continuando nella porzione mediastinica. È rinforzata dalla membrana sovrapleurica, che si inserisce nella superficie interna della prima costa anteriormente e a livello dei processi trasversi della settima vertebra cervicale posteriormente. Spesso è rinforzata anche da fascetti del muscolo scaleno minimo, che origina proprio a livello del margine anteriore del processo trasverso della settima vertebra cervicale e si inserisce sulla superficie interna della prima costa.

La pleura costovertebrale è la porzione più estesa, riveste strettamente la superficie interna dello sterno, le coste, il muscolo trasverso del torace, i muscoli intercostali e la superficie laterale delle vertebre comprese nel suo livello. Esternamente è rivestita dalla fascia endotoracica, un sottile strato di tessuto connettivo lasso che inferiormente si continua nell'addome con la fascia trasversale, posta al di sopra del peritoneo parietale. Medialmente la pleura costovertebrale si continua con la porzione mediastinica, superiormente con quella cervicale ed inferiormente con la diaframmatica. A partire dal margine inferiore della prima costa, le pleure costovertebrali scendono contigue sino alla quarta costa, poi divergono e scendono sino alla nona o decima costa. La riflessione con cui si continuano nella pleura diaframmatica, posta sopra l'omonimo muscolo, però, avviene tra la settima e l'ottava costa. A livello vertebrale, scende nel suo punto più inferiore sino alla 12^a vertebra toracica.

La pleura diaframmatica è la più sottile, ed aderisce strettamente al diaframma, posto inferiormente ad essa. Si continua superiormente con la pleura costovertebrale e medialmente con la pleura mediastinica a livello dell'inserzione del pericardio e sopra di esso.

La pleura mediastinica è la struttura che delimita lateralmente la cavità mediastinica in cui è alloggiato il cuore e si trova esternamente al pericardio, formando una superficie continua presso l'ilo del polmone. La pleura destra ricopre inoltre la vena brachiocefalica destra, la porzione superiore della vena cava superiore, parte della vena azygos, i nervi frenici e il nervo vago destri, la trachea e l'esofago, mentre la sinistra ricopre l'arco aortico, i nervi frenico e vago sinistri, il condotto toracico e una parte dell'esofago. Si continua lateralmente con la pleura costovertebrale, superiormente con la cervicale, inferiormen-

te con la diaframmatica.

La pleura viscerale è una membrana sierosa che ricopre strettamente, tale da essere pressoché indivisibile, le superfici distali del polmone comprese le scissure tra i lobi. Si estende dall'ilo entro il polmone, lungo i bronchi e i vasi sanguigni; consente la suddivisione in lobuli polmonari, masse poliedriche che contengono ciascuna un bronchiolo, ramificazioni (arteriole o venule), vasi linfatici e nervi.

La pleura parietale è irrorata dalle arterie intercostali [2], dall'arteria toracica interna e dall'arteria muscolofrenica. In particolare, la porzione costovertebrale è irrorata dalla toracica interna e da rami delle intercostali, la mediastinica da rami delle arterie bronchiali, diaframmatica superiore e toracica interna, la cervicale da rami dell'arteria succlavia, la diaframmatica da arterie vascolarizzanti la parte superiore del diaframma, con cui è strettamente adesa. Le vene delle pleure drenano nella vena cava superiore. I vasi linfatici delle porzioni cervicale e costovertebrale della pleura drenano nei linfonodi intercostali e toracici interni, quelli della diaframmatica nei linfonodi mediastinici, retrosternali e celiaci. La pleura viscerale è vascolarizzata da rami delle arterie bronchiali, che circondano le ramificazioni dei bronchi a livello dell'ilo polmonare; è drenata da ramificazioni delle vene polmonari, ma la parte più prossima all'ilo è drenata nelle vene bronchiali.

La pleura parietale, nelle sue porzioni cervicale, costo-vertebrale e diaframmatica è innervata dai nervi intercostali, mentre la porzione mediastinica e quella diaframmatica posta più prossimalmente al centro frenico, da ramificazioni del nervo frenico. La pleura viscerale è innervata da nervi viscerali che seguono il decorso dei vasi sanguigni bronchiali.

E' stato stimato che la quantità fisiologica di liquido pleurico presente in un adulto sia proporzionale al peso corporeo (0,1-0,2mL/Kg). La concentrazione proteica del liquido in condizioni fisiologiche è pari a circa 1,5g/dL [3]. Il liquido pleurico contiene normalmente pochissime cellule, tra le quali macrofagi, cellule mesoteliali e linfociti. La superficie pleurica in un individuo adulto è pari circa a 2000 cm². Il sistema linfatico gioca un ruolo critico nel mantenimento del volume fisiologico di liquido pleurico all'interno della cavità pleurica. componenti essenziali dell'anatomia linfatica presenti all'interno della pleura sono i pori, denominati stomata, presenti nella porzione caudale della pleura parietale

periferica e nella pleura parietale mediastinica [4]. Questi pori sono in grado di trasferire materiale particolato e corpuscolato direttamente nei vasi linfatici al fine di consentirne la rimozione. La maggior parte del fluido che si accumula nella cavità pleurica ha origine dai polmoni attraverso la pleura viscerale e viene assorbito principalmente attraverso la pleura parietale. In condizioni patologiche, l'eccessiva produzione o il minor drenaggio di linfa è un fattore fondamentale nella formazione del versamento pleurico. Il contenuto proteico come anche la natura e la concentrazione di componenti cellulari presenti all'interno del liquido pleurico sono spesso utili nel determinare l'eziologia della patologia in corso.

1.1.3. ANATOMIA MICROSCOPICA DELLA PLEURA

Dal punto di vista istologico la pleura allo stato fisiologico è una membrana traslucida composta di cinque strati difficilmente distinguibili al microscopio ottico (Figura 2A e 2B di [10] Figura 2.1). Questi strati, a partire dalla superficie pleurica consistono in:

1. Mesotelio (cellule mesoteliali appiattite congiunte tramite giunzioni occludenti;
2. Uno strato sottilissimo di tessuto connettivo submesoteliale;
3. Uno strato superficiale di tessuto elastico;
4. Un secondo strato di tessuto connettivo lasso, ricco di arterie, vene, nervi e vasi linfatici;
5. Uno strato profondo fibroelastico, aderente al sottostante parenchima polmonare, alla parete toracica, al diaframma o al mediastino.

Le colorazioni istologiche per il tessuto elastico sono spesso utili per evidenziare questi differenti strati. Una caratteristica ultrastrutturale distintiva delle cellule mesoteliali è la presenza di sottili microvilli rivolti verso lo spazio pleurico. Si pensa che questi microvilli permettano di aumentare la superficie al fine di aumentare il rilascio di acido ialuronico nello spazio pleurico e non sembra abbiano un ruolo di tipo drenante. I microvilli sono molto più numerosi sulle cellule mesoteliali appartenenti alla pleura viscerale rispetto a quella parietale a parità di livello intratoracico [5].

1.1.4. FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DELLA PLEURA

La pleura parietale è irrorata dai vasi sistemici arteriosi intercostali la cui pressione idrostatica capillare media è relativamente elevata: circa 30 cmH₂O. La pleura viscerale è essenzialmente vascolarizzata dai rami delle arterie bronchiali. Generalmente, in condizioni normali, si verifica una filtrazione di liquido in corrispondenza della terminazione arteriosa dei capillari e un riassorbimento del liquido in corrispondenza della terminazione venosa dei capillari stessi. In caso di sovraccarico di tale sistema il liquido residuo è riassorbito a livello dei linfatici, sia dalla pleura parietale attraverso un drenaggio superficiale nella catena mammaria interna e nei linfonodi intercostali, sia dalla pleura viscerale attraverso un drenaggio profondo per mezzo dei linfonodi mediastinici.

La dinamica di produzione di un liquido tra il versante vascolare e quello extravascolare è regolata dalla legge di Starling. Essa definisce il ruolo svolto in tale processo dalla pressione idrostatica e da quella colloidosmotica delle proteine plasmatiche nei due diversi compartimenti (vascolare ed interstiziale). Generalmente, a livello dell'estremità arteriosa dei capillari, la pressione idrostatica tende a far fuoriuscire liquido dai capillari verso la cavità pleurica, mentre a livello della estremità venosa la pressione colloidosmotica delle proteine plasmatiche, che normalmente è superiore a quella delle proteine presenti nel liquido del cavo pleurico, tende a richiamare liquido verso l'interno dei capillari.

In condizioni normali, nella circolazione sistemica l'entità dei due processi (pressione idrostatica e colloidosmotica) si bilancia e non si osserva trasferimento netto di fluido dal compartimento intravascolare a quello extravascolare. La stessa situazione è presente a livello dei vasi sanguigni che irrorano la pleura parietale e che appartengono alla circolazione sistemica: rami delle arterie intercostali e mammaria interna.

La pleura viscerale, invece, è irrorata dal circolo bronchiale-polmonare, nel quale la pressione colloidosmotica delle proteine plasmatiche è identica a quella nel circolo sistemico, mentre la pressione idrostatica presente nei capillari è lievemente più bassa. Pertanto, a questo livello, la tendenza al richiamo di liquido dalla cavità pleurica verso i capillari è superiore alla tendenza della sua fuoriuscita dai capillari. Ne consegue che fisiologicamente la pleura presenta una netta prevalenza delle forze di richiamo di liquido verso il compartimento intravascolare. Questo meccanismo risulta fisiologicamente utile al fine

di ottenere un margine di sicurezza per il possibile accumulo di liquidi all'interno della cavità pleurica. L'equilibrio produzione/riassorbimento di liquido a livello della pleura deriva dunque da un delicato gioco tra forze di filtrazione e di riassorbimento, dalla permeabilità ai liquidi della parete dei capillari, espressa dal coefficiente di filtrazione, e dalla superficie totale dei due foglietti pleurici (Figura 1.2). Le variazioni di pressione colloidosmotica presente nei capillari e nel cavo pleurico, nonché la pressione idrostatica capillare e pleurica possono spiegare i meccanismi di produzione dei versamenti pleurici patologici. In tal modo la cavità pleurica, normalmente virtuale, può in caso di lesioni gravi diventare reale, con un versamento che separa i due foglietti: liquido (versamento pleurico), aereo (pneumotorace). Talvolta, lesioni anatomiche post-infiammatorie della pleura si limitano ad un semplice ispessimento o ad una aderenza tra i due foglietti (sinfisi pleurica). Il versamento può essere libero, interessando l'intera cavità, o saccato a causa di aderenze precedenti o contemporanee.

I meccanismi in seguito ai quali possono verificarsi versamenti pleurici, in relazione alla legge di Starling, risultano prevalentemente di tre tipi.

1) Il primo meccanismo è legato all'aumento della permeabilità capillare alle proteine plasmatiche, determinando in tal caso un essudato. Gli essudati generalmente sono conseguenti a processi infiammatori della pleura o ad interessamento della da patologia neoplastica. L'aumento della permeabilità capillare alle proteine del plasma determina il trasferimento di una parte di esse all'interno del cavo pleurico, venendo perciò a diminuire la differenza delle pressioni colloidosmotiche all'interno ed all'esterno dei capillari. In seguito a ciò risulta pertanto ridotta la forza che richiama liquidi dal cavo pleurico verso il sangue capillare, mentre resta invariata quella che agisce in senso opposto. La conseguenza di tale squilibrio dà luogo alla formazione di versamenti pleurici, anche di notevole volume, con un elevato contenuto proteico $> 3 \text{ g/dl}$ e densità $> 1,016 \text{ g/cm}^3$.

2) Altro meccanismo patogenetico è rappresentato dall'aumento della pressione idrostatica nei capillari e/o dalla diminuzione della pressione colloidosmotica delle proteine del plasma, determinandosi così un trasudato. L'aumento della pressione idrostatica nei capillari si verifica caratteristicamente in corso di scompenso cardiaco congestizio, quando la pressione capillare è aumentata sia nel circolo polmonare sia in quello sistemico. Inoltre una diminuzione della pressione colloidosmotica delle proteine del plasma, che riduce la forza di riassorbimento di liquido dal cavo pleurico verso il sangue capillare, può verificarsi nella sindrome nefrosica e nelle gravi sindromi da malassorbimento ac-

compagnate da enteropatia protido-disperdente. Una combinazione di questi due fattori si osserva, ad esempio, nella cirrosi epatica, nella quale è presente sia un'ipoalbuminemia, con conseguente diminuzione della pressione colloidosmotica delle proteine del plasma, sia un aumento della pressione idrostatica nei capillari della pleura parietale. Quest'ultimo è determinato dal fatto che tali vasi sono tributari delle vene mammarie interne e della vena azygos, nelle quali si riversano i circoli collaterali venosi formati in seguito all'ipertensione portale. In rari casi i trasudati presentano meccanismi ancora oggi non del tutto definiti, come nella sindrome di Meigs, caratterizzata dalla presenza di un trasudato pleurico in donne con un tumore pelvico, frequentemente ovarico e di natura benigna (fibroma, cistoma). Caratteristicamente il trasudato all'analisi chimico-fisica presenta un basso contenuto proteico $< 3 \text{ g/dl}$ e una densità $< 1,015 \text{ g/cm}^3$.

3) Infine, altro meccanismo causa di versamento pleurico, generalmente associato ad eziologia neoplastica o traumatica, è l'accumulo nel cavo pleurico di linfa o sangue, che dà luogo rispettivamente al chilotorace e all'emotorace.

1.2. PATOLOGIA DELLA PLEURA

Le malattie neoplastiche primarie e metastatiche della pleura, come anche le patologie non neoplastiche possono mostrare simili caratteristiche radiologiche e cliniche, incluso dolore toracico masse intrapleuriche, ispessimento pleurico e versamento pleurico. Tuttavia il trattamento e la prognosi delle diverse condizioni patologiche della pleura sono notevolmente differenti. Un'accurata diagnosi della patologia pleurica è perciò estremamente importante e l'interpretazione istologica delle biopsie pleuriche è vitale per fornire una diagnosi corretta. Biopsie più piccole contribuiscono con difficoltà a caratterizzare il tipo di lesione e, per tale motivo, le colorazioni immunoistochimiche sono frequentemente utilizzate per ottenere una diagnosi precisa. Le biopsie pleuriche possono essere determinanti ma la loro utilità dipende da molti fattori quali la grandezza e qualità di tessuto pleurico utilizzabile per l'indagine che è differente se si ha a che fare con sottili ago-biopsie, biopsie toracoscopiche, decorticazione e campioni ottenuti da pneumonectomie extrapleuriche. Anche errori di campionamento e formazione di artefatti possono dare origine a difficoltà interpretative dal momento che un gran numero di patologie pleuriche benigne e maligne mostrano spesso caratteristiche istologiche simili e sovrapposte. Colorazioni immunologiche sono spesso necessarie al patologo per

raggiungere una diagnosi corretta; tuttavia questo tipo di colorazione deve essere effettuata con pannelli di anticorpi e deve essere interpretata con cautela. Esistono pannelli riconosciuti internazionalmente come lo “United States and Canadian Mesothelioma Reference Panel” e l’ “International Mesothelioma Panel” che sono molto utili nel caso di diagnosi difficoltosa.

1.2.1 PLEURITI E VERSAMENTI PLEURICI

La pleurite è un processo infiammatorio della membrana sierosa pleurica, frequentemente responsabile di versamento pleurico essudativo associato a dolore toracico di tipo trafittivo, che si acuisce con la tosse e con gli atti respiratori. I versamenti pleurici sono caratterizzati dalla presenza di un eccesso di liquido nella cavità pleurica.

Normalmente un sottile strato di 10-20 ml di liquido ricopre diffusamente la pleura parietale e viscerale. Tale liquido presenta una composizione simile al plasma ad eccezione di una minore concentrazione di proteine ($< 1,5$ g/dl). I versamenti pleurici sono distinti in trasudati ed essudati. I primi sono legati all’aumento della pressione capillare o alla riduzione della pressione oncotica; gli essudati, invece, sono associati a quadri di infiammazione della pleura, con un aumento della permeabilità dei capillari e della membrana pleurica.

1.2.1.1 DIAGNOSI

Mentre in passato si faceva ricorso a prove qualitative o semiquantitative per differenziare un essudato da un trasudato, oggi si ricorre a determinazioni quantitative precise e ad indagini più sensibili ed accurate. In passato la metodica più conosciuta era certamente quella di Rivalta. Essa consisteva nella precipitazione delle proteine del liquido di versamento in una soluzione acquosa di acido acetico al 5%. La presenza di tale precipitazione visibile come opalescenza (a spirale di fumo) del liquido pleurico versato indirizzava verso il tipo essudato.

Oggi il dosaggio delle proteine totali nel liquido di versamento è il criterio generalmente

più adottato. Nel liquido pleurico una concentrazione proteica $> 3 \text{ g/100 ml}$, così come un rapporto tra concentrazione proteica nel liquido e concentrazione siero-proteica $> 0,5$ sono indice di essudato. Altro utile criterio è la determinazione della lattico deidrogenasi (LDH) nel liquido di versamento: un rapporto LDH versamento/LDH sierica $> 0,6$ è indice di essudato. Altra caratteristica degli essudati è la presenza di numerose cellule infiammatorie: granulociti neutrofili, linfociti, monociti. Queste cellule sono messe in evidenza centrifugando il liquido di versamento ed esaminando microscopicamente il sedimento. Quando esse risultano molto abbondanti, il liquido di versamento può presentarsi opalescente o addirittura torbido, come nel caso di certi versamenti infiammatori che accompagnano polmoniti batteriche da pneumococco, *Staphilococcus Aureus*, anaerobi, *Klebsiella* e altri batteri Gram negativi. In questi casi, infatti, il liquido pleurico è talmente ricco di granulociti neutrofili da assumere un aspetto francamente purulento (empiema pleurico). Nel caso di processi patologici con ostruzione di vasi linfatici a livello dei linfonodi mediastinici inferiori, dei quali sono tributari i vasi linfatici della pleura viscerale, si raccoglie nella cavità pleurica un liquido ricco di proteine, oppure quando risulta interessato il dotto toracico, generalmente in caso di ostruzione neoplastica o traumatica, si può avere fuoriuscita di linfa nel cavo pleurico ed il versamento presenta un aspetto chilososo (chilotorace). Il chilotorace presenta un contenuto in lipidi, grassi neutri e acidi grassi, elevato con caratteristica affinità per la colorazione Sudan. Il contenuto in colesterolo è basso, mentre il livello di trigliceridi nel versamento è $> 110 \text{ mg/dl}$. In seguito a traumi, a neoplasia broncopolmonare o pleurica, o secondariamente ad esteso infarto emorragico polmonare può determinarsi un'emorragia nella cavità pleurica con versamento prevalentemente ematico (emotorace). In tal caso le proteine ematiche, riducendo la differenza tra pressione colloidosmotica del plasma e quella del versamento pleurico, favoriscono il trasferimento di liquido all'interno della cavità pleurica. L'emotorace può insorgere, anche se di rado, in seguito alla rottura di un vaso in un'aderenza pleuroparietale nel corso di uno pneumotorace spontaneo o come complicanza di un difetto coagulativo. Il sangue presente nella cavità pleurica spesso non coagula e può essere rimosso facilmente con un ago o con un tubo di drenaggio. L'aspetto pseudochilososo o colesterolico del versamento è raro. Il liquido appare dorato a causa della rifrazione dei cristalli di colesterolo visibili al microscopio. Le concentrazioni di colesterolo possono raggiungere fino 1 g/dl , mentre le concentrazioni di grassi neutri e di acidi grassi restano basse. Questo tipo di versamento è caratteristico di essudati pleurici cronici, come può avvenire nella pleurite tubercolare o nel versamento dell'artrite reumatoide.

1.2.1.2 EZIOLOGIA

L'eziologia delle pleuriti comprende differenti processi che coinvolgono la membrana sierosa in maniera diretta o secondaria. L'interessamento primario della pleura si osserva in seguito al danno alla pleura parietale da trauma, in particolare fratture costali, ferite della parete toracica, o in corso di pleurite virale epidemica, soprattutto da Cocksackie virus del gruppo B, o da quadri di esposizione ad amianto e tumori pleurici (mesotelio-mi). La patologia pleurica associata all'esposizione da asbesto, nella quale le particelle di asbesto raggiungono la pleura attraversando le vie aeree di conduzione e il parenchima polmonare, risulta ormai una della più note cause di pleurite a carattere professionale. Secondariamente la pleura può essere coinvolta da un sottostante processo polmonare infettivo, come avviene in corso di polmonite o in caso di tubercolosi.

La pleurite è definita parapneumonica quando decorre associata all'infezione polmonare, o metapneumonica se insorge successivamente alla polmonite.

Anche patologie cardiovascolari, come lo scompenso cardiaco congestizio, o più frequentemente l'infarto polmonare da patologia tromboembolica, sono associate a coinvolgimento della sierosa pleurica. Numerose patologie infiammatorie sistemiche, come le patologie sistemiche reumatiche, artrite reumatoide, periarterite nodosa, lupus eritematoso sistemico, possono presentare in alcune fasi del loro decorso un interessamento pleurico.

Ulteriori cause di pleurite sono legate all'ingresso diretto nello spazio pleurico di batteri o di sostanze irritanti dai tessuti contigui, come si osserva rispettivamente in corso di empiema o rottura esofagea e pancreatite. È possibile osservare un coinvolgimento pleurico anche in seguito al trasporto nella cavità pleurica di un agente infettivo o di una sostanza tossica o di cellule neoplastiche attraverso il circolo ematico o vasi linfatici. Processi localizzati in sede sottodiaframmatica, come ascessi sottodiaframmatici o cirrosi, possono associarsi ad interessamento pleurico (Tabella 1.1).

Tabella 1.1 Eziologia della pleurite e del versamento pleurico

1.2.1.3 PATOLOGIE ASSOCIATE A TRASUDATI PLEURICI

L'insufficienza cardiaca congestizia è la causa più frequente dei versamenti pleurici a carattere trasudativo. Essa determina un aumento della pressione venosa sistemica e dei capillari polmonari, generando un trasudato. L'ipoalbuminemia, la cirrosi e la sindrome nefrosica, a causa della riduzione della pressione colloidosmotica intravascolare, possono favorire versamenti pleurici, abitualmente bilaterali ed associati ad edemi periferici e versamenti in altre sierose. L'ascite può associarsi a trasudato, poiché il liquido presente nella cavità peritoneale può passare nella cavità pleurica attraverso vasi linfatici e lesioni del diaframma.

1.2.1.4 PATOLOGIE ASSOCIATE A ESSUDATI PLEURICI

Nei versamenti parapneumonici, la pleura viscerale che riveste il tessuto interessato dalla polmonite risulta infiammata accompagnandosi con la produzione di liquido essudativo nella cavità sierosa. Il liquido contiene molti neutrofili e può contenere batteri responsabili del processo infettivo. I versamenti parapneumonici sono generalmente causati da batteri, anche se versamenti di piccola entità possono verificarsi in corso di polmonite virale o da micoplasma. La tubercolosi può frequentemente associarsi a versamento pleurico essudativo, ed in alcuni casi può costituire una complicanza tardiva di un'infezione primaria, decorrendo in tal caso isolatamente, oppure far parte di un quadro complesso di tubercolosi postprimaria, generalmente nei soggetti con intensa risposta immunitaria tubercolare.

Le pleuriti da infezioni micotica possono associarsi ad essudato pleurico.

Nel 30-50% dei pazienti con embolia polmonare si osserva versamento pleurico essudativo. Il principale meccanismo di formazione del liquido pleurico è l'aumento di permeabilità della pleura viscerale a contatto con il polmone infartuato.

Anche le atelettasie dovute ad embolia polmonare possono associarsi ad un versamento pleurico, di solito trasudato.

Le metastasi polmonari sono un'ulteriore causa di essudati, soprattutto in soggetti anziani. Le sedi primitive più frequenti del tumore risultano il polmone (adenocarcinoma) e la mammella, anche se tumori di diversa origine possono metastatizzare alla pleura. L'ostruzione dei vasi linfatici da parte delle metastasi pleuriche è il meccanismo principale della formazione del liquido. I versamenti sono spesso di grande entità e causano dispnea. Generalmente si presentano come essudati sieroematici o francamente ematici.

Nella malattia di Hodgkin e nel linfoma non-Hodgkin il versamento pleurico è comune e può rappresentare un segno di esordio del linfoma.

Il mesotelioma maligno è il tumore primitivo della sierosa pleurica. Esso è fortemente correlato all'esposizione all'asbesto. L'incidenza in Italia è attualmente in crescita nonostante le misure legislative preventive, a causa della lunga latenza (20 anni circa) dall'esposizione al manifestarsi del processo di trasformazione neoplastica. Il tumore, che gradualmente incarcera il polmone ed invade la parete toracica, produce versamento pleurico nella maggioranza dei casi. Il liquido pleurico è rappresentato da un essudato sieroso o ematico, con glucosio < 50 mg/dl, e la sua citologia rivela cellule maligne non facilmente differenziabili dall'adenocarcinoma. L'immunoistochimica e la microscopia elettronica rendono possibile la diagnosi differenziale di questo tumore dall'adenocarcinoma.

Anche il mesotelioma fibroso benigno può essere associato a essudato con caratteristiche di densità elevata a causa della presenza di acido ialuronico.

L'esposizione all'asbesto produce un versamento pleurico benigno nel 3% circa dei lavoratori dell'asbesto dopo un periodo di latenza che varia da 5 a oltre 30 anni. Sono comuni le placche pleuriche, generalmente senza calcificazioni e circa la metà dei pazienti presenta una patologia parenchimale associata. Il versamento è un essudato, alcune volte di colore ematico.

Il LES o le sindromi lupoidi indotte dai farmaci (idralazina, procainamide, isoniazide, difenilidantoina e clorpromazina) possono causare un versamento pleurico. I farmaci responsabili sono solitamente somministrati per lunghi periodi e i sintomi regrediscono solitamente entro 10 giorni dall'interruzione della terapia, il liquido pleurico è essuda-

tivo, con predominanza di neutrofili all'inizio e di monociti più tardivamente. Il glucosio del liquido pleurico è di solito > 80 mg/dl e il complemento è basso, mentre il titolo di anticorpi anti-nucleo (ANA) tende a essere alto.

I versamenti pleurici indotti da farmaci sono rari.

La pancreatite acuta può complicarsi con un versamento pleurico para-ascitico nel 10% dei casi. L'essudato pleurico è ricco di neutrofili e contiene amilasi in maggiore concentrazione rispetto a quella sierica. Il 60% circa dei versamenti da pancreatite interessa l'ematotace sinistro.

1.2.1.5 ANATOMIA PATOLOGICA E FISIOPATOLOGIA

Il processo flogistico che interessa la membrana sierosa pleurica in corso di pleurite determina inizialmente un aspetto edematoso e congesto della sierosa. A ciò segue, rapidamente, un'infiltrazione cellulare flogistica e formazione sulla superficie pleurica di un caratteristico essudato fibrinoso. L'infiammazione dà luogo ad una iniziale fuoriuscita di proteine dall'interno dei capillari, tra cui il fibrinogeno che viene convertito in fibrina. Se il processo infiammatorio si arresta a questo stadio, la pleurite viene definita fibrinosa o secca, per l'assenza di un versamento rilevante. La deposizione di fibrina tra i due foglietti pleurici rende ruvide le superfici, determinando una stimolazione delle terminazioni sensitive che innervano riccamente la pleura parietale. L'essudato può, nel corso di alcuni giorni, essere riassorbito oppure andare incontro ad un processo di organizzazione fibrosa, causando aderenze pleuriche.

Talvolta la pleura può presentare, soprattutto dopo esposizione cronica ad asbesto, un marcato ispessimento fibroso o anche calcifico, dando luogo alle caratteristiche placche pleuriche o calcificazioni pleuriche, senza una precedente fase di pleurite acuta.

Generalmente in corso di pleurite si sviluppa un essudato pleurico per lo stravasamento di liquido ricco in proteine plasmatiche e cellule provenienti dai capillari danneggiati ed in seguito ai fenomeni infiammatori di chemiotassi. Le caratteristiche chimico-fisiche, microscopiche e citologiche del liquido pleurico risultano particolarmente importanti nel differenziare le diverse eziologie della pleurite e nel raggiungere una diagnosi clinica

(Tabella 1.2).

La meccanica ventilatoria polmonare non subisce generalmente alterazioni rilevanti in corso di pleurite con scarso versamento. Nell'evenienza di imponenti versamenti pleurici che esercitino una compressione sul polmone omolaterale, si osserva una riduzione della capacità funzionale, potendo determinare anche quadri di atelettasia, cioè di totale assenza di ventilazione nel distretto parenchimale interessato.

1.2.2. PLEURITE TUBERCOLARE

1.2.2.1 EPIDEMIOLOGIA ED EZIOLOGIA DELLA PLEURITE TUBERCOLARE

La tubercolosi rappresenta la seconda più importante causa di morte per malattia infettiva nel mondo. Dal 1990 al 2003, l'incidenza di tubercolosi è cresciuta globalmente e circa un terzo della popolazione mondiale risultata infettata da *Mycobacterium tuberculosis* [6]. La pleurite tubercolare (PLTB) scaturisce dall'infezione della pleura da parte di *M. tuberculosis* e può anche essere associata a tubercolosi polmonare [7]. La PLTB si manifesta nel 4% di nuovi casi di tubercolosi e la sua frequenza differisce nei vari paesi [7,8]. Il virus dell'HIV è stato associato con il raddoppio di incidenza di tubercolosi extrapulmonare anche nei paesi sviluppati [9].

1.2.2.2 DIAGNOSI DI PLEURITE TUBERCOLARE

A seconda dell'estensione dell'infezione il versamento si può presentare sia moderato (con risoluzione spontanea) che esteso, tanto da provocare febbre, dolore toracico e dispnea. Il liquido pleurico in tal caso si presenta come un essudato, a volte ematico. La concentrazione proteica è di valore pari al 50% rispetto a quella del siero, il valore del glucosio si presenta a livelli fisiologici mentre il pH è $< 7,2$. Nel versamento di tipo tubercolare sono presenti cellule della linea bianca (da 500 a 2500 per litro). I neutrofili predominano negli stadi iniziali mentre cellule mononucleate, tipicamente linfociti, si riscontrano principalmente in un secondo momento. Le cellule mesoteliali sono invece rare o assenti. Sebbene non sia facile identificare la presenza di bacilli acido resistenti.

stenti (Acid Fast Bacilli) nel sedimento del liquido pleurico, la conferma diagnostica di PLTB dipende dalla dimostrazione della presenza di *M tuberculosis* nel liquido pleurico o in biopsie pleuriche (2,4-vedi sopra). Il test più sensibile rimane l'analisi della biopsia pleurica toracoscopica. L'analisi istologica di biopsie di pleura parietale è in grado di dimostrare la presenza di infiammazione granulomatosa, necrosi caseosa e/o la presenza di bacilli alcol acido resistenti (acid fast bacilli). Il riscontro di DNA di *M tuberculosis* tramite PCR (polymerase chain reaction) è determinante per la diagnosi di PLTB. La PLTB si differenzia dalla pleurite aspecifica (NSP) perché in quest'ultima sono presenti infiammazione cronica e depositi di fibrina nella zona sub-pleurica [10].

1.2.2.3 PATOGENESI DELLA PLEURITE TUBERCOLARE

L'ipotesi patogenetica suggerisce che CD3 e CD4 di tipo Th1, attraverso il rilascio di INF-gamma e altre citochine della linea Th1, siano in grado di attivare i macrofagi che a loro volta sono in grado di uccidere *M tuberculosis* e antagonizzare l'effetto di citochine della linea Th2 (4-vedi sopra). È stato visto, infatti, che il liquido pleurico in corso di PLTB è ricco di linfociti, in particolare CD4 [11] e, inoltre, altri studi supportano la presenza di una polarizzazione Th1 [12-14] dal momento che i livelli di INF-gamma sono più alti. Anche l'attivazione di cellule regolatorie (linfociti T-reg, identificati tramite l'identificazione della presenza del fattore di trascrizione foxp3) possono limitare l'eccessiva risposta immunitaria e compromettere l'eliminazione di *M tuberculosis* [15, 16].

1.2.3. MESOTELIOMA

I tumori primitivi della pleura sono piuttosto rari ed interessano prevalentemente soggetti oltre la sesta decade. Il coinvolgimento metastatico della pleura è molto più frequente di quello primitivo. I principali tumori che determinano un interessamento secondario della pleura sono quelli del polmone, della mammella e dell'ovaio. I tumori primitivi, denominati mesoteliomi, possono essere a carattere benigno o maligno.

Il mesotelioma è un tumore che origina dalle cellule di derivazione mesodermica che rivestono la superficie delle cavità sierose, toracica e addominale: può interessare la

pleura, il peritoneo, il pericardio e la tunica vaginalis del testicolo.

Il mesotelioma benigno è istologicamente un fibroma e costituisce una massa delimitata, a volte pedunculata, che comprime il polmone senza invaderlo. Il mesotelioma maligno tende ad occupare estesamente il cavo pleurico ed ad invadere il polmone e altre strutture toraciche. Le sue caratteristiche istologiche esprimono il duplice potenziale evolutivo delle cellule del rivestimento mesoteliale, essendo riconoscibili aree di cellule fusate, di tipo sarcoma, e aree tubulari e papillari, di tipo carcinoma.

1.2.3.1 EPIDEMIOLOGIA ED EZIOLOGIA DEL MESOTELIOMA

Il mesotelioma maligno è una neoplasia rara ma fatale di difficile diagnosi. La malattia è correlata ad esposizione all'asbesto in più dell'80% di casi [17,18]. E' stato riportato che l'incidenza è più elevata negli uomini che nelle donne [19], Il periodo di latenza per il mesotelioma, a partire dall'esposizione iniziale di asbesto è di circa 30 anni e la mediana della sopravvivenza si attesta tra i 9 e i 12 mesi dopo la diagnosi [19]. L'organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha identificato l'asbesto come uno dei più importanti cancerogeni occupazionali e il numero di malattie dovute a quest'ultimo è attualmente in crescita. La prevalenza di mesotelioma nel mondo è poco chiara. Discroll et al hanno stimato che ogni anno più di 43000 persone muoiono per mesotelioma [20]. E' stato inoltre stimato che ogni anno si registrano all'incirca 10000 casi di mesotelioma in Australia, Giappone, Nord America e Europa occidentale [17]. Sono stati pubblicati vari lavori che indicano come l'incidenza è in aumento [21,25]. In Italia sono stati analizzati più di 8000 casi tra il 1993 e il 2004, come si evince dal registro nazionale dei tumori e si è visto che l'incidenza si attesta attorno ai 3,49 casi per 100.000 abitanti per gli uomini e 1.25 per le donne con grande variabilità nelle varie regioni. Quasi il 70% dei casi mostrava esposizione occupazionale all'asbesto e la durata dell'esposizione era mediamente di 43 anni. [26]

Alcuni studi epidemiologici prospettano nei prossimi vent'anni un aumento dell'incidenza del mesotelioma maligno, a causa dell'ampio utilizzo dell'asbesto avuto nei decenni scorsi ed in relazione al lungo periodo di latenza con cui la malattia si manifesta. Uno studio prospettico statunitense ha stimato che annualmente i casi di mesotelioma negli

Stati Uniti (circa 2500-3000) tenderanno ad aumentare fino ad un picco massimo previsto per il 2020.

L'asbesto, definito in passato "minerale magico", era conosciuto già dagli antichi egizi e menzionato da Plinio. Tuttavia l'inizio della sua estrazione e l'utilizzo a fini industriali risale al 1890, quando venne adoperato in diverse attività produttive. L'ipotesi che il mesotelioma risultasse legato all'esposizione dell'asbesto fu fatta per la prima volta da Gloyne, in Gran Bretagna, nel 1935. Nel 1960, Wagner et al dimostrarono la reale associazione di tale forma tumorale con l'attività lavorativa, riportando 33 casi di mesotelioma in minatori di crocidolite in Sud Africa. Ulteriori studi si sono succeduti, tra cui quello del 1987 di Baris et al [27], in cui si osservava uno straordinario aumento di mortalità per mesotelioma nella popolazione di alcuni villaggi siti in un'area vulcanica della Cappadocia centrale. Numerose segnalazioni sono state riportate in diversi ambienti lavorativi: miniere, cantieri navali, produzione di materiali isolanti, cemento-amianto, freni e frizioni. Tutto questo ha sollevato una delle più importanti questioni di sanità pubblica, con l'emanazione di speciali decreti (D.P.R. 303 del 1956; Direttiva C.E.E. 83/477; D.lgs. 277 del 1991). In Italia l'uso dell'asbesto è proibito dal 1992. La legge 27 Marzo 1992 n. 257 stabilisce il divieto dell'estrazione, importazione, commercializzazione e produzione dell'amianto.

L'insorgenza del mesotelioma anche in soggetti non a rischio professionale ha configurato la possibilità di un inquinamento ambientale: suolo, aria e acqua. Per i rari casi osservati in bambini, a causa della brevità del periodo di latenza, si ipotizza l'esistenza di altre cause o concause legate all'insorgenza della malattia. A tale riguardo fortemente sospetti risultano i metalli pesanti (berillio) e le radiazioni ionizzanti.

Sebbene l'asbesto sia il principale responsabile, attualmente quasi un terzo dei casi di mesotelioma interessa soggetti che non presentano una storia d'esposizione a tale fattore.

1.2.3.2.PATOGENESI DEL MESOTELIOMA

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

presentarsi in varie forme: versamento pleurico benigno, placche pleuriche, ispessimento pleurico diffuso e mesotelioma maligno diffuso.

È stato ampiamente dimostrato come la qualità aerodinamica delle diverse fibre di asbesto sia rilevante nella patogenesi delle lesioni pleuriche: un alto rapporto lunghezza/diametro permette una più profonda penetrazione nelle vie aeree, con aumentato rischio di danno polmonare e pleurico. A questo riguardo la crocidolite ed il gruppo degli anfiboli sono certamente quelli con più elevata patogenicità. Anche l'esposizione a fibre minerali asbestiformi, presenti in ambienti vulcanici, come l'erionite, rientra nell'eziologia del mesotelioma.

Le cellule mesoteliali, considerate in passato come esclusive cellule di rivestimento, giocano un ruolo importante anche nel processo infiammatorio. Ancora non chiari risultano il significato della differenziazione cellulare espressione di un polimorfismo fenotipico non legato alla grande varietà di specificità antigenica (cheratina, vimentina, CEA), e la natura delle numerose anomalie cromosomiche riscontrate all'analisi del cariotipo, comprendenti modificazioni in diversi cromosomi: 5, 7, 20, 22. Le ricorrenti mutazioni di sequenze di DNA suggeriscono che, molto probabilmente, le aree cromosomiali corrispondenti contengono geni importanti per l'iniziazione e per la progressione del tumore.

Un ruolo importante nello sviluppo delle cellule neoplastiche sembra essere svolto dall'azione dei fattori di crescita: in molti studi l'incrementata espressione dei geni per il PDGF (platelet derived growth factor, fattori di crescita derivati dalle piastrine) e del suo recettore suggerisce il ruolo che questi può avere come fattore di crescita autocrino nel mesotelioma. La stessa espressione di HGF (Hepatocyte growth factor) e del suo recettore c-met sembra coinvolta, non solo nella progressione del mesotelioma, ma anche nella sua crescita e nella relativa migrazione. Anche se nella maggior parte dei casi l'esposizione all'amianto è dovuta a motivi occupazionali o para-occupazionali, l'amianto può essere considerato, ormai, un materiale ubiquitario. Le autopsie eseguite nei grandi centri urbani hanno rilevato la presenza di fibre o corpi di amianto nei polmoni di circa il 30% della popolazione. Negli ultimi anni, il progressivo incremento dell'incidenza di mesotelioma si è osservato anche per i soggetti non a rischio professionale, configurandosi così la possibilità di un inquinamento ambientale.

L'associazione tra esposizione all'asbesto e conseguente sviluppo di mesotelioma è stato documentato in numerose specie animali tramite inalazione o inoculo subcutaneo, intrapleurico e intraperitoneale di fibre di asbesto [28-31]. Le fibre che vengono inalate all'interno del polmone causano l'infiltrazione di macrofagi circolanti nello spazio pleurico [32]. Nel cercare di fagocitare le fibre di asbesto vengono generate specie reattive dell'ossigeno con conseguente produzione di citochine infiammatorie e incremento del reclutamento delle cellule del sistema immunitario all'interno della pleura [11-14]. I tentativi ripetuti di fagocitosi da parte dei macrofagi però falliscono nel tentativo di eliminare le fibre di asbesto, portando alla continua formazione di specie reattive dell'ossigeno e alla secrezione di citochine [33]. E' stato dimostrato che questo processo di infiammazione cronica porta alla trasformazione maligna delle cellule mesoteliali in vitro [32-37].

E' stato visto che, nonostante la prognosi severa anche dopo trattamento aggressivo, i pazienti affetti da mesotelioma che vengono sottoposti a terapia immunitaria antitumorale sopravvivono più a lungo con un aumento dei linfociti T CD8+ infiltranti [38-39]. Citochine immunospressive, così come anche cellule T di tipo regolatorio, sembrerebbero infiltrare il microambiente tumorale bloccando la funzione anti-tumorale [40].

1.2.3.3. CLASSIFICAZIONE: ANATOMIA PATOLOGICA ED IMMUNOISTOCHEMICA

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

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

Macroscopicamente il mesotelioma ha una apparenza stereotipata ma all'esame microscopico dimostra una spiccata diversificazione della sua strutturazione cito-architetto-

nica tanto da esprimere vari tipi neoplastici. Malgrado la sua origine da una sola linea cellulare, esistono mesoteliomi che sono di natura esclusivamente epiteliale o completamente mesenchimale od ancora forme da commistione fra tumore sarcomatoide e tumore epiteliale. La classificazione istologica del mesotelioma pleurico considera quattro tipi fondamentali di mesotelioma (Tabella 1.3).

Tabella 1.3. Classificazione istologica del mesotelioma pleurico

La forma epiteliale è caratterizzata dalla presenza di formazioni pseudoghiandolari, cordoni e papille superficiali di cellule con aspetto epiteliale. Tali cellule mostrano alcune somiglianze con i carcinomi, particolarmente adenocarcinomi, con formazione tubulare. I tubuli sono di solito allineati con un semplice epitelio cubico, supportato da uno stroma fibroso di aspetto benigno, che spesso forma noduli rotondi. Un pattern tubulopapillare dell'epitelio è comune, ma in tumori poco differenziati sono stati riscontrati strati o trabecole di cellule poligonali. Nella distinzione con l'adenocarcinoma la presenza di mucina epiteliale intracellulare (diastasi PAS-positiva) può essere distinta dalla mucina acida delle cellule mesoteliali (acido ialuronico) mediante la colorazione ialuronidasi-alcian blu. I casi che presentano un incerto inquadramento possono essere supportati dalla microscopia elettronica: le cellule mesoteliali, entrambe benigne e maligne, sono riconoscibili grazie ai loro lunghi microvilli. La forma sarcomatoide presenta cellule fuse con atteggiamenti fibromatosi e sarcomatosi. Fibre collagene e reticolari possono essere trovate tra le cellule tumorali con speciali colorazioni e qualche volta il collagene è presente in grande quantità. I mesoteliomi sarcomatosi sono distinguibili dalle fibrosi pleuriche benigne per la maggiore cellularità, per la presenza di cellule più larghe e per un numero più elevato di mitosi. La forma bifasica o mista presenta pattern epiteliali e sarcomatosi, in varia proporzione. È la forma di più comune riscontro, tanto che alcuni autori sostengono che se manca la dimostrazione del carattere bifasico la diagnosi di mesotelioma maligno è sempre alquanto incerta. La forma benigna, definita anche mesotelioma fibroso solitario, è tipicamente di tipo fibroso (a cellule fuse); in sezione ricorda i fibromi, spesso con spazi cistici ripieni di liquido, delimitati da cellule epiteliali mesoteliali. I tumori benigni si presentano come formazioni polipoidi peduncolate, originanti prevalentemente dalla pleura viscerale. Possono trovarsi raramente nel mediastino, nella tunica vaginale del testicolo, nelle cavità paranasali e nel fegato. Le caratteristiche anatomopatologiche determinano un aspetto di massa solitaria ben circoscritta,

più o meno lobulata, non infiltrante le strutture vicini, di dimensioni da qualche cm a 20 cm e oltre. Al microscopio la formazione è delimitata da mesotelio appiattito e costituita da tessuto cellulare di elementi in gran parte fusiformi fittamente stipati, disposti disordinatamente o in brevi fasci, intrecciati a formare grossolani accumuli reciprocamente separati da collagene ialino. Le cellule fusate presentano scarso citoplasma, debolmente eosinofilo, e nuclei ovalari normocromici per lo più privi di nucleoli; le mitosi sono molto rare. I tumori fibrosi localizzati mostrano un singolo pattern istologico nella maggioranza dei casi, due pattern differenti in una minoranza e tre o più patterns raramente. Il gruppo più comune presenta una combinazione tra cellule simili ai fibroblasti e tessuto connettivo in varia proporzione e in modo disordinato o casuale; il secondo pattern istologico più comune simil-emangiopericitoma è osservato nel 25% dei tumori. Dal punto di vista immunoistochimico i tumori solitari sono tipizzati dalla positività alle colorazioni per vimentina e desmina e dalla negatività per cheratina. Per la diagnosi differenziale con altri tumori mesenchimali può risultare utile la determinazione della proteina S100, dell'actina, dell'antigene leu-7-cd57 e dell'enolasi neurone specifica, la cui negatività permette di escludere l'origine neuronale, vascolare o muscolare della formazione. Tuttavia, non esistono criteri definitivi per determinare il possibile comportamento aggressivo o maligno del tumore. La resezione chirurgica della lesione risulta, quindi, indispensabile sia per chiarire la diagnosi sia per attuare l'unica terapia attualmente proponibile.

Per il mesotelioma maligno, al fine di una corretta diagnosi istologica del tumore, grande ruolo hanno assunto negli ultimi anni le caratteristiche istochimiche, con l'utilizzo della PAS-positività e della colorazione Alcian blu, e le caratteristiche immunoistochimiche, come la positività per cheratina e vimentina. L'impiego di anticorpi monoclonali diretti contro antigeni di membrana di cellule epiteliali permette una buona discriminazione tra mesotelioma e adenocarcinoma; anche la microscopia elettronica, in casi dubbi, svolge un ruolo significativamente rilevante nella diagnosi differenziale. Le forme monofasiche a morfologia epiteliale, essendo costituite da elementi cellulari disposti in cordoni solidi, papille o in formazioni pseudoghiandolari, pongono il problema di operare una diagnosi differenziale con le localizzazioni secondarie alla pleura di adenocarcinoma. Analogo problema differenziale esiste con le iperplasie reattive del mesotelio, quando le cellule si dispongono in file che mimano la forma maligna. Tra le metodiche istochimiche la dimostrazione dell'acido ialuronico è poco specifica, in quanto quest'acido può essere sintetizzato anche da elementi mesenchimali immaturi presenti in altri tipi di tumore.

Il mesotelioma produce acido ialuronico, a differenza degli adenocarcinomi metastatici che producono mucosostanze neutre. Entrambe le neoplasie possono reagire positivamente con il PAS, ma dopo trattamento con diastasi, i citoplasmi risultano PAS-negativi nel mesotelioma, mentre rimangono positivi nell'adenocarcinoma. In molti casi il mesotelioma risulta Alcian blu positivo, essendo l'acido ialuronico una sostanza mucoide acida. Tuttavia un trattamento con ialuronidasi negativizza la reazione. Nei rari casi di adenocarcinoma, in cui siano presenti sostanze Alcian blu positive, la ialuronidasi non ha invece alcun effetto. La colorazione al mucicarminio, positiva negli adenocarcinomi, è generalmente negativa nei mesoteliomi. In un quarto dei casi di mesotelioma è possibile evidenziare con il Van Gieson (tricromica) i globi di collagene nel centro di alcuni aggregati cellulari. Numerosi studi immunoistochimici hanno individuato anticorpi specifici in grado di distinguere, routinariamente su tessuto incluso in paraffina, un mesotelioma da un adenocarcinoma metastatico. L'intensità di colorazione per la citocheratina CAM 5.2 è uguale in tutti i tipi di mesotelioma, mentre l'intensità con citocheratina AE1/AE3 diminuisce passando dal tipo epiteliale al tipo sarcomatoide. La colorazione con vimentina è più intensa per il tipo sarcomatoide, mentre con l'antigene di membrana epiteliale (EMA) è più intensa la forma epiteliale. Il tipico pattern per un mesotelioma con un fenotipo epiteliale o prevalentemente epiteliale presenta una reazione negativa o debole per vimentina, una forte reazione per le citocheratine (CAM 5.2, AE1/AE3), e una reazione molto forte per EMA. Per il tipo sarcomatoide o prevalentemente sarcomatoide il tipico pattern è rappresentato da una forte reazione alla vimentina e citocheratina CAM 5.2, una debole reazione alla citocheratina AE1/AE3, e una negativa o debole all'EMA. Si osserva, in tal modo, che un piccolo pannello di anticorpi può risultare molto utile a definire il profilo immunofenotipico dei differenti tipi istologici di mesoteliomi. Considerando l'intensità media delle colorazioni immunoistochimiche per i differenti tipi di mesotelioma e considerando la forma mista suddivisa in prevalentemente epiteliale e prevalentemente sarcomatoide, il quadro può essere visualizzato dalla Tabella 1.4.

Tabella 1.4. Caratteristiche immunoistochimiche dei differenti istotipi di mesotelioma

1.2.3.4 STADIAZIONE DEL MESOTELIOMA

L'International Mesothelioma Interest Group (IMIG) ha sviluppato un sistema di stadia-

zione, basato sul TNM, per il mesotelioma pleurico maligno. Questo sistema è basato sull'analisi delle informazioni derivate dall'impatto dello stato T ed N sulla sopravvivenza. La descrizione T (designata come T1, T2, T3, T4) fornisce una precisa definizione anatomica dell'estensione locale del tumore primitivo. Le descrizioni N (designate come N0, N1, N2, N3) definiscono l'interessamento delle stazioni linfonodali. Negli stadi I e II sono classificati i gruppi con migliore prognosi di T1 e N0. La positività dei linfonodi definisce lo stadio III, mentre tumori localmente avanzati non operabili (T4) e interessamento extratoracico (N3 o M1) sono classificati in stadio IV

1.2.3.5.DIAGNOSI, PROGNOSI E TERAPIA DEL MESOTELIOMA

Le principali problematiche nella gestione del mesotelioma maligno diffuso della pleura sono legate a una diagnosi spesso effettuata già negli stadi avanzati della malattia. Ciò a causa sia dei limitati ed aspecifici reperti clinico-diagnostici nelle fasi precoci, sia per la difficoltà incontrata nella classificazione istologica delle masse e delle cellule mesoteliali maligne, potendosi esse presentare con diverse varianti cito-istologiche. La lunga latenza, dal periodo di esposizione a quello di insorgenza della neoplasia, ha favorito l'identificazione di potenziali markers capaci di evidenziare, in soggetti con pregressa esposizione, la neoplasia in uno stadio precoce.

Come tutti i tumori, la vita pre-clinica del mesotelioma è estremamente lunga, se paragonata alla vita clinica, quindi può essere sfruttato un ampio spazio cronologico per l'utilizzo di marcatori tumorali. L'aumento dell'acido ialuronico sierico e pleurico, dell'antigene peptidico tissutale, uno stato di trombocitosi e di linfocitosi pleurica e alveolare, con aumento dei linfociti CD4 pleurici, sono quadri che possono associarsi alla presenza di un mesotelioma pleurico maligno, anche se con una bassa specificità.

Molte volte la diagnosi di mesotelioma risulta non facile né clinicamente né istologicamente, né tanto meno all'esame citodiagnostico. In tal caso l'anamnesi risulta fondamentale. Se il soggetto non proviene da sedi geografiche ad alto rischio o non presenta un'anamnesi lavorativa positiva all'esposizione ad asbesto, l'esordio clinico è indistinguibile da quello di una pleurite cronica con versamento. Solo l'aspetto recidivante del versamento può indurre il sospetto di mesotelioma.

Le diverse forme di mesotelioma (maligno diffuso, maligno localizzato e fibroso benigno) possono presentarsi clinicamente in modo differente, in base al numero e alla gravità delle strutture interessate dalla malattia.

Il mesotelioma maligno diffuso di tipo epiteliale si associa spesso a reperti clinici che richiamano quelli dei carcinomi, piuttosto che dei sarcomi: diffusione del tumore da estensione diretta, ampio versamento pleurico, versamento pleurico controlaterale, ascite, metastasi in linfonodi regionali e occasionale risposta alla radioterapia. Il tipo sarcomatoso è associato a segni clinici tipici dei sarcomi: più frequenti metastasi a distanza, versamento scarso o assente, ridotto tempo di sopravvivenza. I mesoteliomi misti presentano caratteristiche cliniche di entrambi: grandi versamenti pleurici come il tipo epiteliale e ridotta sopravvivenza come quello sarcomatoso. La più comune modalità di presentazione del mesotelioma maligno diffuso della pleura è quella di una pleurite cronica con versamento emorragico e recidivante.

I sintomi più frequentemente associati alla neoplasia sono rappresentati da: dolore toracico (nel 45% circa dei casi) e dispnea progressiva (nel 60% dei casi), che generalmente si sviluppa insidiosamente nel corso di mesi. Il mesotelioma maligno diffuso della pleura è un tumore con evoluzione verso l'invasione di tutte le superfici pleuriche e l'incarceramento del polmone, che inevitabilmente porta a morte entro 2 anni dalla diagnosi.

Il reperto di cellule neoplastiche nel liquido pleurico è abituale, ma la diagnosi citologica risulta spesso poco sensibile e specifica. Sono pertanto raccomandate biopsie pleuriche, toracotomiche o toracoscopiche, nei pazienti in cui si sospetta un mesotelioma maligno e che presentino un esame citologico negativo del liquido pleurico.

Radiograficamente, è spesso presente un versamento pleurico unilaterale. In alcuni casi può mancare o raramente essere bilaterale. Il mediastino può essere spostato controlateralmente o fissato al centro. Nelle fasi avanzate l'incarceramento polmonare può portare il mediastino verso l'emittoce interessato. La radiografia del torace può mostrare, in assenza di versamento, l'ispessimento nodulare della pleura o la presenza di asbestosi del polmone controlaterale con placche pleuriche. Alla TC risulta più chiaro il quadro di versamento pleurico con ispessimento nodulare della pleura e il grado di interessamento degli organi contigui. I test di funzionalità respiratoria, in genere, evidenziano una ma-

lattia restrittiva progressiva mentre l'emogasanalisi, fino alle fasi avanzate, non subisce grosse alterazioni. Gli esami ematochimici possono mostrare un quadro di trombocitosi, aumentati livelli di proteine nella fase acuta e aumento della VES.

La diagnosi di mesotelioma pleurico richiede, pertanto, una valutazione diagnostica speciale attraverso la toracentesi e, soprattutto, la biopsia pleurica. La toracentesi rivela, nelle fasi iniziali, un versamento color paglierino o sieroematico o francamente ematico, con carattere di essudato. Il liquido pleurico è emorragico, comunque a carattere essudatizio, viscoso per la ricchezza di acido ialuronico, riccamente cellulato. Le cellule tumorali sono presenti solo nel 65% dei casi, essendo il tumore poco esfoliativo. La diagnosi istologica risulta indispensabile. La biopsia pleurica permette di ottenere campioni adeguati per rilevare direttamente le caratteristiche della massa pleurica. I campioni ottenuti attraverso la biopsia percutanea sono spesso insufficienti, essendo in genere piccoli e difficilmente centrati per permettere una corretta diagnosi. Sono da considerarsi maggiormente appropriate le biopsie tramite toracosopia o a cielo aperto. Nella diagnosi differenziale bisogna ricordare che la pleura è frequentemente interessata secondariamente da tumori polmonari (sia per invasione che per via linfatica od ematica), da tumori mammari e da neoplasie di altra origine.

Il mesotelioma maligno pleurico mostra una prognosi infausta; la sopravvivenza media è di meno di 12 mesi dalla diagnosi e la sopravvivenza a 5 anni è inferiore al 5%. Attualmente non esistono trattamenti riconosciuti o standardizzati per questa patologia [41].

Nel mesotelioma pleurico la terapia chirurgica è raramente attuabile. La terapia medica prevede introduzione di farmaci antitumorali nel cavo pleurico e pratiche destinate ad ottenere sinfisi pleurica (tetracicline ed aspirazione). La malattia è diagnosticata in stadio I in non più del 25% dei casi; in tale stadio la terapia di elezione è rappresentata da un intervento chirurgico molto demolitivo (pleuropneumonectomia).

La sopravvivenza a 2 anni dall'intervento di pleuropneumonectomia è compresa tra il 20% e il 30%, ma meno del 10% dei pazienti è vivo dopo 5 anni. Questo vuol dire che l'intervento chirurgico assicura una sopravvivenza a lungo termine in meno del 2% dei pazienti affetti da mesotelioma pleurico. La radioterapia ha un ruolo esclusivamente palliativo.

Dal punto di vista terapeutico sono stati presi in considerazione diversi aspetti della malattia. La crescita del mesotelioma in una cavità chiusa e la tendenza a rimanere localizzato può presentare diversi vantaggi terapeutici, grazie alla ridotta diffusione sistemica di farmaci tossici, all'alta concentrazione di essi in diretto contatto con le cellule tumorali e ad una possibile stimolazione immunitaria locale. Questi aspetti sono risultati particolarmente adatti per l'immunoterapia con citochine, come IFN o IL-2, difficilmente accessibili alle cavità sierose per via sistemica. Inoltre, un approccio intracavitario è ideale per una possibile terapia fotodinamica e genica. La mancanza di un'efficace terapia per il mesotelioma maligno ha dato ampio stimolo allo sviluppo di modelli in vitro e con topi nudi o syngeneici, utili per lo studio degli effetti che sostanze chimiche e immunologiche possono avere sulle cellule mesoteliali e per valutare la resistenza del mesotelioma ai diversi farmaci. La terapia sistemica o intracavitaria è difficile da valutare perché le casistiche sono numericamente limitate e i mezzi di valutazione della risposta obiettiva sono spesso imprecisi. Solo i dati più recenti della letteratura fanno costantemente riferimento alla TAC e alla risonanza magnetica per la quantificazione dimensionale della risposta. La maggior parte dei farmaci chemioterapici, utilizzati come agenti singoli, ha un'attività inferiore al 20% di risposte obiettive. Il farmaco più utilizzato, a scopo palliativo, è l'adriamicina, somministrato a dosi di 60-75 mg/m² ogni 3 settimane. Gli studi di polichemioterapia con adriamicina/cisplatino, mitomicina-C/cisplatino, gemcitabina/cisplatino hanno mostrato risultati apparentemente superiori a quelle ottenibili con singoli farmaci, ma la sopravvivenza non è sembra generalmente influenzata.

1.3. RISPOSTA IMMUNITARIA Th1 E Th2

È nella fase iniziale della risposta all'antigene che viene deciso il destino funzionale di una cellula T CD4 naive. I meccanismi che controllano questa fase iniziale della differenziazione funzionale dei linfociti T non è ancora del tutto definita. Certamente svolgono un ruolo essenziale le citochine presenti nel microambiente linfatico in cui avviene il primo incontro con l'antigene. Se una cellula T CD4 incontra l'antigene in presenza di IL-12 e/o IFN- γ , essa diverrà preferenzialmente una cellula effettrice T helper di tipo 1 (Th1), mentre sarà contestualmente inibita la sua differenziazione in cellula effettrice T helper di tipo 2 (Th2). Poiché generalmente IL-12 ed IFN- γ sono prodotti da macrofagi e cellule

NK attivati nelle prime fasi della risposta a patogeni intracellulari, si comprende perchè le risposte verso tali patogeni siano dominate da meccanismi effettori messi in atto da cellule T CD4 di tipo Th1. Viceversa, uno stimolo antigenico che avvenga in assenza di IL-12 o di IFN- γ consente alla cellula T naive di utilizzare la IL-4 prodotta in maniera auto-crina dalle stesse cellule T naive per differenziare in un effettore Th2 produttore IL-4 ed IL-10. Queste due citochine peraltro svolgono un'azione inibitoria sulla differenziazione Th1, consentendo una polarizzazione della risposta adottiva in senso Th2. Altre possibili fonti di IL-4, indispensabile alla maturazione T in senso Th2, sono: le cellule T NK. Le cellule effettrici CD4 Th1 e Th2 costituiscono due prototipi polarizzati e mutuamente esclusivi della risposta adottiva e presentano fra loro notevoli differenze funzionali. Le cellule Th1, ma non le Th2, producono IFN- γ e TNF- α , mentre le cellule Th2, ma non le Th 1 producono IL-4 ed IL-5. La capacità di esprimere un diverso profilo citochinico implica l'espressione di funzioni diverse. Le cellule Th1 sono in grado di attivare in modo massimale i monociti/macrofagi coinvolgendoli nei cosiddetti "fenomeni di ipersensibilità ritardata", nonchè di indurre in tali cellule l'espressione di attività pro-coagulante e produzione di fattore tissutale in grado di iniziare nel microambiente capillare la cascata coagulativa fino alla deposizione di fibrina ed alla microtrombosi. I linfociti Th1, inoltre, inducono i linfociti B a produrre preferenzialmente anticorpi opsonizzanti e fissanti il complemento. Per contro, le cellule Th2 sono in grado di svolgere una maggiore attività di supporto alla sintesi di immunoglobuline (Ig), inducendo anche risposte di classe IgE ed IgG; sono in grado di interagire con mastociti e granulociti eosinofili, di cui guidano la maturazione, la differenziazione, l'attivazione, supportandone peraltro una prolungata sopravvivenza. Le cellule Th2 svolgono inoltre un'azione inibitoria sull'attivazione macrofagica indotta dalle cellule Th 1 e mediante la IL-10 inibiscono la produzione di IL-12. I prototipi Th1 e Th2 si distinguono anche per la diversa attività citotossica e per le modalità di espressione dell'attività helper per la risposta umorale. Mentre le cellule Th2, generalmente prive di attività citotossica, esprimono una incondizionata attività helper per la sintesi di tutte le classi Ig, le cellule Th1, generalmente dotate di potenziale citotossico, svolgono un'attività helper per le maggiori classi Ig, ma non per le IgE a causa della loro produzione di IFN- γ e della mancata produzione di IL-4. Inoltre, la co-espressione da parte dei Th1 di attività helper e citotossica fa sì che in certe condizioni la seconda prevalga sulla prima, con riduzione della risposta umorale. Questo, che si configura come un meccanismo di autocontrollo della funzione helper per la risposta Ig, è dovuto al fatto che le cellule Th1 potenzialmente citotossiche, attivate dal riconoscimento dell'antigene

presentato dai linfociti B, possono sia lisare i linfociti B mediante perforine e granzymes, sia esprimere in membrana il ligando di Fas che, interagendo con la molecola Fas espressa dai linfociti B attivati, trasferisce ad essi un segnale di morte programmata (apoptosi). È opportuno sottolineare che la maggior parte delle risposte adottive non dà luogo a meccanismi polarizzati in senso Th1 o Th2, ma piuttosto si esprime attraverso la differenziazione T in una cellula effettrice che assomma in diversa misura le caratteristiche di entrambi i prototipi. Tali cellule T CD4 sono state definite Th0 sia perchè hanno un profilo citochino- funzionale misto dipendente dai rapporti quantitativi fra le varie citochine prodotte, sia perchè verosimilmente rappresentano uno stadio differenziativo immediatamente precedente quello terminale e polarizzato in senso Th1 o Th2. Dopo attivazione e conseguente secrezione di citochine, le cellule effettrici Th0 esprimono alcuni marcatori di membrana quali ad esempio CD30 (indotto da IL-4) ed il "Lymphocyte Activation Gene (LAG)-3" (indotto da IFN- γ), le cui forme troncate possono peraltro venire secrete in forma solubile. La polarizzazione in senso Th1 o Th2 condiziona anche l'espressione di tali marcatori, consentendo l'associazione di CD30 con la secrezione di citochine Th2 e di LAG-3 con quella di citochine Th1. Lo stesso avviene per quanto concerne l'espressione dei recettori per alcune chemochine e questo può contribuire all'esasperata dicotomia Th1 o Th2 osservabile in alcuni distretti durante alcune risposte adottive (od immunopatologiche). Oltre al tipo di citochine presenti al momento del primo riconoscimento dell'antigene da parte del linfocita T naive, altri fattori sembrano influenzare il destino della differenziazione T. Un certo ruolo svolto dal tipo di APC (cellula dendritica, cellula di Langerhans, macrofago, linfocita B) che la cellula T naive incontra in relazione alle modalità della sua successiva differenziazione in cellula T effettrice. Anche la via di ingresso dell'antigene può influenzare lo sviluppo preferenziale di risposte Th1 (ad es. via parenterale) o Th2 (ad es. attraverso le mucose). In alcuni modelli, un certo ruolo viene attribuito ad alcuni segnali ormonali. Mentre i glucorticoidi sembrano promuovere la produzione di IL-4 e di alcune risposte Th2, altri ormoni steroidei sembrano potenziare le risposte Th1. L'esempio più convincente è quello offerto dal progesterone, che in vitro promuove preferenzialmente risposte Th2 ed incrementa l'espressione di IL-4 e CD30. Le cellule Th2 sono molto importanti nella realizzazione di un'efficace e rapida risposta umorale nei confronti di patogeni extracellulari con alto ritmo replicativo, marcata invasività ed eventuale capacità di liberare esotossine. Una volta fagocitati, tali patogeni non possono più replicare all'interno dell'APC ed i loro antigeni vengono presentati con relativa bassa densità. Al contrario le cellule Th1 sono più adatte a fronteggiare infezioni da patogeni

intracellulari, in cui è essenziale l'eliminazione della cellula infettata o l'attivazione massimale delle capacità battericide del macrofago che ospita il patogeno. Una volta trascorso un periodo di 4-5 giorni necessario all'attivazione del linfocita T naive, questo, divenuto cellula effettrice, perde l'espressione di L-selectine che lo ancorano nel linfonodo ed acquisisce delle integrine che gli permettono, una volta divenuto ricircolante, di aderire alle molecole di adesione espresse dalle cellule endoteliali del distretto tessutale periferico sede dell'infezione. La migrazione in periferia è una funzione importante per le cellule T effettrici citotossiche CD8 o CD4 Th1 in quanto esse debbono andare ad attivare i macrofagi nella sede di flogosi. La principale funzione effettrice delle cellule Th2 è invece interagire con i linfociti B nell'ambito del tessuto linfatico, inducendoli alla proliferazione, alla formazione dei centri germinativi e da ultimo alla differenziazione in plasmacellule. La quota di anticorpi prodotta dalle prime plasmacellule, oltre che fornire supporto specifico al meccanismo difensivo, serve anche ad intrappolare l'antigene nel tessuto linfatico in forma di immunocomplessi legati alla superficie delle cellule dendritiche follicolari. Questo contribuisce al fenomeno della selezione dei linfociti B, favorendo l'espansione dei cloni che per mutazione ipersomatica hanno espresso un recettore Ig ad affinità sempre maggiore. La maggior parte delle plasmacellule ha una vita media di 2-3 giorni, poi va incontro ad apoptosi. Alcuni linfociti B attivati e divenuti plasmoblasti lasciano i centri germinativi e migrano in periferia (midollo, cute, mucose) dove maturano in plasmacellule a lunga vita. Numerose osservazioni in corso di malattie infettive umane ed in modelli sperimentali hanno consentito di definire nell'ambito della generale complessità delle risposte immuni il contributo specifico che l'attivazione preferenziale di ciascuno dei due meccanismi di risposta, rispettivamente Th1 e Th2, sembra offrire nei confronti di un'ampia serie di agenti patogeni. Una diversificazione funzionale in rapporto al profilo delle citochine prodotte è presente anche nell'ambito delle cellule T CD8+. In analogia con la classificazione delle cellule CD4, i linfociti T citotossici (Tc) sono stati codificati come Tc1, Tc0 o Tc2 sulla base del loro profilo citochinico.

1.3.1 MOLECOLE ESPRESSE DAI Th1

1.3.1.1. CXCR3

Chemokine (C-X-C motif) receptor 3 (CXCR3) è un recettore appartenente alla famiglia

dei recettori accoppiati a proteine G (GPR). E' anche denominato CD183 e CPR9. Esistono due varianti di questo recettore, la variante CXCR3-A che lega le chemochine CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) e CXCL10 (I-TAC) [42] mentre la variante CXCR3-B che può anche legare CXCL4 oltre che le chemochine appena menzionate.[43].CXCR3 è espresso principalmente dai linfociti T attivati, dalle cellule Natural Killer (NK) [44] e da alcune cellule epiteliali ed endoteliali. Insieme al recettore CCR5 è principalmente espresso dalla linea dei linfociti T helper di tipo 1. I ligandi di CXCR3 che attraggono le cellule Th1 sono in grado anche di inibire la migrazione delle cellule Th2 in risposta di ligandi Th2 specifici, amplificando la polarizzazione Th1 nel reclutamento linfocitario. Il segnale viene trasdotto dal momento che il legame al recettore dei suoi ligandi CXCL9, CXCL10 e CXCL11 è in grado di incrementare il contenuto intracellulare di Ca^{2+} e attivare così la fosfoinositide 3 kinasi (PIK3) e le Mitogen-activated protein kinase (MAPK) [45] CXCR3 è in grado di regolare il traffico linfocitario. Tramite il legame delle chemochine induce vari tipi di risposta cellulare, tra cui l'attivazione di integrine, modificazioni a livello citoscheletrico e migrazione tramite chemotassi. I ligandi di CXCR3 attraggono le cellule Th1 promuovendo la maturazione delle Th1 stesse. Come conseguenza di questa stimolazione, le risposte cellulari sono spesso rapide e brevi. I recettori intracellulari, infatti, sono velocemente defosforilati e riportati sulla superficie cellulare.

1.3.1.2. T-bet

T-box transcription factor TBX21 anche noto come T-bet è una proteina codificata dal gene TBX21. Questo gene è membro di una famiglia di geni che codificano per proteine con un comune sito di legame per il DNA, il T-box. Codificano, quindi, per una famiglia di fattori di trascrizione coinvolti nel processo di sviluppo cellulare. E' stato dimostrato che T-bet è un fattore di trascrizione specificamente espresso dai linfociti T helper di tipo 1 ed è in grado di controllare l'espressione delle citochine Th1 quali IFN-gamma. L'espressione di tale proteina è correlata con l'espressione di IFN gamma sia nei Th1 che nelle NK, suggerendo un ruolo nell'inizio dello sviluppo dei Th1 a partire da Th naive. [46].

1.3.1.3. STAT4

Le Signal Transducer and Activator of Transcription sono membri di una famiglia di fattori di trascrizione che si attivano in risposta a diverse citochine. [47-48]. Queste proteine sono localizzate nel citoplasma e sono in grado di attivarsi rapidamente tramite fosforilazione tirosinica attraverso recettori associata alle citochine JAK (Janus Kinases), divenendo così capaci di legare il DNA tramite la formazione di un dimero che migra nel nucleo e si lega al DNA attivando geni in risposta alle citochine. E' stato dimostrato che STAT4 viene attivato da IL-12 citochina prevalentemente espressa dai Th1 e che topi knock out per STAT4 dimostrano una diminuita risposta Th1 [49-50]. STAT4 una volta, attivato, regola la trascrizione del gene che codifica per IFN-gamma [51,52].

1.3.2 MOLECOLE ESPRESSE DAI Th2

1.3.2.1 GATA3

Trans-acting T-cell-specific transcription factor (GATA-3) è una proteina codificata dal gene umano GATA3. GATA3 appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione zinc-finger e possiede un ruolo importantissimo nello sviluppo delle cellule T e nella fisiologia delle cellule endoteliali. E' stato dimostrato che GATA3 è in grado di promuovere la secrezione di citochine Th2 quali IL-4, IL-5 e IL-13. La trascrizione di GATA 3 è attivata dal fattore STAT6 [53] che a sua volta è sotto il controllo della citochina IL-4 [54]. In condizioni di polarizzazione Th1, l'espressione di GATA3 risulta essere inibita [55].

1.3.2.2. CRTH2

CRTH2 (Chemoattractant Receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells) è un recettore accoppiato a proteina G espresso principalmente dai linfociti Th2, dagli eosinofili e dai basofili. Il recettore media l'attivazione e la chemotassi di queste cellule in risposta alla prostaglandina D2 (PGD2), principalmente prodotta a sua volta dai mastociti. Tramite l'interazione con CRTH2 PGD2 sembra essere coinvolta nel reclutamento delle cellule nei siti di allergia e quindi a sua volta responsabile dell'amplificazione dei processi

di infiammazione di tipo allergico.

1.3.2.3. STAT6

STAT6 è un fattore di trascrizione codificato dal gene umano STAT6 [56]. STAT4 ha un ruolo essenziale nel favorire l'espressione delle citochine pro-infiammatorie IL-4 IL5 che a loro volta hanno un ruolo centrale nella risposta immunitaria Th2 mediata. [57,58].

1.3.2.4. CCR4

CCR4 Chemokine (C-C motif) receptor 4 (CCR4) è una proteina che appartiene alla famiglia dei recettori di membrana accoppiati a proteine G. Lega molteplici ligandi quali: CCL2 (MCP-1) ;CCL4 (MIP-1); CCL5 (RANTES) ;CCL17 (TARC);CCL22 (Macrophage-derived chemokine). Questo recettore è principalmente espresso da linfociti Th2 [59].

1.3.3 Foxp3

Foxp3 (forkhead box P3) è una proteina membro della famiglia delle proteine FOX. Queste molecole sono fattori di trascrizione forkhead/winged-helix. Foxp3 possiede un ruolo centrale nello sviluppo delle cellule T di tipo regolatorio [60]. Studi in vivo hanno dimostrato che foxp3 possiede un ruolo critico nella tolleranza immunitaria, in modo particolare del sistema self.

2. SCOPO DELL TESI

2. SCOPO DELLA TESI

Il mesotelioma maligno è una neoplasia rara ma fatale di difficile diagnosi. La malattia è correlata ad esposizione all'asbesto in più dell'80% di casi [17,18]. A partire dall'esposizione iniziale di asbesto il periodo di latenza per il mesotelioma è di circa 30 anni e la mediana della sopravvivenza si attesta tra i 9 e i 12 mesi dopo la diagnosi [19]. Sebbene l'asbesto sia il principale responsabile, attualmente, quasi un terzo dei casi di mesotelioma interessa soggetti che non presentano una storia d'esposizione a tale fattore. Poco è noto sui meccanismi molecolari che portano alla trasformazione neoplastica delle cellule mesoteliali. E' stato visto che fibre inalate di asbesto causano l'infiltrazione di macrofagi circolanti nello spazio pleurico, che tentano di fagocitare i corpi estranei [32]. I tentativi ripetuti di fagocitosi da parte dei macrofagi però falliscono nel tentativo di eliminare le fibre di asbesto, portando alla continua formazione di specie reattive dell'ossigeno e alla secrezione di citochine [33]. E' stato dimostrato che questo processo di infiammazione cronica porta alla trasformazione maligna delle cellule mesoteliali in vitro [32-37]. Sono rari gli studi che valutano tali meccanismi di infiammazione cronica e di attivazione immunitaria direttamente sui soggetti e in particolare sulle biopsie di pazienti con diagnosi di mesotelioma pleurico maligno, poiché tali campioni sono di difficile reperimento.

Questa tesi si prefigge gli obiettivi di:

1. Studiare la risposta infiammatoria in biopsie pleuriche umane prelevate da pazienti con diagnosi di mesotelioma maligno;
2. Studiare della risposta immunitaria in biopsie pleuriche umane prelevate da pazienti con diagnosi di mesotelioma maligno;
3. Valutare la presenza di un'eventuale polarizzazione nella risposta immunitaria presente nel mesotelioma maligno di tipo Th1/Th2 tramite la ricerca di specifici recettori per le chemochine e fattori di trascrizione. In particolare lo studio dei recettori per le chemochine permette di comprendere con quali meccanismi vengono selettivamente reclutati i differenti tipi cellulari. Lo studio dei fattori di trascrizione permette di capire i meccanismi con cui le cellule infiammatorie sono attivate in risposta a diversi stimoli;

4. Caratterizzare la diversa risposta immunitaria/infiammatoria nei due sottotipi di mesotelioma maligno pleurico più frequenti, il mesotelioma maligno epitelioide e il mesotelioma maligno sarcomatoso.

Tale studio permetterà di fornire un tassello nella comprensione dei meccanismi coinvolti nel reclutamento e nell'attivazione delle cellule infiammatorie e del sistema immunitario presenti nel mesotelioma maligno pleurico.

3. MATERIALI E METODI

3. MATERIALI E METODI

3.1. SOGGETTI

Nell'archivio del Servizio di Broncologia dell'U.O. di Pneumologia ed Endoscopia Toracica, sono stati individuati 49 pazienti in precedenza sottoposti a biopsia della pleura parietale durante una seduta di toracosopia medica. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli studi di Parma.

Sono stati selezionati 23 pazienti affetti da mesotelioma pleurico maligno:

- 1) 15 pazienti affetti da MESO epitelioide (E-MESO)
- 2) 8 pazienti affetti da MESO sarcomatoide (S-MESO)

inoltre, sono stati selezionati due gruppi di controllo:

- 3) 12 pazienti affetti da flogosi aspecifica (NSPI)
- 4) 14 pazienti affetti da pleurite tubercolare (PLTB)

Lo studio è stato eseguito su campioni di pleura parietale inclusi in paraffina, selezionati tra i pazienti che negli anni compresi tra il 1996 e 2006 sono stati sottoposti a toracosopia medica. I dati clinici (Tabella 3.1) sono stati raccolti dalle cartelle cliniche dei singoli pazienti oppure contattando il medico di famiglia. La diagnosi di mesotelioma epitelioide o sarcomatoso, pleurite tubercolare e flogosi aspecifica è stata confermata in modo indipendente da tre patologi che hanno considerato sia le analisi istologiche che microbiologiche che di biologia molecolare eseguite sulle biopsie di ogni singolo paziente. I campioni utilizzati in questo studio sono stati prelevati quindi prima di eventuali trattamenti antitubercolari, antiinfiammatori e antitumorali.

Tabella 3.1. Dati Clinici				
	PLTB	NSP	E-SARCO	S-SARCO
Numero di soggetti	14	12	15	8
Età (anni)	38 (33,62)	69 (64,76)	74 (65,79)	72,5 (67,65)
Genere (M/F)	10/4	10/2	7/8	4/4
Gruppo etnico	Caucasian 7/14 Afri- can 2/14 Asiatic 5/14	Caucasian 12/12	Caucasian 15/15	Caucasian 8/8
Dati espressi come mediana (range iterquantile)				

Tutti i campioni sono stati ottenuti da soggetti che, in presenza di un versamento pleurico di tipo essudativo, sono stati sottoposti a Toracosopia medica presso l'Unità di Malattie Respiratorie ed Endoscopia Toracica dell'Ospedale di Parma.

3. 2. TORACOSCOPIA MEDICA

La toracosopia medica è stata eseguita in sala endoscopica con il paziente in anestesia locale e in respiro spontaneo [61,62]. Lo pneumotorace unilaterale è stato indotto rimuovendo il liquido pleurico e sostituendolo con aria. In alcuni casi è stato creato durante l'esame utilizzando un ago da pneumotorace [61]. Prima di iniziare la manovra è stato ottenuto un accesso venoso periferico e predisposto il monitoraggio elettrocardiografico e saturimetrico in continuo. I pazienti sono stati posizionati in decubito laterale sul tavolo operatorio, con il lato interessato rivolto verso l'alto. Si è scelto di utilizzare lo spazio intercostale che permetteva una migliore esplorazione del cavo pleurico.

Dopo aver appropriatamente allestito il campo operatorio, è stato anestetizzato lo spazio intercostale d'accesso con 15-20 ml di lidocaina al 2%. E' stata, quindi, praticata incisione di 6-7 mm e dissezione dei tessuti per permettere l'inserzione del trequarti nello spazio pleurico. E' stato inserito un trequarti rigido dal diametro di 7-mm (Richard Wolf, Germany) e la cavità pleurica è stata sottoposta ad ispezione preliminare con ottica diretta (0°) e angolare (50°). Il liquido pleurico è stato completamente aspirato e la cavità pleurica è stata esaminata in modo sistematico.

Durante la toracosopia, sono stati prelevati campioni multipli (dai 10 ai 15) di pleura parietale dai siti sospetti. Dopo controllo dell'emostasi, lo strumento è stato rimosso e la procedura è stata terminata inserendo nella cavità pleurica un tubo di drenaggio da 24 F al fine di rimuovere l'eventuale liquido pleurico rimasto e permettere la riespansione polmonare. Nelle 24 ore successive alla toracosopia, sono stati monitorati i parametri vitali ed è stata eseguita radiografia del torace per valutare la riespansione polmonare.

3. 3. ANALISI DEL LIQUIDO PLEURICO

Il liquido pleurico è stato inviato al laboratorio e analizzato. Sono stati valutati il pH, i markers biochimici, è stata eseguita colorazione di Gram e di Ziehl-Nielsen, colture batteriche e micobatteriche e conta leucocitaria differenziale. Alcuni campioni di liquido pleurico sono stati inviati al Dipartimento di Anatomia Patologica per l'esame citopatologico.

3. 4. ANALISI DELLE BIOPSIE PLEURICHE

Le biopsie pleuriche sono state colorate con Ziehl-Nielsen e messi in coltura convenzionale per Mycobacterium Tuberculosis con aggiunta di BACTEC (Becton Dickinson, USA) un sistema di coltura micobatterico radiometrico. Il rilevamento di Mycobacterium Tuberculosis attraverso PCR è stato eseguito come precedentemente descritto [63].

I campioni biotici sono stati fissati con formaldeide tamponata al 4% e inclusi in paraffina. Sono state eseguite sezioni seriali da 6 µm per l'analisi istochimica e sezioni seriali da 4 µm per l'analisi immunoistochimica. I preparati sono stati montati su vetrini [64].

In sezioni seriali abbiamo esaminato l'espressione di markers molecolari di cellule CD3, CD4 e CD8, macrofagi, neutrofili, granulociti eosinofili, mastociti, Th1 (cellule STAT4, Tbet, e CXCR3+), Th2 (cellule CCR4, CRTH2, Gata-3 e STAT6+), T-reg (cellule FOXP3+) e Th17 (RORC2 mRNA).

3.4.1. COLORAZIONI ISTOLOGICHE

Le colorazioni istologiche eseguite sulle sezioni di pleura parietale sono state effettuate per la valutazione del numero di mastociti e di eosinofili. Per determinare tale infiltrato cellulare, due sezioni di pleura parietale di ciascun paziente sono state colorate rispettivamente con blu di toluidina per 30 minuti [2% blu di toluidina in acido cloridrico 0.7M a pH 2.7; Sigma, St. Louis, MO [65] ed ematossilina eosina (H/E).

3.4.2. IMMUNOISTOCHIMICA

Le analisi immunoistochimiche sono state eseguite per la valutazione delle restanti cellule infiammatorie ed immunitarie infiltranti la pleura parietale dei pazienti.

Le colorazioni immunoistochimiche sono state eseguite in sezioni sequenziali di pleura parietale di tutti i soggetti esaminati, come descritto in letteratura [64].

L'anticorpo primario, le condizioni di smascheramento, i kit per l'analisi, il cromogeno utilizzato e i relativi controlli positivi sono riassunti nella Tabella 3.2A e 3.2B. Qualora indicato, dopo aver deparaffinato e reidratato le sezioni di pleura al fine di esporre gli epitopi immunoreattivi, è stata inattivata l'attività della perossidasi endogena incubando i vetrini in acqua ossigenata al 3% in acqua distillata seguito da un lavaggio in acqua distillata. Successivamente le membrane delle cellule sono state permeabilizzate con una soluzione allo 0.1% di saponina. I legami aspecifici sono stati bloccati usando un siero di bloccaggio per 20 minuti a temperatura ambiente. I campioni, poi, sono stati incubati per un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo primario. Per i controlli negativi sono state utilizzate immunoglobuline aspecifiche provenienti dallo stesso animale in cui era stato ottenuto l'anticorpo primario e alla medesima concentrazione. Controlli positivi sono stati inclusi in ogni ciclo di immunocolorazione eseguito. Dopo ripetuti lavaggi in PBS/saponina 0,1% le sezioni di pleura parietale sono state incubate con l'anticorpo secondario per trenta minuti a temperatura ambiente. Dopo ulteriori lavaggi, è stato aggiunto un reagente di amplificazione per trenta minuti sempre a temperatura ambiente. Infine, dopo lavaggio, le sezioni sono state incubate con un cromogeno specifico. Le sezioni, infine, sono state controcolorate con ematossilina e montate con montante permanente o acquoso in base alle caratteristiche del cromogeno utilizzato.

Tabella 3.2A. Anticorpo primario, condizioni di smascheramento, kit per l'analisi, cromogeno utilizzato e relativi controlli positivi								
Anticorpo	Produttore	Codice	Ospite	Diluizione	Smascheramento	Anticorpo secondario e kit di amplificazione	Cromogeno	Controllo positivo
CD3	DAKO	A0452	Rabbit	1:75solution of 600mg/ml	Microwave, 50 mM EDTA, pH8	Vectastain Elite kit	DAB	Tonsil
CD4	Novocastra (now Leica Microsystems)	NCL-CD4-1F6	Mouse	1:50 solution of 50 mg/ml	Microwave, 50 mM EDTA, pH8	Ultravision LP kit	DAB	Tonsil
CD8	Thermo-scientific	RM-91160	Rabbit	1:50 solution of unknown concentration	Microwave, W-CAP TEC Buffer pH 8 Bio-Optica	Vectastain Elite kit	DAB	Tonsil
CD68	DAKO	M0876	Mouse	1:100 solution of 40 mg/ml	Microwave,10 mM citrate, pH 6	Vectastain Elite kit	DAB	Tonsil
Neutrophil elastase	DAKO	M0752	Mouse	1:50 solution of 110 mg/ml	Trypsin 0.125% solution	Vectastain Elite kit	Fast Red TR/ Naphtol AS-MX	Tonsil
Mast cell tryptase	DAKO	M07052	Mouse	1:50 solution of 85 mg/ml	Trypsin 0.125% solution	Ultravision LP	Fuchsin substrate chromogen system	Tonsil

3.4.3. CONTEGGIO DELLE CELLULE PER LE COLORAZIONI ISTOLOGICHE ED IMMUNOISTOCHEMICHE EFFETTUATE

La colorazione delle singole cellule è stata valutata tramite esame microscopico. Le cellule colorate sono state quantificate in tutte le sezioni colorate. L'analisi di immagine è stata effettuata utilizzando un microscopio ottico (Olympus, Albertslund, Denmark) integrato con videocamera (JVC Digital color, JVC A/S, Tatstrup, Denmark) e PC con l'applicazione Image pro-Plus Software (Media Cybernetics; www.mediacy.com) per quantificare l'area analizzata. I risultati delle colorazioni istologiche e immunoistochimiche sono stati espressi come numero di cellule positive per mm² e numero di cellule immunoreattive per mm².

3.5. ANALISI STATISTICA

I risultati sono espressi come mediana (range interquantile) per via di deviazioni significative dalla normalità (Test di Kolmogorov-Smirnov). Le differenze tra i gruppi sono state valutate utilizzando il Kruskal-Wallis test e il Dunn's test per confronti multipli. I coefficienti di correlazione sono stati calcolati utilizzando il metodo dei ranghi di Spearman. Sono stati considerati significativi i valori di probabilità $p < 0,05$. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando Prism 4 per Macintosh (v 4.0b, GraphPad Prism software inc., San Diego, California, USA).

4. RISULTATI

4. RISULTATI

4.1 DATI CLINICI

L'età dei pazienti è risultata essere significativamente più alta nei pazienti sia con NSP con E-MESO e con S-MESO rispetto a quelli con PLTB (rispettivamente $p<0,05$, $p<0,001$ e $p<0,05$) (Figura 4.1, Tabella 3.1).

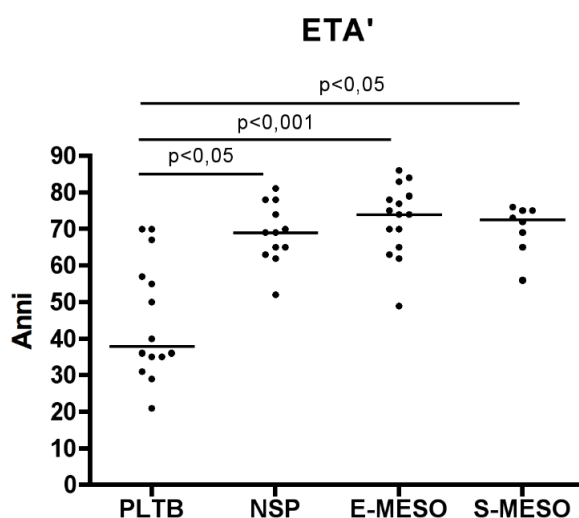


Figura 4.1. Età dei pazienti.

4.2. INFILTRATO INFIAMMATORIO E IMMUNITARIO

Dall'analisi del numero medio per mm² di cellule infiammatorie che infiltrano la pleura parietale dei pazienti affetti da E-SARCO e S-SARCO, risulta che non vi sono differenze statisticamente significative nel numero di cellule infiammatorie per mm² presenti nelle sezioni analizzate rispetto a quelle dei due gruppi di controllo (Figura 4.2). La mediana del numero di cellule infiammatorie conteggiate per ogni singolo tipo per mm² di pleura parietale esaminata è indicata nella Tabella 4.1.

Tabella 4.1. Infiltrato infiammatorio e immunitario				
	PLTB	NSP	E-MESO	S-MESO
MACROFAGI (CD68+)	375,7 (178,4-605,4)	375,7 (218,9, 573)	437,8 (340,5-578,4)	570,6 (102,9-735,3)
NEUTROFILI (ELASTASE+)	2,703 (0-13,51)	5,405 (0-56,76)	0(0-10,81)	185,3 (85,29-458,8)
EOSINOFILI (EMATOSI-LINA EOSINA)	55,88 (23,53-200)	26,47 (14,71-126,5)	17,65(11,76-35,29)	0 (0-0)
MASTOCITI (TOLUIDINE BLUE)	0 (0-0)	16,22 (0- 37,84)	0 (0-5,405)	0 (0-0)
MASTOCITI (TRYPTASE+)	0 (0-5,405)	37,84 (16,22-140,5)	0 (0-5,405)	0 (0-0)
LINFOCITI T CD3	1484(602,7-2327)	300(183,8-464,9)	524,3(151,4-735,1)	3324(2562-4318)
LINFOCITI T CD4	1141 (732,4-2135)	781,1 (416,2-1011)	956,8 (454,1-1184)	826,5 (176,5-1085)
LINFOCITI T CD8	186,5(94,59 -254,1)	156,8(51,35-254,1)	189,2(91,89- 627)	726,5 (476,5-1044)
Dati espressi come mediana (range iterquantile)				

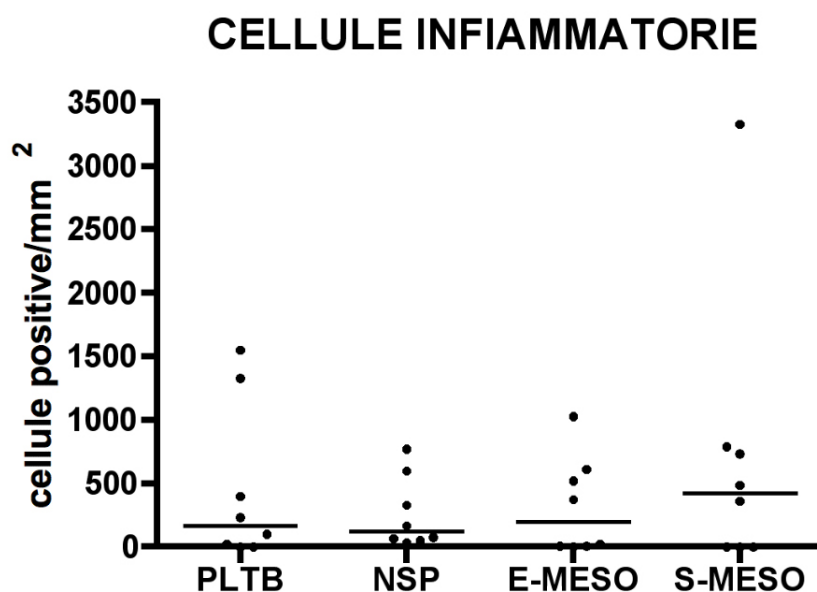


Figura 4.2. Cellule infiammatorie.

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nel numero di macrofagi (identificati col marker di superficie CD68) presenti nella pleura parietale dei soggetti con mesotelioma sia sarcomatoso che epitelioide rispetto ai gruppi di controllo con pleurite tubercolare e flogosi aspecifica (Tabella 4.1 e Figura 4.3).

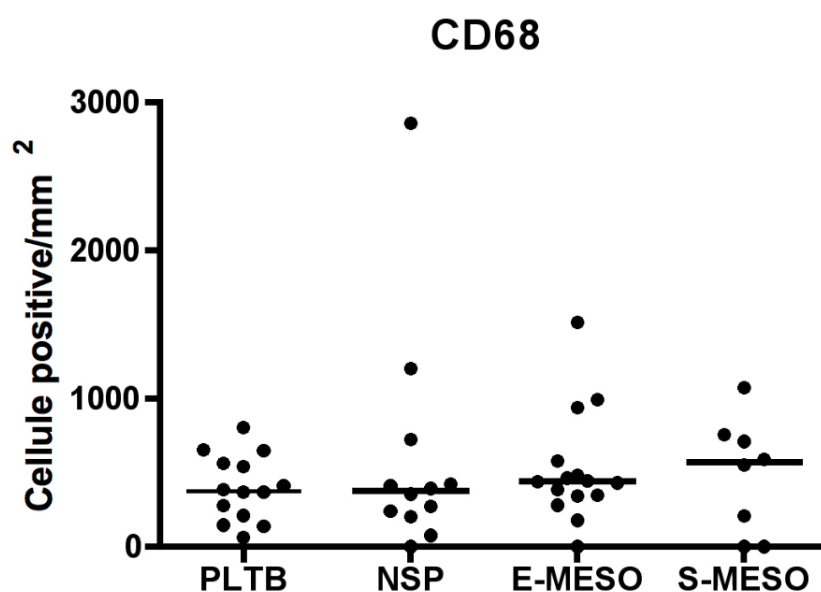


Figura 4.3. Cellule CD68+.

I neutrofili infiltranti sono stati identificati tramite il loro specifico marcatore elastasi. I risultati ottenuti sono rappresentati numericamente in Tabella 4.1 e graficamente nella Figura 4.4.

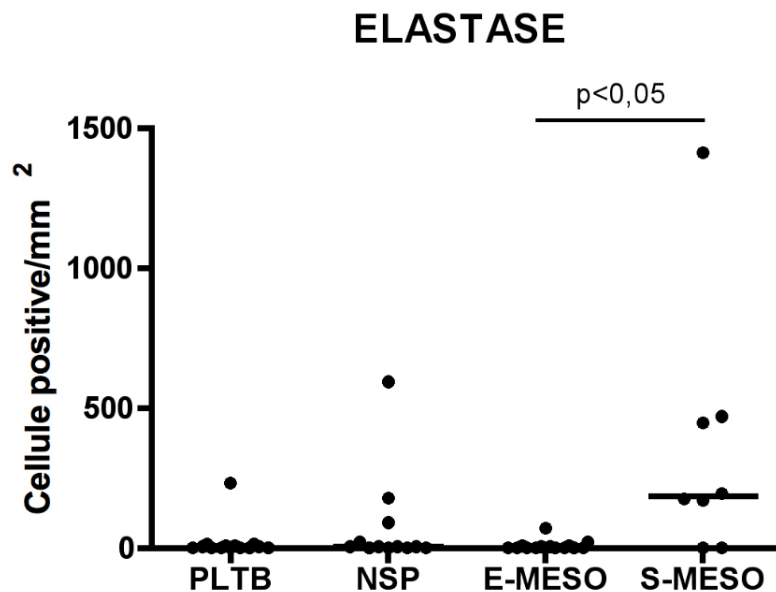


Figura 4.4. Cellule elastase+.

Il numero di neutrofili identificati nelle biopsie di pleura parietale è risultato essere bassissimo nei soggetti affetti da E-MESO e nei gruppi di controllo mentre nel gruppo di pazienti con diagnosi di S-MESO il numero di neutrofili infiltranti era superiore. Tale risultato era significativamente più alto rispetto al gruppo affetto da E-MESO ($p < 0,05$).

Tramite la colorazione istologica ematossilina/eosina sono stati identificati gli eosinofili (Tabella 4.1 e Figura 4.5). Il numero di eosinofili è risultato essere superiore nelle biopsie dei soggetti con S-MESO in maniera statisticamente significativa rispetto ai due gruppi di controllo ($p < 0,001$ rispetto a PLTB e $p < 0,01$ rispetto a NSP). Anche rispetto al gruppo di pazienti con diagnosi di E-MESO il numero era significativamente più elevato ($p < 0,05$).

EOSINOFILI

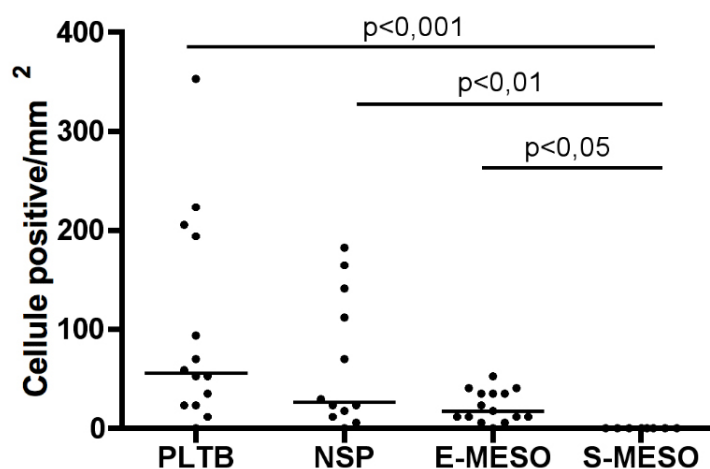


Figura 4.5. Eosinofili indentificati tramite colorazione istologicaematossilina/eosina.

I mastociti sono stati identificati tramite due tipi di colorazioni. Una colorazione istologica, il blu di toluidina, e una colorazione immunoistochimica, che sfrutta la ricerca dello specifico marcatore per i mastociti tryptase. Tramite le due tipologie di colorazione si sono ottenuti i medesimi risultati: è stato identificato un numero maggiore di mastociti più alto statisticamente significativo nel gruppo di controllo con diagnosi di NSP sia rispetto al gruppo affetto da PLTB ($p<0,01$) che rispetto al gruppo di pazienti con S-MESO ($p<0,01$) dove il numero di mastociti riscontrati era pressoché nullo (Tabella 4.1 e Figure 4.6 e 4.7).

BLU DI TOLUIDINA

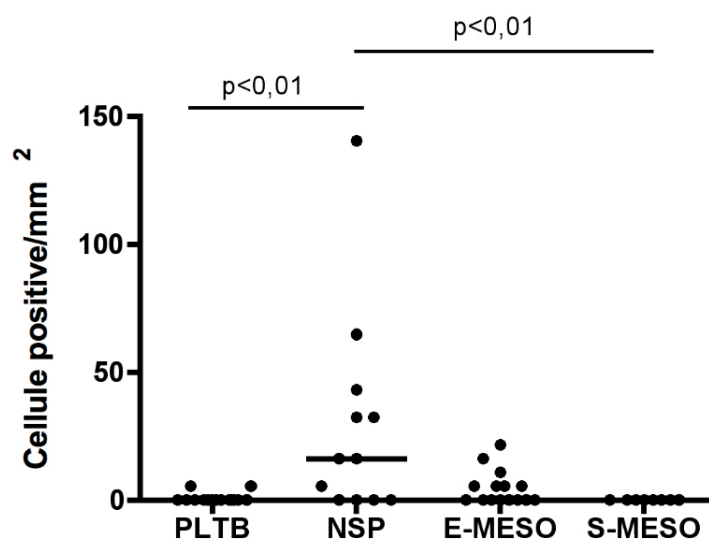


Figura 4.6. Mastociti indentificati tramite colorazione istologica blu di toluidina.

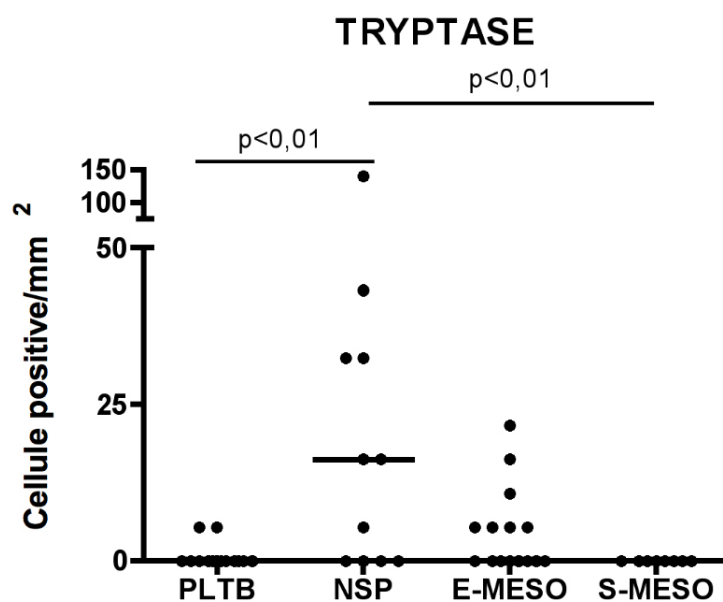


Figura 4.7. Cellule tryptase+.

Il numero di linfociti T CD3+ è risultato essere maggiore in modo statisticamente significativo nel gruppo di soggetti con S-MESO (Tabella 4.1 e Figura 4.8) sia rispetto al gruppo con diagnosi di E-MESO ($p < 0,001$) che rispetto al gruppo con diagnosi di NSP ($p < 0,001$). Anche il gruppo di controllo PLTB mostra un numero più alto di CD3+ significativamente più alto rispetto al secondo gruppo di controllo NSP ($p < 0,01$).

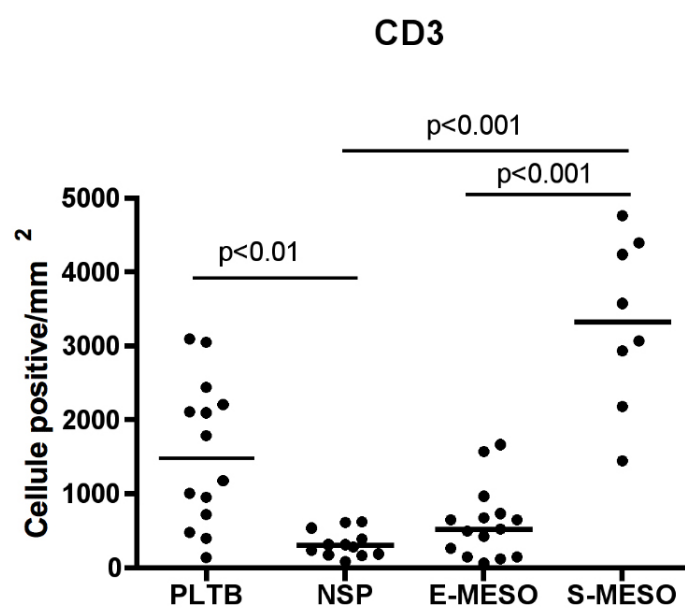


Figura 4.8. Cellule CD3+.

Il numero di linfociti T CD4+ non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i due gruppi di pazienti affetti da mesotelioma pleurico maligno e i due gruppi di controllo (Tabella 4.1 e Figura 4.9).

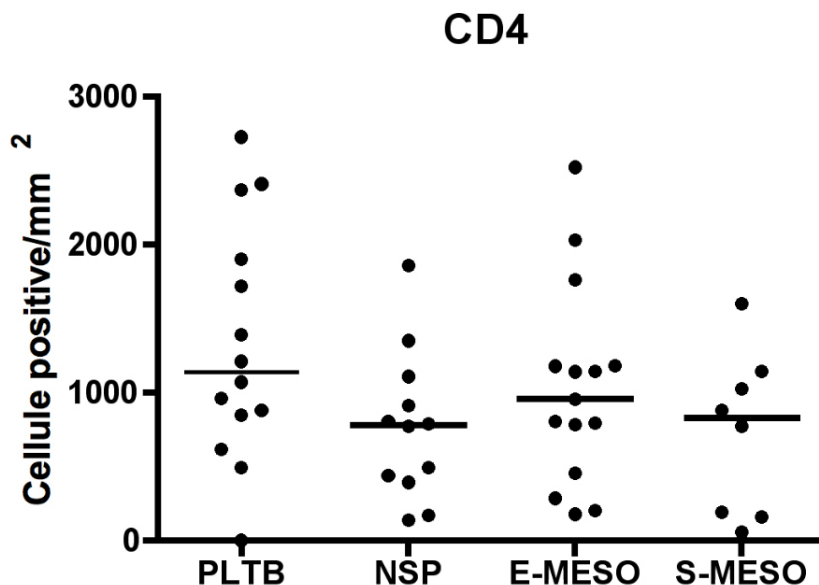


Figura 4.9. Cellule CD4+.

La pleura parietale dei pazienti con diagnosi di S-MESO mostra un numero più elevato di linfociti CD8+ statisticamente significativo rispetto a entrambi i gruppi di controllo ($p < 0,01$ rispetto a PLTB e $p < 0,05$ rispetto a NSP). I risultati relativi a questa cellula immunitaria sono illustrati nella Tabella 4.1 e nella Figura 4.10.

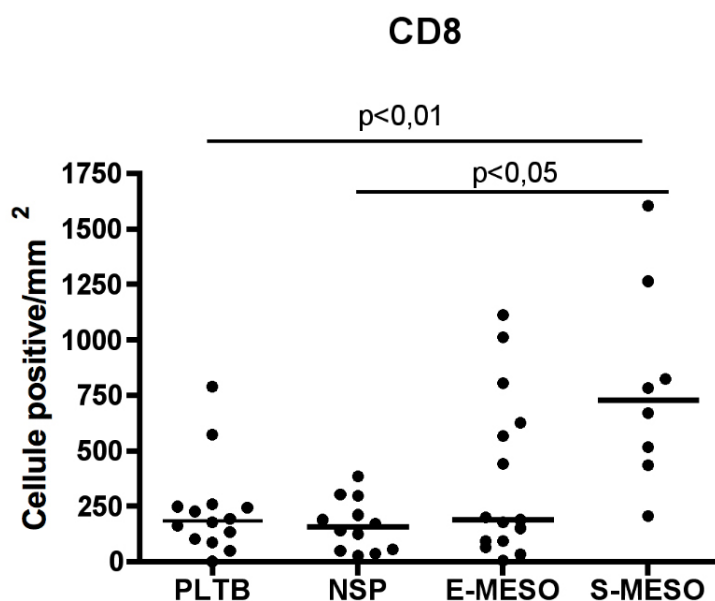


Figura 4.10. Cellule CD8+.

4.3. INFILTRATO LINFOCITARIO Th1 Th2 e Treg

4.3.1 LINFOCITI Th1

I linfociti Th1 sono stati identificati tramite la ricerca di quattro marcatori specifici: un recettore per le chemochine, CXCR3e e due fattori di trascrizione T-bet e STAT4 (Tabella 4.2).

Il numero di cellule CXCR3+ è risultato essere molto basso nel gruppo di pazienti affetti da S-MESO. Tale valore era più basso in modo statisticamente significativo rispetto a tutti gli altri gruppi di pazienti esaminati, in particolare rispetto a NSP ($p<0,05$), rispetto a PLTB ($p<0,01$) e rispetto al gruppo di soggetti affetti da E-MESO ($p<0,001$). I risultati ottenuti sono rappresentati nella tabella 4.2 e nella figura 4.11.

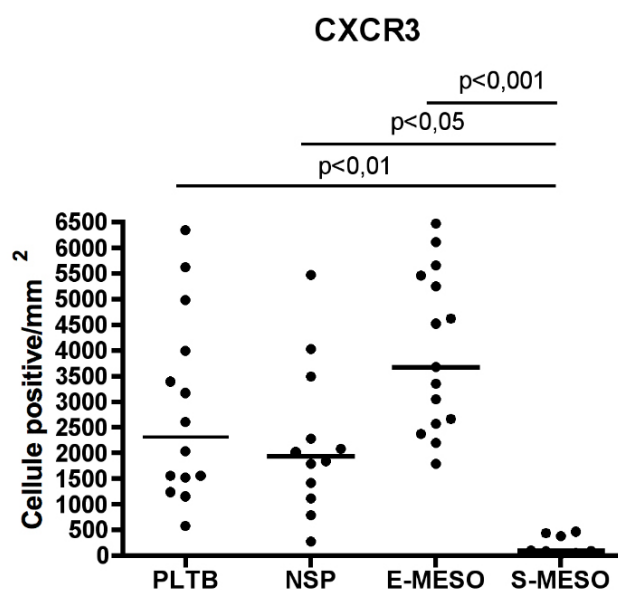
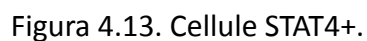
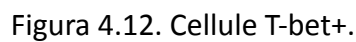


Figura 4.11. Cellule CXCR3+.

Tabella 4.2. Infiltrato linfocitario Th1, Th2, Treg				
	PLTB	NSP	E-MESO	S-MESO
CXCR3	2322 (1378-4489)	1930 (1270-2886)	3676(2568-5465)	94,12 (67,65-408,8)
T-bet	8,108 (0-43,24)	0 (0-13,51)	5,405 (0-16,22)	0 (0-0)
STAT4	235,1 (173-486,5)	194,6 (97,3-443,2)	243,2(124,3-313,5)	2438 (2218-3085)
CCR4	5,405 (0-5,405)	0(0-0)	0 (0-10,81)	0 (0-0)
CRTH2	1308 (602,7-3249)	1419 (1268-2119)	3011 (1405-4497)	0 (0-670,6)
GATA3	0 (0-13,51)	416,2 (227-745,9)	378,4 (5,405-1157)	0 (0-344,1)
STAT6	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1585 (1247-2263)
foxp3	21,62 (0-83,78)	5,405 (0-10,81)	5,405 (0-16,22)	0 (0-61,76)
Dati espressi come mediana (range iterquantile)				



Il numero di cellule STAT4+ per mm² è risultato essere più elevato nelle biopsie dei pazienti con S-MESO rispetto a tutti gli altri gruppi considerati. Il valore era significativamente più alto rispetto al gruppo con PLTB ($P < 0,01$), rispetto al gruppo con diagnosi di NSP ($p < 0,001$) e rispetto al gruppo di soggetti con E-MESO ($p < 0,001$). I risultati relativi a questo marcatore Th1 sono rappresentati nella Tabella 4.2 e in figura 4.13.

4.3.2 LINFOCITI Th2

I marcatori di superficie CCR4 e CRTH2 e i fattori di trascrizione GATA3 e STAT6 sono stati utilizzati per identificare i linfociti Th2 nelle pelure dei gruppi di pazienti esaminati.

Non sono state identificate differenze statisticamente significative nel numero di cellule CCR4+ nei 2 gruppi di pazienti con mesotelioma rispetto ai gruppi di controllo utilizzati (Tabella 4.2 e Figura 4.14).

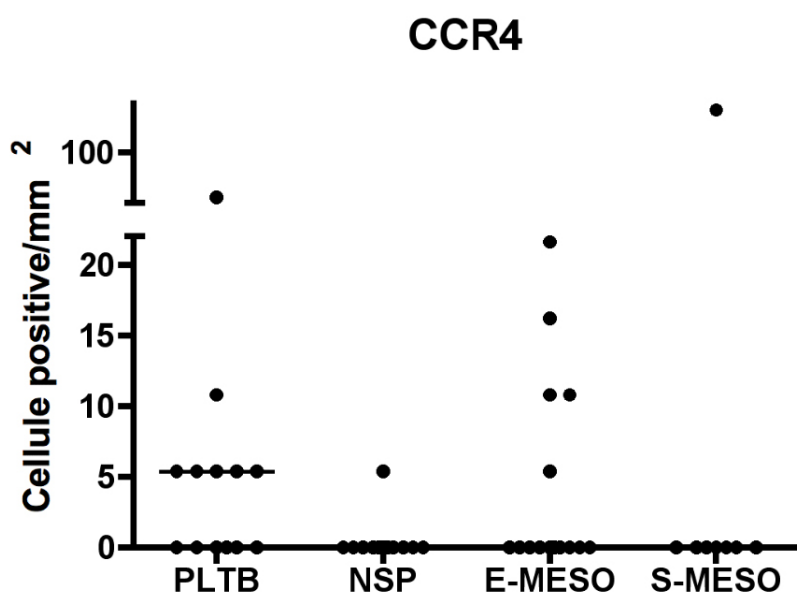


Figura 4.14. Cellule CCR4+.

Il recettore CRTH2 è risultato essere praticamente assente nei pazienti con diagnosi di S-MESO e il valore riscontrato era inferiore in maniera statisticamente significativa rispetto al gruppo con diagnosi di E-MESO (Tabella 4.2 e Figura 4.15)

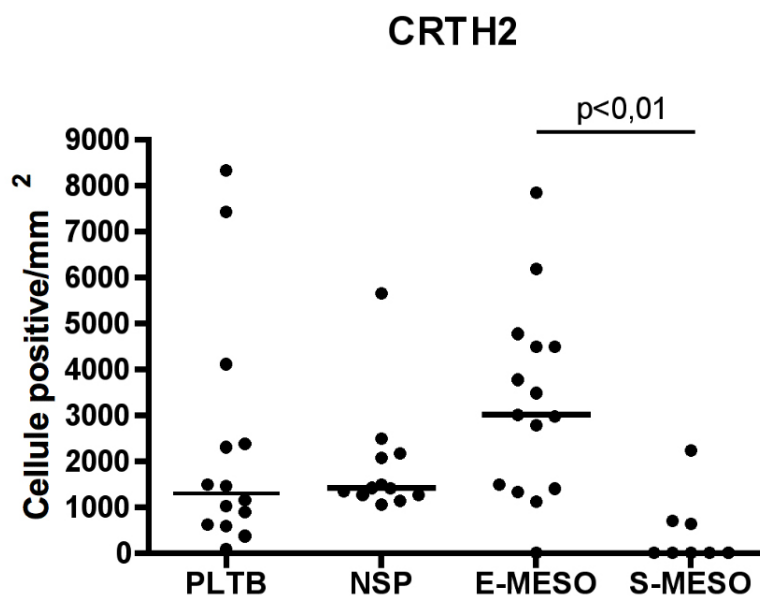


Figura 4.15. Cellule CRTH2+.

Per quanto riguarda il numero di cellule GATA3 +, sono state identificate alcune differenze statisticamente significative; nel gruppo con E-MESO il valore della mediana era significativamente più alto rispetto al gruppo di controllo PLTB ($p < 0,01$). Anche il valore relativo al gruppo con diagnosi di NSP era più alto in modo statisticamente significativo rispetto al gruppo con PLTB ($p < 0,01$). (Tabella 4.2 e Figura 4.16).

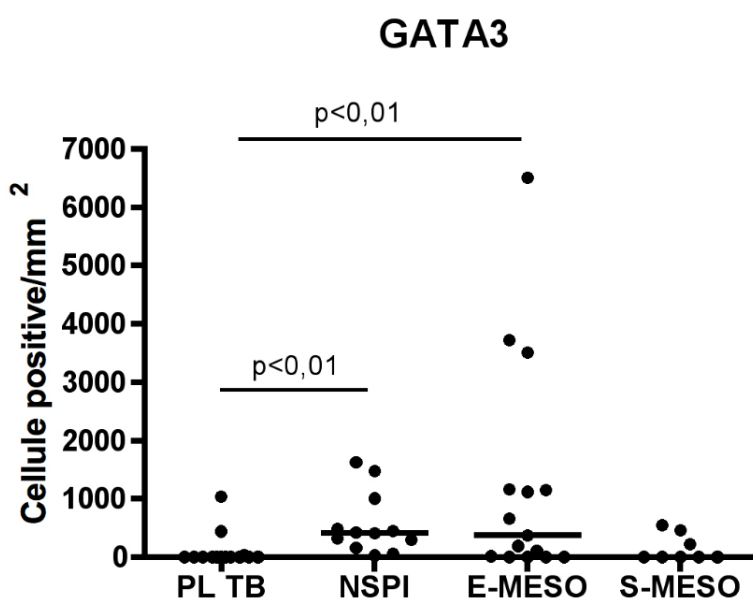


Figura 4.16A. Cellule GATA3+.

Il fattore di trascrizione STAT6 è stato identificato solamente nei pazienti appartenenti al gruppo con diagnosi di S-MESO. Il valore era più alto rispetto agli altri gruppi studiati, dove il fattore di trascrizione si è dimostrato essere inespresso, e tale valore era più alto in maniera statisticamente significativa ($p < 0,001$ rispetto a PLTB, NSP e E-MESO). (Tabella 4.2 e Figura 4.17)

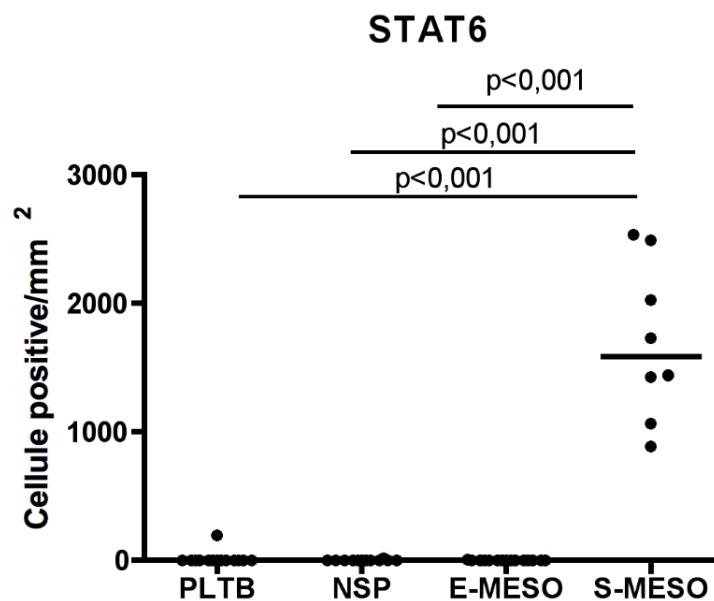


Figura 4.17. Cellule STAT6+.

4.3.3 LINFOCITI Treg

Non sono state identificate differenze statisticamente significative nel numero di cellule foxp3 positive espresse per mm2 nella pleura parietale di pazienti affetti da mesotelioma sia epitelioide che sarcomatoso rispetto ai gruppi di controllo selezionati (Figura 4.18) (PLTB=21,62(0-83,78), NSP=5.405(0-10,81), E-MESO=5,405(0-16,22), S-MESO=0(0-61,76) $p>0,05$).

4.4 CORRELAZIONI TRA I MARKERS STUDIATI

L'analisi delle correlazioni tra i markers Th1/Th2 e gli specifici marcatori utilizzati per identificare le cellule immunitarie e la valutazione della regressione lineare tra i singoli markers Th1 e Th2 all'interno dei singoli gruppi S-MESO e E-MESO ha dato solamente alcuni risultati statisticamente significativi.

Nel gruppo con diagnosi di S-MESO il marcatore STAT6 correla con CD4 ($p<0,05$) e anche l'analisi di regressione lineare ha dato risultati statisticamente significativi con un $r^2=0,6629$ (Figura 4.18)

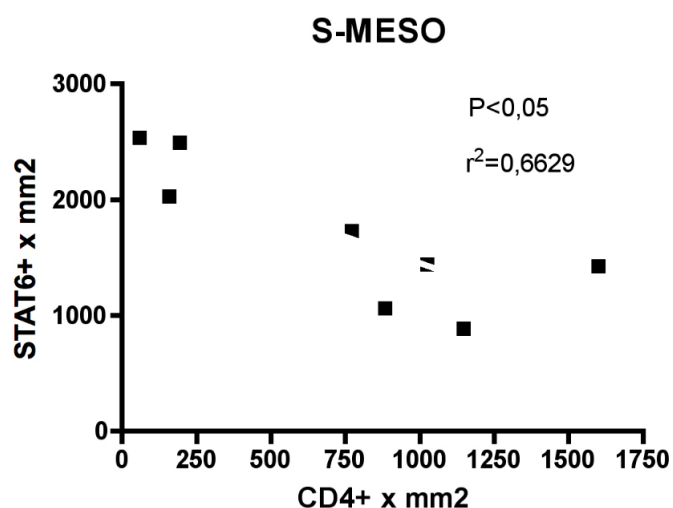


Figura 4.18. Correlazioni nel gruppo S-MESO tra cellule CD4+ e STAT6+.

Nel gruppo con E-MESO il marker CD8 correla in modo statisticamente significativo con CXCR3 ($p<0,05$) e il valore dato dalla regressione lineare era statisticamente significativo $r^2=0,2683$ (Figura 4.19).

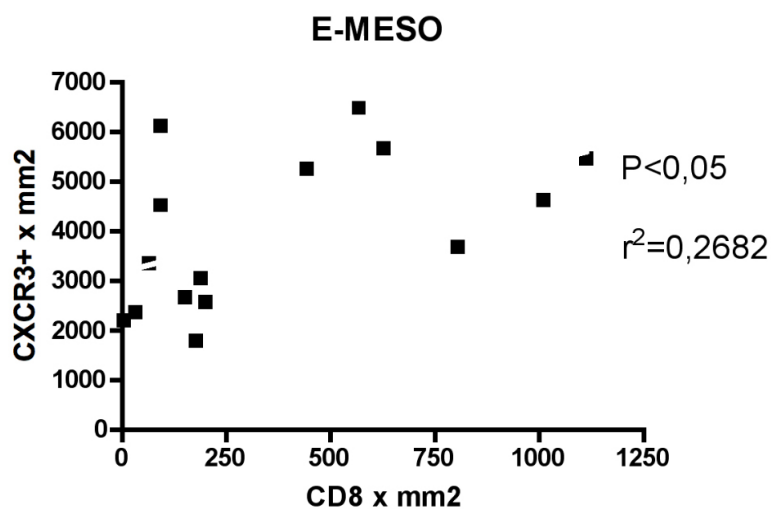


Figura 4.19. Correlazioni nel gruppo E-MESO tra cellule CD8+ e CXCR3+.

5. DISCUSSIONE

5. DISCUSSIONE

Il mesotelioma è un tumore raro ad elevata mortalità e terapia-resistente che origina dalle cellule mesoteliali [66]. Generalmente, il mesotelioma colpisce gli individui di età compresa tra i 60 e i 70 anni [67-69]. I principali sintomi d'esordio sono versamento pleurico, dolore toracico e dispnea. Nei paesi industrializzati il mesotelioma maligno pleurico è spesso associato all'esposizione ad asbesto tuttavia in circa il 30% dei casi l'esposizione non è documentata [70,71]. La prognosi è severa e la mediana della sopravvivenza si aggira attorno ai 9 mesi [72].

Poco è noto sui meccanismi che portano alla trasformazione neoplastica delle cellule mesoteliali pleuriche, tuttavia è stato dimostrato che ripetuti tentativi da parte dei macrofagi di fagocitare le fibre di asbesto provoca la formazione continua di molecole infiammatorie [33]. E' stato visto che la ripetuta produzione di molecole infiammatorie in risposta all'asbesto, a sua volta, è in grado di provocare la trasformazione neoplastica di cellule mesoteliali in vitro [32,37].

Il presente lavoro è uno dei primi che si propone di valutare i meccanismi infiammatori presenti nel mesotelioma maligno pleurico, tramite la caratterizzazione dell'infiltrazione delle cellule infiammatorie ed immunitarie in biopsie pleuriche ottenute da pazienti con diagnosi di mesotelioma maligno pleurico epiteliale e sarcomatoso paragonati a due gruppi di controllo con diagnosi certa di pleurite tubercolare e flogosi aspecifica.

Da un'analisi preliminare si evince che l'età dei pazienti con mesotelioma maligno sia epitelio ide che sarcomatoso è più elevata in maniera statisticamente significativa rispetto al gruppo di controllo con diagnosi di PLTB. Questo è facilmente spiegato dal fatto che la PLTB è una malattia di tipo infettivo, in Italia particolarmente frequente nei giovani extracomunitari. Tale dato è supportato dall'indagine effettuata sul paese di provenienza dei pazienti affetti dalle patologie studiate. Tutti i soggetti affetti da MESO e da NSP erano di origine caucasica mentre il 50% dei pazienti con diagnosi di PLTB era di etnia differente (asiatica o africana). Inoltre, è noto che il mesotelioma maligno pleurico ha una latenza di circa 30 anni e per tale motivo i pazienti che i soggetti colpiti da tale patologia hanno un'età più avanzata rispetto a quelli con diagnosi di PLTB. La mediana dell'età dei pazienti

con diagnosi di E-MESO e S-MESO è rispettivamente di 74 e 72,5 anni, confrontabile ai dati presenti in letteratura [69].

Il numero di neutrofili identificati nelle biopsie di pleura parietale è risultato essere bassissimo nei soggetti affetti da E-MESO e nei gruppi di controllo mentre nel gruppo di pazienti con diagnosi di S-MESO il numero di neutrofili infiltranti era più elevato. Non esistono dati in letteratura che riportino l'infiltrazione dei neutrofili in biopsie pleuriche umane, tuttavia è stato visto che in un modello di topo SCID impiantato con due linee umane di cellule di mesotelioma pleurico, una epitelioide e l'altra sarcomatosa, a pochi giorni dal trapianto, il numero di neutrofili infiltranti aumentava in modo significativo rispetto a un gruppo di controllo e tale valore era più alto nei topi impiantati con la linea di mesotelioma maligno sarcomatoso [73].

Un numero significativamente più elevato di eosinofili è stato identificato sia nei pazienti con diagnosi di E-MESO che S-MESO rispetto ai due gruppi di controllo. Anche uno studio di Jedd et al mostra un aumentato numero di eosinofili in entrambi i gruppi impiantati con la linea di mesotelioma epitelioide e con la linea di mesotelioma sarcomatoso, seppur in numero inferiore rispetto al numero di neutrofili. Tale dato è in linea con quanto da noi riscontrato [73]. Il modello utilizzato nel lavoro con i topi SCID, tuttavia, valutava l'infiltrazione a 7-14-30 giorni dall'impianto e questo non è paragonabile a un tessuto umano prelevato da paziente in cui la latenza è stata, probabilmente, di decenni.

I mastociti, identificati tramite due tipi di colorazione, hanno mostrato risultati tra di loro paragonabili: è stato identificato un numero maggiore di mastociti statisticamente significativo nel gruppo di controllo con diagnosi di NSP sia rispetto al gruppo affetto da PLTB che rispetto al gruppo di pazienti con S-MESO, dove il numero di mastociti riscontrati era pressoché nullo. I mastociti non sono mai stati studiati in biopsie pleuriche toracoscopiche di pazienti affetti da mesotelioma rispetto a gruppi di controllo. Tuttavia, uno studio retrospettivo pubblicato nel 2009, ha dimostrato che un aumentato numero di mastociti nella pleura di soggetti con mesotelioma pleurico è associato ad una migliore prognosi rispetto a soggetti con un numero inferiore di mastociti [74].

Un elevato numero di linfociti T CD3+ è stato identificato nel gruppo di soggetti con diagnosi di S-MESO sia rispetto al gruppo con diagnosi di E-MESO che rispetto al gruppo con

diagnosi di NSP. Uno studio recente ha valutato l'infiltrazione da parte dei linfociti T in campioni di mesotelioma maligno pleurico prelevati da paziente. In questo studio è stato visto che l'infiammazione cronica, valutata come infiltrato CD3+ nel tessuto neoplastico, è un fattore predittivo di migliore prognosi in pazienti con mesotelioma epitelioide [75]. Sono stati pubblicati alcuni studi che hanno indagato il livello di linfociti T CD3+ in biopsie pleuriche ma nessuno di questi ha riscontrato differenze rispetto ai gruppi di controllo o correlazione con la sopravvivenza [76]. Anche il gruppo di controllo PLTB mostra un numero più alto di CD3+ significativamente più alto rispetto al secondo gruppo di controllo NSP ($p < 0,01$).

Il numero di linfociti T CD4+ non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i due gruppi di pazienti affetti da mesotelioma pleurico maligno e i due gruppi di controllo.

La pleura parietale dei pazienti con diagnosi di S-MESO mostra un numero più elevato di linfociti CD8+ statisticamente significativo rispetto ad entrambi i gruppi di controllo. Anche il gruppo con diagnosi di E-MESO mostra un numero più elevato di linfociti T rispetto ai due gruppi di controllo, tuttavia, tale valore non risulta essere significativo dal punto di vista statistico. E' stato visto che la presenza di un maggior numero di linfociti T CD8+ infiltranti il tessuto di mesotelioma maligno è correlato ad una migliore prognosi in pazienti che hanno subito una pleuropneumectomia extrapleurica [76,77]. In uno studio effettuato sul liquido pleurico prelevato da pazienti affetti da mesotelioma è stato visto che erano presenti una quantità inferiore di cellule CD4+ CD25+ rispetto al gruppo di controllo affetto da neoplasia polmonare non a piccole cellule. Inoltre, erano significativamente più elevati i linfociti T CD8+ rispetto ai controlli. Tuttavia vi era notevole variabilità tra i pazienti. [78].

Per quanto riguarda i marcatori specifici Th1 sono stati ritrovati alcuni risultati significativi. Il numero di cellule CXCR3+ è risultato essere molto basso nel gruppo di pazienti affetti da S-MESO. Tale valore era più basso in modo statisticamente significativo rispetto a tutti gli altri gruppi di pazienti esaminati. Questo risultato è in accordo con un recente studio in vitro svolto da Maeda M et al [79]. Nello studio di Maeda e colleghi è stato visto che, nei linfociti T CD4+ esposti ad asbesto, l'espressione di CXCR3 è diminuita rispetto ad un gruppo di controllo, portando all'ipotesi di una diminuita capacità nel generare

una risposta immunitaria efficace in corso di trasformazione neoplastica.

Il numero di cellule STAT4+ per mm² è risultato essere più elevato nelle biopsie dei pazienti con S-MESO rispetto a tutti gli altri gruppi considerati. L'espressione di STAT4 non è mai stata valutata in altri studi, così come non è mai stato indagato il fattore di trascrizione Th1 specifico T-bet, il quale non ha mostrato differenze statisticamente significative.

Non sono state identificate differenze statisticamente significative nel numero di cellule CCR4+ nei 2 gruppi di pazienti con mesotelioma rispetto ai gruppi di controllo utilizzati. Ad oggi non esistono studi che abbiano valutato l'espressione in queste patologie del recettore per le chemochine CCR4.

L'espressione del recettore CRTH2 è risultata essere molto diversa nei due gruppi di pazienti affetti da mesotelioma. Nel gruppo con S-MESO, il recettore era praticamente assente e il valore riscontrato era inferiore in maniera statisticamente significativa rispetto al gruppo con diagnosi di E-MESO. In letteratura non è mai stato indagato il ruolo di CRTH2 nel reclutamento dei linfociti Th2 nella pleura di soggetti affetti da mesotelioma. L'espressione di CRTH2 è stata studiata nei pazienti asmatici e da uno studio condotto sul lavaggio bronco alveolare. Da tale studio si evince che CRTH2 risulta essere espresso da parte dei linfociti Th2 ma che tale espressione è molto bassa e probabilmente non utile per eventuale terapia target-specifica [80].

Il fattore di trascrizione GATA3 era espresso maggiormente nel gruppo con E-MESO rispetto al gruppo di controllo con diagnosi NSP. GATA3 è un fattore di trascrizione espresso in modo specifico dai linfociti Th2 e mostra un ruolo essenziale nella differenziazione delle cellule CD4+ in cellule Th2. Inoltre, GATA3 possiede un ruolo fondamentale nell'espressione delle citochine che mediano l'infiammazione allergica: IL-4, IL-5 e IL-13. Nell'uomo GATA3 è generalmente localizzato nel citoplasma, ma la sua attivazione da parte delle cellule presentanti l'antigene tramite il recettore CD3 e del recettore costimolatorio CD28 porta alla sua fosforilazione da parte della MAP kinasi p38, facendo traslocare il fattore di trascrizione nel nucleo. I glucocorticoidi inibiscono la sua funzione impedendo la sua importazione nel nucleo e inibendo anche la MAPK p38. GATA3 è inibito da T-bet e a sua volta è in grado di bloccare STAT4 e lo stesso T-bet in modo da mantenere la polarizzazione Th2. [81].

Il fattore di trascrizione STAT6 è stato identificato solamente nei pazienti appartenenti al gruppo con diagnosi di S-MESO. E' noto che tale fattore di trascrizione sia espresso nelle cellule epiteliali del polmone e che giochi un ruolo critico nella patogenesi dell'asma. La sua attivazione, infatti, porta alla differenziazione delle cellule Th2 in cellule B inducendo l'espressione da parte di questi delle IgE [82] portando così all'infiammazione di tipo allergico. [83]. Questo è il primo studio che valuta l'espressione dei fattori di trascrizione GATA3 e STAT6 nel mesotelioma maligno pleurico.

Non sono state identificate differenze nel numero di cellule foxp3 positive espresse per mm² espresse da pazienti affetti da mesotelioma sia epitelioide che sarcomatoso rispetto ai gruppi di controllo selezionati. Studi recenti hanno dimostrato che l'interazione tra il microambiente tumorale, le cellule immunitarie, le cellule dello stroma e la matrice extracellulare svolge un ruolo cruciale nella progressione del tumore [84]. In particolare i linfociti infiltranti il tumore sembrano essere i principali effettori dell'immunità anti-tumorale locale [84]. E' stata, inoltre, dimostrata la presenza di cellule Treg nel microambiente tumorale. [85]. In uno studio del 2008 Ankaru e colleghi [76] hanno valutato la presenza delle cellule T regolatorie in pazienti con diagnosi di mesotelioma da tessuto ottenuto tramite pleuropneumectomia extrapleurica e nel loro studio l'espressione del marcatore foxp3 sulle cellule Treg non evidenziava differenze nella sopravvivenza nei pazienti.

Le correlazioni riscontrate tra i vari marcatori nel gruppo di pazienti con E-MESO e S-MESO sono poche e alla luce dei dati presenti in letteratura non è per ora possibile fare considerazioni a riguardo.

Il presente lavoro di tesi fornisce una caratterizzazione della risposta infiammatoria ed immunitaria di due sottotipi di mesotelioma maligno pleurico. Non esistono studi in letteratura che abbiano valutato l'assetto dell'infiltrato immunitario in soggetti affetti da tali patologie e che abbiano confrontato questo aspetto con gruppi di pazienti affetti da patologie non neoplastiche. I campioni utilizzati, infatti, sono biopsie pleuriche toracoscopiche, di difficile reperimento e solamente campioni di questo genere forniscono la possibilità di utilizzare gruppi di controllo affetti da infiammazione cronica o da patologia infettiva come la tubercolosi. Gli studi che valutano lo stato immunitario nel mesotelio-

ma maligno pleurico spesso sono effettuati su altri tipi di campioni, come ad esempio il liquido pleurico. L'utilizzo della biopsia pleurica è sicuramente più indicativo dello stato di reclutamento del sistema immunitario nel sito neoplastico. Inoltre, gli studi presenti in letteratura spesso non forniscono dati rispetto a gruppi di controllo, ma sono per la maggior parte lavori retrospettivi.

Considerata, inoltre, la rarità del mesotelioma maligno pleurico, il presente lavoro è stato strutturato su un numero consistente di pazienti, con diagnosi di mesotelioma di due sottotipi differenti.

L'analisi delle molecole caratterizzanti i due sottotipi dei linfociti T helper, Th1 e Th2, non ha portato all'identificazione di una polarizzazione in senso Th1 o Th2 nei gruppi di pazienti esaminati. Alcune molecole caratterizzanti i linfociti Th1 sono maggiormente espresse in un sottotipo di mesotelioma e viceversa per altre molecole caratterizzanti i Th2.

Anche i due sottotipi di mesotelioma maligno non mostrano una polarizzazione in un senso o nell'altro, tuttavia sono state identificate differenze tra questi due gruppi e non solo rispetto ai due gruppi di controllo. Le differenze riscontrate confermano l'esistenza della già nota variabilità che esiste tra i due sottotipi. Anche in questo caso i dati riscontrati sono innovativi, in quanto in letteratura non sono presenti studi che valutino l'infiltrato immunitario nelle biopsie toracoscopiche.

Sarà interessante, in un futuro prossimo, cercare di aumentare il numero di pazienti analizzati per poter confermare i dati ottenuti in un gruppo più allargato di pazienti. Sarà invece difficile inserire un gruppo di controllo sano, dal momento che il campionamento della pleura tramite toracosopia risulta essere piuttosto invasivo.

Interessante sarà, inoltre, effettuare un'indagine di tipo retrospettivo sui dati. E' stato ipotizzato, infatti, che lo stato di infiammazione cronica sia uno step precedente a quello di trasformazione neoplastica [73]; valutare in modo particolare i pazienti affetti da NSP per verificare l'eventuale sviluppo di neoplasie maligne pleuriche potrebbe essere utile per identificare eventuali marcatori predittivi di sviluppo di mesotelioma maligno pleurico a partire da infiammazione cronica.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

1. Davies J. Development of the respiratory system. In: Davies J, ed. Human Developmental Anatomy. New York: Ronald Press; 1963: 135–143.
2. Wang N. Anatomy of the pleura. Clin Chest Med 1998; 19:229-240.
3. Sahn SA. State of the Art: the pleura. Am Rev Respir Dis 1988; 138: 184-234.
4. Wang NS. The preformed stomas connecting the pleural cavity and the lymphatics in the parietal pleura. Am Rev Respir Dis 1975;111:12-20.
5. Gaudio E, Rendina EA, Pannarale L et al. Surface morphology of the human pleura. A scanning electron microscope study. Chest 1988;93:149-153.
6. Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Hosseini SM, et al. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. JAMA 2005;293: 2767–2775.
7. Perez-Rodriguez E, Light RW. Effusions from infections: tuberculosis. In: Textbook of pleural diseases. 2nd ed Light RW, Lee YCG, eds. LondonMA: Hodder Arnold. 2008:367–378.
8. Baumann MH, Nolan R, Petrini M, Lee YC, Light RW, et al. (2007) Pleural tuberculosis in the United States. Chest 131: 1125–1132.
9. Gopi A, Madhavan SM, Sharma SK, Sahn SA. Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006. Chest 2007;131: 880–889.
10. Capelozzi VL, Saldiva PH, Antonangelo L et al. Quantitation in inflammatory pleural disease to distinguish tuberculous and paramalignant from chronic non-specific pleuritis. J Clin Pathol 1997;50: 935–940.

11. Rossi GA, Balbi B, Manca. Tuberculous pleural effusions. Evidence for selective presence of PPD-specific T-lymphocytes at site of inflammation in the early phase of the infection. *Am Rev Respir Dis* 1987;136: 575–579.
12. Mitra DK, Sharma SK, Dinda AK et al. Polarized helper T cells in tubercular pleural effusion: phenotypic identity and selective recruitment. *Eur J Immunol* 2005;35: 2367–2375.
13. Okamoto M, Hasegawa Y, Hara T et al. T helper type 1/T-helper type 2 balance in malignant pleural effusions compared to tuberculous pleural effusions. *Chest* 2005;128: 4030–4035.
14. Sharma SK, Mitra DK, Balamurugan A et al. Cytokine polarization in miliary and pleural tuberculosis. *J Clin Immunol* 2002;22: 345–352.
15. Guyot-Revol V, Innes JA, Hackfort S et al. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173: 803–810.
16. Sharma PK, Saha PK, Singh A et al. FOXP3+ regulatory T cells suppress effector T-cell function at pathologic site in miliary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179: 1061–1070
17. Anonymous. Asbestos, asbestosis, and cancer: the Helsinki criteria for diagnosis and attribution. *Scand J Work Environ Health* 1997;23:311-6.
18. McDonald JC, McDonald AD. The epidemiology of mesothelioma in historical context. *Eur Respir J* 1996;9:1932-42.
19. Robinson BW, Musk AW, Lake RA. Malignant mesothelioma. *Lancet* 2005;366:397-408.
20. Driscoll T, Nelson DI, Steenland K et al. The global burden of disease due to occupational carcinogens. *Am J Ind Med* 2005;48:419-31.

21. Peto J, Hodgson JT, Matthews FE et al. Continuing increase in mesothelioma mortality in Britain. *Lancet* 1995;345:535-9. 8.
22. Peto J, Decarli A, La Vecchia C et al. The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer* 1999;79:666-72.
23. Murayama T, Takahashi K, Natori Y, et al. Estimation of future mortality from pleural malignant mesothelioma in Japan based on an age-cohort model. *Am J Ind Med* 2006;49:1-7.
24. Montanaro F, Bray F, Gennaro V et al. ENCR Working Group. Pleural mesothelioma incidence in Europe: evidence of some deceleration in the increasing trends. *Cancer Causes Control* 2003;14:791-803.
25. Tse LA, Yu IT, Goggins W et al. Are current or future mesothelioma epidemics in Hong Kong the tragic legacy of uncontrolled use of asbestos in the past? *Environ Health Perspect* 2010;118:382-6.
26. Marinaccio A, Binazzi A, Di Marzio B et al. Pleural malignant mesothelioma epidemic. Incidence, modalities of asbestos exposure and occupations involved from the Italian National Register. *Int J Cancer* 2011.
27. Baris Y. I. Simonato L, Arvinli M et al. Epidemiological and environmental evidence of the health effects of exposure to erionite fibres: a four-year study in the Cappadocian region of Turkey. *Int. J. Cancer* 1987; 39:10–17.
28. Davis JM. The histopathology and ultrastructure of pleural mesotheliomas produced in the rat by injections of crocidolite asbestos. *Br J Exp Pathol* 1979;60:642–652.
29. Moalli PA, MacDonald JL, Goodglick LA et al. Acute injury and regeneration of the mesothelium in response to asbestos fibers. *Am J Pathol* 1987;128:426–445.
30. Shin ML, Firminger HI. Acute and chronic effects of intraperitoneal injection of

two types of asbestos in rats with a study of the histopathogenesis and ultrastructure of resulting mesotheliomas. *Am J Pathol* 1973;70:291–313.

31. Wagner JC, Berry G. Mesotheliomas in rats following inoculation with asbestos. *Br J Cancer* 1969;23:567–581.

32. Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1666–1680.

33. Choe N, Tanaka S, Xia W et al. Pleural macrophage recruitment and activation in asbestos-induced pleural injury. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 1997;5:1257–1260.

34. Hansen K, Mossman BT. Generation of superoxide (O_2^-) from alveolar macrophages exposed to asbestiform and nonfibrous particles. *Cancer Res* 1987;47:1681–1686.

35. Dostert C, Pe'trilli V, Van Bruggen R et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008;320: 674–677.

36. Tanaka S, Choe N, Hemenway DR et al. Asbestos inhalation induces reactive nitrogen species and nitrotyrosine formation in the lungs and pleura of the rat. *J Clin Invest* 1998;102:445–454.

37. Wang Y, Faux SP, Hallden G et al. Interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α promote the transformation of human immortalised mesothelial cells by erionite. *Int J Oncol* 2004;25:173–178.

38. Anraku M, Cunningham KS, Yun Z et al. Impact of tumor-infiltrating T cells on survival in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135:823–829.

39. Yamada N, Oizumi S, Kikuchi E et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes predict favorable prognosis in malignant pleural mesothelioma after resection. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1543–1549.

40. Hegmans JP, Hemmes A, Hammad H et al. Mesothelioma environment comprises cytokines and T-regulatory cells that suppress immune responses. *Eur Respir J* 2006;27:1086–1095.
41. Scherpereel, P. Astoul, P. Baas et al. Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2010;13(10):C23-45
42. Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH et al. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J. Biol. Chem.* 2003;278:289–295.
43. Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F et al. An Alternatively Spliced Variant of CXCR3 Mediates the Inhibition of Endothelial Cell Growth Induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and Acts as Functional Receptor for Platelet Factor 4. *J. Exp. Med.* 2003;197: 1537–1549.
44. Qin S, Rottman JB, Myers P et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J. Clin. Invest.* 1998;101:746–754.
45. Smit MJ, Verdijk P, van der Raaij-Helmer EM et al. CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi- and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase”. *Blood* 2003;102:1959–1965.
46. Maruyama K, Sugano S. Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* 1994;138:171–174.
47. Hoey and Grusby. STATs as mediators of cytokine-induced responses. *Adv Immunol.* 1999;71:145-162.
48. Leonard WJ, O’Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:293-322.

49. Kaplan, M. H., Y. L. Sun, T. Hoey et al. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in STAT4-deficient mice. *Nature* 1996;382:174.
50. Thierfelder, W. E., J. M. van Deursen, K. Yamamoto et al. Requirement for STAT4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 1996;382:171.
51. Barbulescu, K., C. Becker, J. F. Schlaak et al. IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN- promoter in primary CD4⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* 1998;160:3652.
52. Xu, X., Y. L. Sun, and T. Hoey. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 1996; 273:794.
53. Kurata, H., Lee, H. J., O'Garra, et al. Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity* 1999;11:677–688.
54. Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J et al. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* 1999;17:701–738.
55. Zhang, D. H., Cohn, L., Ray, P. et al. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 1997;272: 21597–21603.
56. Jiang H, Harris MB, Rothman P. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT". *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000;105: 1063–70.
57. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R et al. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 1990;172:921–929.
58. Kopf M, Le Gros G, Bachmann M et al. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993;362:245–248.

59. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med*. 1998;187:129-34.
60. Zhang L, Zhao Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road". *J. Cell. Physiol*. 2007;211:590–597
61. Boutin C, Astoul P. Diagnostic thoracoscopy. *Clin Chest Med* 1998;19:295-309.
62. Mori PA, Casalini AG, Melioli A. Toracosopia medica: metodica e complicate. In: Casalini AG, eds. *Pneumologia Interventistica*. Springer-Verlag Italia, 2006:461-472.
63. Cook SM, Bartos RE, Pierson CL et al. Detection and characterization of atypical mycobacteria by the polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1994;3:53-58.
64. Varani K, Caramori G, Vincenzi F, et al. Alteration of adenosine receptors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care* 2006;173:398-406.
65. Pesci A, Foresi A, Bertorelli G et al. Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:684-9.
66. Jaurand MC, Fleury-Feith J. Pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Respirology* 2005;10:2–8.
67. Kaufman AJ, Pass HI. Current concepts in malignant pleural mesothelioma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8:293–303.
68. Legha SS, Muggia FM. Pleural mesothelioma: clinical features and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 1977;87:613–621.
69. Delgermaa V, Takahashi K, Park EK et al. Global mesothelioma deaths reported to the World Health Organization between 1994 and 2008 *Bull World Health Organ*.

2011;89:716–724C.

70. Jaurand MC, Renier A, Daubriac J. Mesothelioma: Do asbestos and carbon nano-tubes pose the same health risk? *Part Fibre Toxicol.* 2009;12:6–16.
71. Lippmann M. Asbestos exposure indices. *Environ Res.* 1988;46:86–106.
72. Montanaro F, Rosato R, Gangemi M, Roberti S, Ricceri F, Merler E, Gennaro V, Romanelli A, Chellini E, Pascucci C, Musti M, Nicita C et al. Survival of pleural malignant mesothelioma in Italy: a population-based study. *Int J Cancer.* 2009;124:201-207.
73. Jedd M. Hillegass, Arti Shukla, Sherrill A et al. Inflammation precedes the development of human malignant mesotheliomas in a SCID mouse xenograft model *Ann N Y Acad Sci* 2010;1203:7–14.
74. Greta Ali, Laura Boldrini, Marco Lucchi. Tryptase Mast Cells in Malignant Pleural Mesothelioma as an Independent Favorable Prognostic Factor *J Thorac Oncol.* 2009;4: 348–354.
75. Suzuki K, Kadota K, Sima CS et al. Chronic inflammation in tumor stroma is an independent predictor of prolonged survival in epithelioid malignant pleural mesothelioma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:1721-8.
76. Masaki Anraku, Kristopher S. Cunningham et al. Impact of tumor-infiltrating T cells on survival in patients with malignant pleural mesothelioma *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135:823-9
77. Yamada N, Oizumi S, Kikuchi E et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes predict favorable prognosis in malignant pleural mesothelioma after resection *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1543–1549.
78. DeLong P, Richard G. Carroll Adam C. Henry. Regulatory T Cell and Cytokines in Malignant Pleural Effusions Secondary to Mesothelioma and Carcinoma *Cancer Biology & Therapy* 2005;3:342-346.

79. Maeda M, Nishimura Y, Hayash et al. Decreased CXCR3 expression in CD4+ T cells exposed to asbestos or derived from asbestos-exposed patients Am J Respir Cell Mol Biol. 2011;45:795-803
80. Mutalithas K, Guillen C, Day C et al. CRTH2 expression on T cells in asthma. Clin Exp Immunol. 2010;161:34-40.
81. Barnes PJ. Role of GATA-3 in allergic diseases. Curr Mol Med. 2008;8:330-334.
82. Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY et al. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. Nature 1996; 380: 630-633.
83. Mullings RE, Wilson SJ, Puddicombe SM et al. Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6) expression and function in asthmatic bronchial epithelium. J Allergy Clin Immunol 2001; 108: 832-838.
84. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. Nat Rev Cancer. 2005;5:263-74.
85. Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? Lab Invest 2006;86:231-245.
86. Curiel TJ, Coukos G, Zou L et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med. 2004;10: 942-949.

PUBBLICAZIONI

PUBBLICAZIONI

Montanini L, Barili V, Lasagna L, Pazzaglia L, Jonstrup SP, Kjems J, Benassi MS, Perris R. Differential microRNA expression in osteosarcoma cell lines with diverse metastatic potential. Comunicazione-poster al "MicroRNAs European Meeting", Cambridge, 1-2 Novembre 2007.

Caramori C, Mazzoni F, Casolari P, Contoli M, Scavello S, Lasagna L, Ciaccia A, Papi A. Cellule staminali e patologia polmonare dell'adulto. Aggiornamento Medico, 2008; 32:13-21.

Mori PA, Melioli A, Lasagna L, Passera M, Bertorelli G, Casalini A. Il mesotelioma maligno desmoplastico (osservazioni personali). Comunicazione-poster al "9° Congresso Nazionale della Pneumologia", Genova, 10-13 settembre 2008.

Lasagna L, Peveri S, Corradi M, Pilotti E, Bertorelli G. Inflammatory cytokines in exhaled breath condensate (EBC) of exacerbated COPD patients. Comunicazione-poster al "European Respiratory Society Congress", Berlino, 4-8 ottobre 2008.

Montanini L, Lasagna L, Barili V, Pazzaglia L, Kiems J, Benassi S, Picci P, Perris R. Differential microRNA expression in osteosarcoma cells with different tumorigenic behaviour. Comunicazione-poster al "50th annual meeting of the Italian cancer society", Napoli, 6-9 Ottobre 2008.

Bertorelli G, Sabbadini F, Tafuro F, Lasagna L. Malattie Polmonari Indotte da Faramaci: linee guida per il medico di Famiglia. Proceedings of CardioPneumo AIMEF 2009, Bari. Italian Journal of Primary Care 2009, Suppl 2:73.

G. Guarnieri, MD, C. Canova, PhD, L. Lasagna, PhD, G. Bertorelli, MD, S. Signorini, MD, L. Simonato, MD, M. Lotti, MD, P. Maestrelli, MD. Relationship between Air Pollutants and Biomarkers of Systemic Inflammation in Adult Asthmatics. Comunicazione poster American Thoracic Society International Conference, 1-20 maggio 2009 San Diego. Am J Respir Crit Care Med 179;2009:A3168

L. Lasagna, A. Mori, L. Ferrari, F. Tafuro, G. Rindi, G. Bertorelli, A. Casalini, Medical thoracoscopy in the diagnosis of tuberculous pleurisy. Comunicazione-poster al "European Respiratory Society Congress", Vienna, 12-16 settembre 2009.

Caramori G, Lasagna L, Casalini AG et al. Immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in the parietal pleura of patients with tuberculous pleurisy. *PLoS One*. 2011;6(7):e22637

Montanini L, Lasagna L, Barili V et al. MicroRNA cloning and sequencing in osteosarcoma cell lines: differential role of miR-93. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011 Sep 30. [Epub ahead of print]