



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

***VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI POTENZIALI
MARCATORI IN FLUIDI BIOLOGICI DI PAZIENTI
AFFETTI DA MESOTELIOMA PLEURICO MALIGNO***

Relatore:

Prof. Antonio Lucacchini

Correlatore:

Dott.ssa Laura Giusti

Candidata:

Nunzia Fiore

Anno Accademico 2014/2015

Riassunto analitico

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è un tumore aggressivo la cui prognosi, nella maggior parte dei casi, è infausta. Il ruolo che assume la diagnosi precoce è quindi fondamentale, poiché trattamenti chirurgici e farmacologici, in fase avanzata del tumore, non hanno dimostrato un prolungamento significativo della sopravvivenza. Affinchè si possano sviluppare nuove tecniche di diagnosi precoce è necessario avere a disposizione una vasta gamma di marcatori tumorali più selettivi e specifici.

Studi effettuati con tecniche di proteomica su campioni bioptici randomizzati di pazienti con Mesotelioma Pleurico maligno, tumori polmonari benigni e carcinoma polmonare, all'interno del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Pisa, hanno aperto le porte per considerare nuove proteine come potenziali marcatori biologici per la differenziazione del MPM. Le proteine che hanno suscitato maggiore interesse sono: vimentina, desmina e prelamin A/C. La validazione in larga scala di queste proteine è stata effettuata su campioni di siero e plasma, in fase di diagnosi e in fase di terapia, utilizzando la tecnica del kit ELISA. La vimentina e desmina dimostrano di essere differenzialmente espresse nei campioni di diagnosi quindi risultano essere buoni marcatori specifici e sensibili, per quanto riguarda la preLamin A/C invece è stato preparato un Kit "home-made" per effettuare una sua futura validazione.

Sommario

INTRODUZIONE	4
1. Il polmone	4
1.1 Cenni di anatomia	4
1.2 Cenni di fisiologia	6
2.1 Classificazione	8
2.2 Patogenesi	13
2.4 Clinica e diagnosi	19
2.5 Trattamento Terapeutico	25
2. Il kit ELISA	32
3. 5.Analisi dei possibili marcatori	38
5.1 Vimentina, Desmina e Prelamin A/C	40
4. 6.Le prospettive di studio	44
SCOPO DELLA TESI	45
MATERIALI E METODI	47
5. Kit ELISA per Vimentina	47
6. Kit ELISA per Desmina	51
7. Messa a punto Kit ELISA “home-made”per Prelamin A/C	56
RISULTATI E DISCUSSIONE	61
8. Vimentina	61
9. Desmina	65
CONCLUSIONE	72
BIBLIOGRAFIA	73

INTRODUZIONE

Il polmone

1.1 Cenni di anatomia

La componente essenziale dell'apparato respiratorio è costituito dai polmoni destro e sinistro. Questi due organi parenchimatici occupano gran parte della cavità toracica e sono separati da una struttura fissa che prende il nome di mediastino. Il mediastino delimitato anteriormente dallo sterno e posteriormente dalla colonna vertebrale, contiene i grossi vasi che convergono al cuore, il cuore, la trachea ed i grossi bronchi di destra e sinistra, l'esofago posteriormente. Sono presenti il tessuto adiposo e linfonodi nonché il residuo (nell'adulto) del timo. Il polmone sinistro è più lungo del destro, a causa della presenza del fegato, che a destra costringe il diaframma a sollevarsi, e del cuore che invade con il suo apice la parte sinistra; però il polmone destro è un po' voluminoso e stretto del sinistro. I polmoni hanno la forma di due mezzi coni e presentano una base, un apice, una faccia laterale (o costovertebrale), una faccia mediale (o mediastinica) e tre margini, anteriore, posteriore e inferiore.

I polmoni e la superficie interna della cavità toracica sono rivestiti dalle pleure, foglietti sierosi, sottili e trasparenti. Tra i due foglietti, nelle condizioni fisiologiche, ci sono circa 15-20 ml di liquido sieroso che facilita lo scivolamento formando una superficie umida e scivolosa in modo che i due foglietti possano scorrere l'uno sull'altro e mantiene i polmoni a stretto contatto con la parete toracica [1]. Per ogni pleura si distinguono due porzioni: una che avvolge i polmoni, detta pleura viscerale, e l'altra che riveste le pareti della cavità che accoglie i polmoni,

detta pleura parietale. Entrambe le pleure presentano una superficie aderente e una superficie libera, liscia e umida (Fig.1).

La pleura parietale e la pleura viscerale sono costituite da:

- uno strato superficiale, il mesotelio, rivolto verso la cavità pleurica, costituito da un singolo strato di cellule epiteliali appiattite capaci di produrre e riassorbire il liquido pleurico
- uno strato sottomesoteliale, costituito da tessuto connettivo di natura fibroelastica;
- una tela sottosierosa, formata da tessuto connettivo lasso ricco in vasi sanguigni [2].

Ogni polmone è diviso in lobi. A sinistra contiamo due lobi, a destra ci sono tre lobi. Ogni lobo è separato dall'altro da una scissura che altro non è se non una inflessione della pleura viscerale. La scissura a carico del polmone di sinistra, detta scissura obliqua, divide il polmone nel lobo superiore ed inferiore. A destra la scissura principale separa il lobo inferiore dal medio o superiore; la scissura orizzontale, più breve, separa il lobo superiore dal medio. Ogni lobo, a sua volta, è diviso in segmenti. Contiamo dieci segmenti a carico del polmone sinistro e dieci segmenti a carico del polmone destro. L'unità funzionale del polmone è il lobulo costituito da un bronco globulare che si dirama nei bronchioli alveolari che a loro volta si dividono nei bronchioli terminali che morfologicamente ricordano da vicino l'acino. A livello delle due facce mediastiniche sinistra e destra, troviamo l'ilo del polmone composto dal bronco principale, da due vene polmonari, dalle arterie e vene bronchiali, dal plesso nervoso polmonare, da tessuto linfatico e connettivo. Il tutto è avvolto dalla pleura [1].

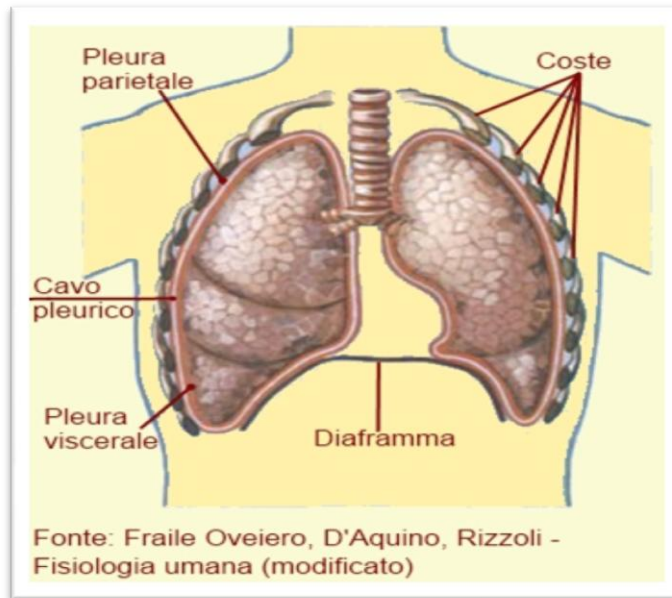


Fig.1: struttura del polmone. Fonte:Fisiologia Umana, Fraile O., D'Aquino, Rizzoli

1.2 Cenni di fisiologia

Le funzioni principali del polmone sono: lo scambio di sostanze gassose tra atmosfera e sangue, la regolazione omeostatica del pH corporeo tramite l'escrezione o la ritenzione selettiva di CO₂, la protezione da agenti patogeni e sostanze irritanti grazie all'epitelio che intrappola e distrugge sostanze potenzialmente nocive.

La ventilazione polmonare è un processo meccanico automatico, ritmico e regolato dai centri superiori, mediante il quale per effetto della contrazione e del rilasciamento dei muscoli scheletrici del diaframma e della gabbia toracica, viene promosso il ricambio dell'aria degli alveoli. La respirazione include sia la ventilazione polmonare sia la circolazione del sangue da e per i capillari tissutali, in modo tale che l'ossigeno possa raggiungere tutte le cellule e possa essere usato per l'ossidazione dei metaboliti al produrre energia utile [2].

Il mesotelioma pleurico maligno

Il mesotelioma maligno (MM) è una neoplasia che si sviluppa a livello del mesotelio, il sottile tessuto che riveste la gran parte degli organi interni, in particolare colpisce le cellule superficiali sierose della cavità pleurica, peritoneale e pericardica, del testicolo, della tunica vaginale e degli ovuli. Questa tipologia di tumore rappresenta meno dell'1% di tutte le malattie oncologiche e vede nel mesotelioma pleurico maligno (MPM) il suo più ampio rappresentante, con una percentuale del 90-95% su tutti i casi documentati di MM [3].

La lunga latenza del MPM , 20-40 anni, rende molto difficile la diagnosi della malattia e quando i pazienti mostrano i primi sintomi eclatanti quali versamento pleurico, dolore nella parte bassa della schiena o a un lato del torace, fiato corto, tosse, febbre, stanchezza, perdita di peso, difficoltà a deglutire, debolezza muscolare, oramai il tumore è considerato già in uno stato avanzato con poche possibilità di trattamento. [3]

In letteratura i primi rimandi a studi sul tumore del rivestimento del polmone risalgono ad uno studio del 1767 condotto da Joseph Lietaud, il fondatore dell'anatomia patologica, su 3000 autopsie dove trovò due casi di tumore pleurico e successivamente nel 1943 in un caso di asbestosi. E' stata ritenuta una malattia rara fino al 1960 quando Wagner documentò una numerosa casistica tra minatori di asbesto in Sudafrica. L'esposizione ambientale ed occupazionale all'asbesto (o amianto), risulta essere la causa predominante della malattia. Il sesso più colpito è quello maschile ed il rischio aumenta con l'età, ma ciò nonostante questo tumore può colpire indifferentemente persone di qualsiasi età e di entrambi i sessi [4]. In Italia rappresenta lo 0,4% di tutti i tumori diagnosticati nell'uomo e lo 0,2% di quelli diagnosticati nelle donne. Ciò equivale a dire che si verificano 3,4

casi di mesotelioma ogni 100.000 uomini e 1,1 ogni 100.000 donne. Il numero dei casi è in lieve crescita tra le donne, probabilmente perché gli ultimi anni di produzione industriale di materiali contenenti asbesto ha portato anche ad un aumento delle lavoratrici impiegate in questo settore. Dal punto di vista di diffusione territoriale, si osservano enormi differenze nel numero di casi di mesotelioma dal momento che questo tumore è associato soprattutto all'esposizione all'amianto: in provincia di Alessandria, dove era presente un'importante industria per la produzione di materiali con amianto, si parla per esempio di 16 casi su 100.000 per gli uomini e 13 casi su 100.000 per le donne. Altri fattori sospetti, che possono contribuire allo sviluppo del mesotelioma, sono: le fibre minerali, infezione da Simon Virus 40, radiazioni, infezioni polmonari croniche e pleurite tubercolare [5,6,7].

2.1 Classificazione

In base all'area in cui la neoplasia ha avuto origine, i mesoteliomi si suddividono in:

- **Mesotelioma pleurico:** nasce nella cavità toracica e rappresenta la tipologia più diffusa (circa 3 casi su 4);
- **Mesotelioma pericardico:** nasce nella cavità attorno al cuore ed è estremamente raro;
- **Mesotelioma peritoneale:** nasce nell'addome e rappresenta la quasi totalità dei mesoteliomi rimasti escludendo quelli pleurici;
- **Mesotelioma della tunica vaginale:** nasce dalla membrana che riveste i testicoli ed è molto raro [3].

Da un punto di vista citomorfologico, l'MPM si può distinguere in tre differenti istotipi:

- **Epitelioidi:** colpisce specificamente le cellule epiteliali, che vanno a costituire il tessuto che riveste la parete esterna degli organi interni. caratterizzato da cellule cuboidali, cilindriche o appiattite, che danno una struttura prevalentemente tubolare, papillare o tubulo-papillare. Le cellule epitelioidee hanno un citoplasma acidofilo e nuclei rotondi e vescicolari con nucleoli prominenti, inoltre la maggior parte delle cellule hanno citoplasma che, all'interno, presenta delle granulazioni di colore rosato. Le cellule epitelioidee sono cellule epiteliali che iniziano a funzionare in modo non corretto, e iniziano successivamente a riprodursi in maniera incontrollata, diventando così cellule tumorali; E' il più comune (60-70% dei casi) ed è quello che tende ad avere una migliore prognosi [5].

Inizialmente, il mesotelioma epitelioide era considerato molto frequente, in quanto esso veniva scambiato con un'altra forma di tumore, che è l'adenocarcinoma, a causa della forma delle cellule, per cui si giungeva ad una errata diagnosi al microscopio.

- **Sarcomatoide o fibroso:** formato da cellule fusate (simili fibroblastiche) arrangiate in fasci o distribuite in maniera disordinata, in uno stroma collagenoso più o meno ialinizzato. Rappresenta dal 10 al 20% dei mesoteliomi.
- **Bifasico o misto:** comprende il 30% mesoteliomi ; vede la coesione di aspetti sia dell'MPM epitelioide sia dell'MPM sarcomatoide[5].

Al fine di porre corrette indicazioni terapeutiche è necessario una completa e precisa classificazione dell'MPM. Nel corso degli anni sono stati

sviluppati diversi sistemi di classificazione dell'evoluzione di un tumore (stadiazione) per il MPM.

Uno dei più utilizzati è il sistema Tumor-Node-Metastasis (TNM) che distingue 4 fasi di stadiazione, considerando a sua volta tre parametri:

- dimensioni del tumore primitivo (T),
- coinvolgimento dei linfonodi regionali adiacenti al tumore (N),
- presenza di metastasi a distanza (M).

Questo sistema è stato proposto dal chirurgo francese Pierre Denoix nel 1946 e adottato dall'International Mesothelioma Interest Group (IMIG)[6].

Stadiazione secondo i criteri TNM:

T1a	tumore che interessa la pleura parietale e/o mediastinica e diaframmatica. Nessun coinvolgimento della pleura viscerale.
T1b	tumore che interessa la pleura parietale e/o mediastinica e diaframmatica. Alcuni noduli neoplastici sulla pleura viscerale.
T2	tumore che interessa sia la pleura parietale che viscerale con almeno uno dei seguenti aspetti: coinvolgimento del diaframma; tumore confluyente della pleura viscerale (comprese le scissure); tumore che si estende dalla pleura viscerale al sottostante parenchima polmonare;
T3	tumore localmente avanzato ma potenzialmente resecabile, che coinvolge tutte le superfici pleuriche omolaterali (parietale, mediastinica, viscerale e diaframmatica) con almeno uno dei seguenti aspetti:

	<p>coinvolgimento della fascia endotoracica;</p> <p>infiltrazione del grasso mediastinico;</p> <p>focolaio neoplastico solitario, completamente resecabile, che si estende nei tessuti molli della parete toracica;</p> <p>interessamento del pericardio non trasmurale;</p>
T4	<p>tumore localmente avanzato non resecabile, che coinvolge tutte le superfici pleuriche omolaterali con almeno uno dei seguenti aspetti:</p> <p>estensione diffusa o masse multifocali a carico della parete, con o senza osteolisi;</p> <p>estensione diretta transdiaframmatica al peritoneo;</p> <p>estensione diretta alla pleura controlaterale;</p> <p>estensione diretta ad uno o più organi mediastinici;</p> <p>estensione diretta alla colonna vertebrale;</p> <p>tumore che infiltra il pericardio (versante interno)</p> <p>con o senza versamento pericardio;</p> <p>tumore che infiltra il cuore;</p>
Nx	linfonodi non valutabili
N0	assenza di metastasi linfonodali
N1	metastasi ai linfonodi broncopulmonari o ilari omolaterali
N2	metastasi ai linfonodi sottocarenali o mediastinici omolaterali, inclusi i linfonodi mammari interni omolaterali
N3	metastasi ai linfonodi mediastinici controlaterali, mammari interni controlaterali, sopraclaveari omolaterali o contro laterali
Mx	metastasi a distanza non valutabili
M0	assenza di metastasi a distanza

M1	presenza di metastasi a distanza
----	----------------------------------

Stadio Ia	T1a N0 M0
Stadio Ib	T1b N0 M0
Stadio II	T2 N0 M0
Stadio III	T3 N1-2 M0
Stadio IV	T4 N3 M1

Ampiamente usato è anche il metodo Brigham, proposto da Sugarbaker di Brigham and Woman's Hospital, che considera oltre che dell'estensione della malattia anche dell'eventuale coinvolgimento linfonodale e della possibilità di asportare per via chirurgica parti di tessuto organico compromesso [6]. In questo caso la progressione del mesotelioma è definita in 4 fasi:

Stadio I:	malattia confinata all'interno della pleura parietale: pleura viscerale ipsilaterale, polmone, pericardio, diaframma o parete toracica limitatamente alle sedi di pregresse biopsie. La chirurgia è una valida opzione;
Stadio II	tutti gli stadi I con linfonodi intratoracici (N1 o N2) positivi.

	La chirurgia è ancora un'opzione valida;
Stadio III	estensione locale della malattia nella parete toracica o mediastino, cuore o attraverso il diaframma nel peritoneo; con o senza coinvolgimento di linfonodi controlaterali o extratoracici. La chirurgia non è più applicabile;
Stadio IV	malattia metastatica a distanza. La chirurgia non è più applicabile

2.2 Patogenesi

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 [8].

Assodata la responsabilità dell'asbesto nella maggior parte dei MPM, la patogenesi della malattia riguarda gli effetti delle fibre sull'organismo una volta ingerite o inalate. La penetrazione delle fibre di asbesto possono può avvenire per ingestione, attraverso gli organi dell'apparato digerente, raggiungendo così la membrana peritoneale oppure per inalazione sfruttando il sistema linfatico. Una volta nella membrana peritoneale, le fibre rimangono intrappolate e alterando le cellule mesoteliali tramite processi di irritazione ed infiammazione tali che la pleura va incontro a degenerazione maligna. Come le fibre di asbesto provochino queste alterazioni non è bene chiara.[8, 9]. Ciò che è sicuro è che l'asbesto ha la capacità di formare diverse specie reattive: dell'ossigeno (ROS), che sono legate alla tossicità polmonare e dell'azoto, che contribuiscono al danno al DNA e di conseguenza al danno polmonare [10,11,12]. Alcuni studi hanno confermato che i ROS sono prodotti dall'asbesto da un metabolita fisiologico (H_2O_2) che reagisce con i chelanti del ferro che, in tal senso, svolgono un ruolo protettivo [11,13]. La superficie delle fibre di asbesto depositate nei polmoni, assorbono il ferro che è un attivo riducente; questo ciclo redox del ferro può però provocare danno ossidativo al DNA delle cellule adiacenti.

Negli individui esposti all'asbesto, l'omeostasi del ferro nel polmone risulta superiore al normale, come evidenziato dall'aumento dei livelli di ferro BALF, transferrina, recettori per la transferrina, lactoferrina e ferritina [10,11]. L'esposizione all'asbesto induce anche ad alterazioni di una proteina oncosoppressore presente in tutti i tipi di cellule: la p53 detta anche il 'guardiano del genoma', in grado di arrestare il ciclo cellulare in caso di danno, di indurre l'apoptosi, di regolare l'invecchiamento cellulare. Quindi a livello genico, nelle cellule epiteliali e mesoteliali del polmone, si ha l'attivazione dell'espressione di p53 e p21 (un regolatore negativo di

chinasi ciclina-dipendenti, enzimi con un ruolo fondamentale nell'evoluzione del ciclo cellulare e quindi nella divisione cellulare) .

Ad aggravare la situazione si ha che ,a differenza di molti geni oncosoppressori che si comportano da recessivi, p53 si comporta come gene dominante. Infatti mutazioni che interessano anche solo uno dei due alleli del gene p53 (condizione di eterozigosi) possono compromettere la normale funzionalità della proteina.

Un'altra attività dell'asbesto è quella di indurre l'apoptosi regolata dai mitocondri (intrinseca): aumentando la permeabilità delle membrane dei mitocondri, riducendone il potenziale e provocando così il rilascio di proteine apoptotiche come il citocromo c.

La capacità di cancerogenesi delle fibre di amianto è dovuta quindi a tre principali meccanismi[11,12]:

- 1 Rottura dei cromosomi con azione meccanica che porta ad un radicale stabile mutamento dell' "assetto" genico delle cellule mesoteliali per cui queste cellule finiscono con l'esprimere più geni che portano all'aumentata proliferazione e alla resistenza agli stimolo normalmente in grado di uccidere le cellule.
- 2 Danno genetico dovuto allo stress ossidativo legato al ferro contenuto nelle fibre di amianto. Questo tipo di danno ossidativo conduce ad una anormale espressione genica analogamente all'azione meccanica descritta precedentemente.
- 3 Proliferazione delle cellule mesoteliali danneggiate che favorisce la selezione di cellule mesoteliali anormali, resistenti agli stimoli tossici e che rappresentano il primo passo verso la loro trasformazione in cellule tumorali. La capacità da parte delle fibre di asbesto di indurre fattori di crescita con l'attivazione di specifici segnali biochimici di resistenza

alla necrosi ed all'apoptosi rappresentano un ulteriore, cruciale meccanismo di trasformazione neoplastica delle cellule mesoteliali. . Le cellule mesoteliali, considerate in passato come esclusive cellule di rivestimento, giocano un ruolo importante anche nel processo infiammatorio. Ma 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.

2.3 Istopatogenesi

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è una patologia tumorale molto aggressiva che si associa frequentemente alla comparsa di versamento pleurico in assenza di una sintomatologia precoce o comunque specifica. Sebbene il mesotelioma venga classificato con i sarcomi dei tessuti molli, solo il 20% dei mesoteliomi sono sarcomatosi; circa il 50% ha un aspetto epiteliomorfo e il 20% si presenta bifasico. Anche nei casi in cui l'istologia della lesione e la clinica sembrano orientare la diagnosi con sufficiente certezza, è sempre opportuno confermare la natura della neoplasia mediante un pannello di reazioni immunohistochimiche [8]. Sfortunatamente non esiste un singolo anticorpo che consenta di distinguere univocamente e costantemente cellule epiteliali da cellule mesoteliali: entrambe esprimono citocheratine a basso peso molecolare; sia il mesotelio che le cellule

epiteliali neoplastiche possono perdere l'espressione dei loro marcatori normali; inoltre la degenerazione neoplastica può indurre nelle cellule l'espressione aberrante di antigeni di altre linee cellulari. Per questa ragione si raccomanda l'uso di almeno due marcatori mesoteliali ed epiteliali distinti, tra quelli commercialmente disponibili [8]. La diagnostica differenziale delle neoplasie pleuriche è resa particolarmente difficoltosa dalle caratteristiche dei campioni che più spesso arrivano al patologo, cioè i versamenti pleurici e le biopsie toracoscopiche, che possono presentare un serie di problematiche:

- Piccole dimensioni
- Artefatti da compressione
- Perdita di aggregazione cellulare nei versamenti e negli agoaspirati
- Cattiva fissazione (versamenti)

Inoltre i patogeni incontrano numerose difficoltà anche nella diagnosi differenziale delle neoplasie pleuriche poiché è necessario tener conto che il cavo pleurico è frequentemente sede di metastasi di neoplasie extrapleuriche che devono essere escluse per formulare con certezza la diagnosi di mesotelioma. Le neoplasie con maggior frequenza interessano la pleura sono:

- Adenocarcinoma metastatico
- Mesotelioma
- Carcinoma indifferenziato a piccole cellule
- Linfoma

La diagnosi patologica di mesotelioma rimane controversa e difficoltosa per la natura pleiomorfica di questo tumore [8]. Oggi ci si avvale essenzialmente dell'utilizzo della microscopia elettronica e delle tecniche

di immunohistochemical sui prelievi biotici attraverso cui si rilevano molecole caratteristiche non solo del MPM ma anche di altre neoplasie come per esempio, l'antigene epiteliale di membrana (EMA) indicativo di malignità di tipo mesoteliale, altre proteine le cui presenze sono quasi sempre confermate come la calretinina, l'antigene 1 del tumore di Wilms' (WT1), citokeratina 5/6, HBME-1, mesotelina e osteopontina. Da recenti studi tra le nuove proteine identificate infatti come certi biomarcatori di MPM vengono annoverate proprio desmina, calretina, vimentina, fruttosio-bifosfato aldolasi A, miosina regolatrice delle catene leggere 2 (isoforma muscolare ventricolare/cardiaca), 3 e 6B.

Aiuti diagnostici per differenziare il MPM dall'adenocarcinoma

	Malignant mesothelioma	Adenocarcinoma
Histology <i>Periodic acid-Schiff stain</i> <i>Mucicarmine stain</i>	negative negative	positive positive
Immunostaining <i>Carcinoembryonic antigen Leu-M1</i> <i>Vimentin</i> <i>Cytokeratin</i>	negative negative positive positive	positive (75%) positive negative negative
Electron microscopy	long microvilli	short microvilli

2.4 Clinica e diagnosi

Il MPM può originare a qualsiasi livello della pleura parietale e viscerale e si presenta sotto forma di ispessimenti pleurici o di mammellonature; di solito sono maggiormente interessate le zone inferiori del torace, specie gli sfondati costo-frenici con coinvolgimento anche del muscolo diaframma e del pericardio. Talvolta la diffusione neoplastica può essere bilaterale ed interessare anche il parenchima polmonare. Nelle forme più avanzate, il tumore può infiltrare oltre la pleura parietale anche le coste e la parete toracica o sconfinare nel peritoneo attraverso il diaframma. Diffusione metastatica per via ematica e linfatica è stata riscontrata nel 50-60% dei rilievi autoptici. Il MPM si manifesta intorno ai 60-70 anni di età con una frequenza di 3-5 volte maggiore nell'uomo rispetto alla donna.

I sintomi clinici sono solitamente atipici ed aspecifici. I sintomi di esordio più comuni sono dolore (35%) e distensione dell'addome (31%), il dolore è spesso riferito all'alto addome o alla spalla e viene confuso facilmente con un dolore di origine cardiaca, ortopedica o da colecistopatie). Con il progredire della malattia il sintomo predominante diviene la dispnea, spesso associata alla comparsa di versamento pleurico, cachessia, perdita di peso (65%), anoressia ed ascite (77%) [14, 15]. La maggior parte dei pazienti manifesta tosse, solitamente non produttiva, dispnea e dolore della parete toracica [16]. Raramente i pazienti possono presentare febbre ed ostruzione intestinale. Inoltre, in pazienti affetti da MPM sono state descritte diverse sindromi paraneoplastiche, tra cui ipercalcemia, ipoglicemia, anemia emolitica autoimmune, stati di ipercoagulabilità e coagulazione intravascolare disseminata. Queste sindromi sono comunque aspecifiche e si osservano anche in altri tumori [17]. Purtroppo il tempo che

intercorre tra la comparsa dei sintomi e la diagnosi del tumore è piuttosto lungo, intorno ai 122 giorni [18].

Nonostante il progresso delle metodiche diagnostiche come detto in precedenza, la diagnosi di MPM può risultare difficoltosa, sia nella distinzione tra forme benigne e maligne, sia soprattutto nella diagnosi differenziale con neoplasie a diversa sede di origine con diffusione metastatica a livello pleurico. Deve essere pertanto programmato un iter diagnostico accurato che, oltre agli elementi clinico-radiologici comprenda quelli che derivano dall'esame citologico del liquido pleurico e, soprattutto, dai prelievi biotici. Sul piano clinico, l'orientamento verso una natura maligna del versamento, è fornito da diversi rilievi quali:

- assenza di altre patologie che predispongano ad un versamento pleurico benigno
- sintomatologia ad esordio subdolo e lentamente ingravescente
- dispnea quale sintomo di esordio
- dolore toracico non caratteristicamente pleuritico
- assenza di una sintomatologia significativa (riscontro occasionale).

Per quanto riguarda la diagnosi in persone non a rischio, essendo il mesotelioma una patologia piuttosto rara, non sono previsti screening per la diagnosi precoce. Per coloro che per tempi prolungati sono stati o sono esposti all'amianto, per ragioni professionali o per vicinanza con aree contaminate, alcuni medici consigliano esami periodici (radiografia o TC) per tenere sotto controllo nel tempo eventuali cambiamenti nella struttura del polmoni che potrebbero indicare la presenza di mesotelioma o tumore polmonare. Tuttavia non è certo che questa strategia possa portare a una

diagnosi precoce. Alcuni studi condotti negli Stati Uniti stanno verificando l'efficacia di un monitoraggio con misurazione della mesotelina, una proteina prodotta dalle cellule di mesotelioma che potrebbe essere un campanello d'allarme precoce per le persone a rischio elevato [3].

La diagnosi del MPM si basa su un primo step fondamentale ,ossia verificare la presenza di liquido pleurico a livello della cavità toracica(Fig.2). A questo seguiranno esami più specifici ovvero:

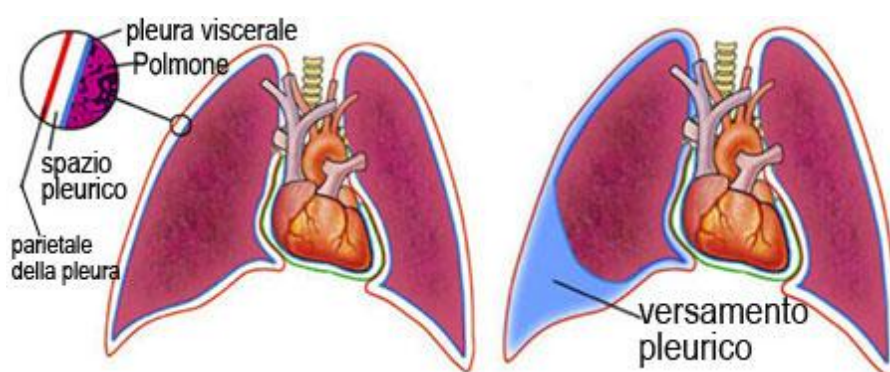


Fig.2: versamento pleurico. Fonte: www.chirurgiatoracica.org

Analisi del liquido pleurico: il liquido pleurico è composto da sangue ed essudato con un'elevata concentrazione di proteine e lattato deidrogenasi nonché un'elevata conta cellulare. Si tratta, comunque, di dati aspecifici tipici anche di altre condizioni patologiche; inoltre, la sensibilità dell'analisi citologica del liquido pleurico è bassa e da circa l'85% del liquido analizzato si hanno letture negative o non decisive [19].

Radiografia del torace: è condotta mediante l'utilizzo di raggi X. Il risultato è un'immagine che evidenzia in modo differente le ossa e i parenchimi polmonari rispetto ai tessuti molli (muscoli e pelle), perché le ossa sono strutture più compatte e appaiono più chiare rispetto agli altri tessuti. Evidenzia anomalie nella pleura, come modificazioni dello spessore o depositi di calcio, o nei polmoni [20]. E' anche possibile osservare placche ed ispessimenti pleurici correlati ai depositi di asbesto. È

comune un aumento di spessore della grande scissura secondario alla neoplasia. L'emitorace interessato può risultare di volume normale malgrado la presenza di un abbondante versamento.(Fig.3)

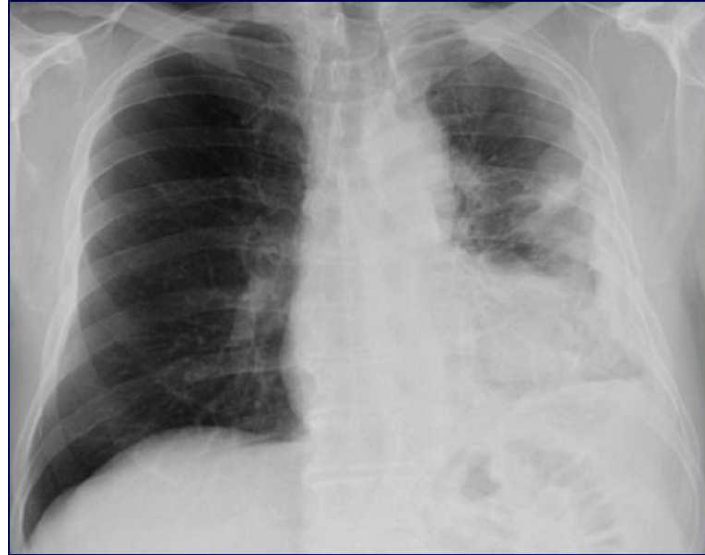


Fig.3: Radiografia toracica di un paziente con MPM. Fonte: www.chirurgiatoracica.org

Tomografia del torace (TC): La Tomografia Computerizzata o TC, è una metodica di diagnostica per immagini che utilizza raggi X. Grazie ad una valutazione statistico-matematica (computerizzata) dell'assorbimento di tali raggi X da parte delle strutture corporee esaminate, si ottengono immagini di sezioni assiali del corpo umano [20] con la possibilità di evidenziare l'effusione pleurica, l'ispessimento della pleura, la sua calcificazione, l'ispessimento delle fessure interlobulari e l'eventuale invasione della parete toracica. Tale metodica, tuttavia, non è in grado di dare informazioni per distinguere le modificazioni indotte dal tumore benigno e da quello maligno, o di distinguere tra adenocarcinoma del polmone e mesotelioma [21].

Laparoscopia diagnostica: ci si avvale di un laparoscopio, un tubo rigido sottile che è dotato di due canali ottici: un canale porta la luce all'interno e l'altro canale ottico invece trasmette all'esterno l'immagine degli organi addominali. L'uso della laparoscopia come mezzo di indagine, in letteratura non è sempre consigliato, anzi può provocare la diffusione del tumore e complicare la situazione [22].

PET: tomografia ad emissione di positroni che permette di identificare le cellule che stanno crescendo più velocemente e che corrispondono alle cellule tumorali. La valutazione delle immagini, ottenute con questa tecnica, permette la distinzione tra tumori e lesioni di altro genere e eventuale valutazione di avanzamento del tumore verso i linfonodi e altre parti del corpo[23]

Toracosopia: con questa tecnica si ha una buona visualizzazione dell'anatomia endotoracica con possibilità di ottenere una diagnosi istologica (con almeno 5 biopsie della pleura compromessa), un giudizio di estensione tumorale locoregionale e di praticare, qualora si ritenga opportuno, una efficace pleurodesi chimica. In questo caso è sufficiente l'anestesia locale con l'utilizzo di un toracoscopio dotato di un canale operativo introdotto attraverso un singolo accesso[22]

VATS: acronimo di Video Assisted Thoracic Surgery, essendo un tipo di toracosopia consente l'esplorazione di tutta la superficie pleurica, parietale

e viscerale attraverso l'uso di uno strumento cannulare collegato ad una telecamera; permette l'effettuazione di ampie biopsie pleuriche e, quando necessarie, anche asportazione di noduli polmonari periferici.

Biopsia: con un ago lungo e sottile si possono prelevare o campioni di liquido presenti nel torace (toracentesi), nell'addome (paracentesi) o nella cavità attorno al cuore (pericardiocentesi) e si verifica al microscopio la presenza di cellule tumorali, oppure piccole porzioni di tessuto mesoteliale. In questo caso, l'ago si inserisce sottopelle o si può procedere anche con l'inserimento di una sonda dotata di videocamera attraverso un piccolo taglio nella pelle. I campioni prelevati con la biopsia possono essere sottoposti ad analisi immunoistochimiche (per vedere le proteine presenti sulla superficie della cellula) o genetiche (per individuare l'espressione di geni tipica del mesotelioma) per permettere una distinguere il mesotelioma da altri tumori e eventualmente anche tra i vari isotipi di mesotelioma stesso.

Risonanza magnetica: senza l'utilizzo di raggi X consente di ottenere immagini dettagliate dei tessuti molli del corpo; in particolare per il mesotelioma può essere utile per valutare le condizioni del diaframma[23].

Esami del sangue: il prelievo ematico e le consecutive analisi non sono considerati come strumenti efficaci per la diagnosi ma piuttosto per avvalorare una ipotesi già confermata con altre tecniche o per seguire l'andamento della malattia durante e dopo il trattamento. Si misurano in particolare i livelli di SMRP (serum mesothelin related protein), la cui

concentrazione è elevata in più dell'84% dei mesoteliomi. Inoltre Cancer Antigen 12 e Cancer Antigen 15-3(CA 12 e CA 15-3), acido ialuronico, osteopontina, desmina , vimentina e prelamin A sono altri possibili marcatori per la diagnosi del MPM [22].

2.5 Trattamento Terapeutico

Il MPM è una malattia per la quale non esiste un protocollo terapeutico standardizzato, in quanto tutti i tipi di trattamento sono gravati da un alto tasso di recidiva e una scarsa sopravvivenza. I tipi di trattamento utilizzati variano dalla chirurgia, alla brachiterapia, alla radioterapia esterna, alla applicazione intracavitaria di radioisotopi, alla chemioterapia, alla immunoterapia fino a combinazioni di due o più terapie. Nessuno di questi trattamenti è risultato ad oggi nettamente migliore di altri nella palliazione della malattia e nel prolungamento della sopravvivenza [23-26].

Il trattamento chirurgico può essere radicale oppure palliativo, teso cioè a rimuovere tutto il tessuto neoplastico oppure ad una citoreduzione, nel tentativo di migliorare la sintomatologia e le condizioni cliniche del paziente. Nell'ambito della chirurgia si possono pertanto distinguere due tipi di approccio: la **pleurectomia/decorticazione(P/D)** che prevede la resezione dei foglietti pleurici macroscopicamente interessati da neoplasia, con risparmio del parenchima polmonare e la **pneumonectomia extrapleurica(EPP)** che prevede l'asportazione "en bloc" della pleura parietale, del polmone e dell'emidiaframma e pericardio omolaterale[26] I vantaggi della procedura P/D sono i tempi di recupero generalmente più rapidi, e l'utilità per i pazienti che potrebbero non tollerare la più radicale EPP. Tra gli svantaggi vi è un maggiore rischio di recidiva della malattia a

causa dell'impossibilità di rimuovere tutto il tumore canceroso, e l'impossibilità di utilizzare dosi di radiazioni elevate a causa dei potenziali danni al polmone sottostante. Anche con l'EPP, nel circa 80% dei casi compaiono recidive locali ma questo rischio può essere ridotto utilizzando una radioterapia postoperatoria. La sola radioterapia, utilizzando dosi moderate (40 Gy), può essere utile per il controllo del dolore e del versamento pleurico, ma è scarsamente efficace come terapia primaria; viene più utilmente utilizzata in combinazione con la chemioterapia. Sono riportati in letteratura alcuni sporadici casi di sopravvivenze a lungo termine che hanno fatto seguito all'irradiazione esterna del torace o all'istallazione intracavitaria di radioisotopi [27,28].

Tuttavia, la maggior parte della letteratura, concorda che la terapia radiante non produce effetti significativi né sul controllo della malattia né sulla sopravvivenza. La dose tumoricida di irradiazione viene ad essere limitata dalla troppo grande estensione della malattia e dalla troppo elevata tossicità su polmone, cuore, fegato, esofago e midollo spinale. La radioterapia ad intensità modulata (IMRT), usata di solito dopo la pleuropneumonectomia, sembra essere la metodica più efficace nel controllare le recidive locali, sebbene questi pazienti muoiano poi di malattia metastatica [29].

Recentemente è stato pubblicato un lavoro sull'associazione di IMRT e campi statici di elettroni (IMRT+e) che permetterebbe una migliore pianificazione dei campi da trattare con un maggiore risparmio degli organi critici [30].

Anche l'efficacia della chemioterapia è difficile da valutare in quanto gli studi sono pochi e molto disomogenei tra loro; i chemioterapici vengono infatti usati sia da soli, che in associazione tra loro ed insieme ad altre terapie per differenti stadi di malattia. Gli agenti chemioterapici più efficaci

sono risultati Doxorubicina, Ciclofosfamide e Cisplatino con una percentuale di risposta del 20-30% .

In altri studi, discreti risultati sono stati ottenuti con la combinazione di cisplatino e gemcitabina (48% di risposta parziale) [31].

I farmaci possono essere somministrati per via endovenosa o intramuscolare, per via orale oppure direttamente nella cavità toracica (per via intrapleurica) o addominale (per via intraperitoneale). Questa somministrazione localizzata permette di colpire il tumore con dosi più alte di chemioterapico, che a volte viene riscaldato per aumentarne l'efficacia (perfusioni ipertermiche), limitando gli effetti collaterali al resto dell'organismo.

Più recentemente, nuovi agenti hanno dimostrato la loro efficacia nel trattamento del MPM. Tra di essi il pemetrexed (Alimta), un antifolato con un'ampia attività antitumorale[32]. Nell'organismo, pemetrexed viene convertito in una forma attiva che blocca l'attività degli enzimi coinvolti nella produzione di nucleotidi. Di conseguenza, la forma attiva di pemetrexed rallenta la formazione del DNA e RNA e previene la divisione delle cellule [33,34].

La chemioterapia viene utilizzata anche come trattamento intra-toracico, riducendo la tossicità sistemica e permettendo di rilasciare il farmaco direttamente nella sede del tumore, dove invece il chemioterapico sistemico arriva solo in minima parte[35].

Per quanto riguarda l'uso dell'immunoterapia si è fatto uso dell'anticorpo anti-CD3 umanizzato (OKT3), del linfocita T citotossico (CTL), dell'Interferone alfa-2a ad uso prettamente palliativo per il momento [36]. Ampiamente usato per una vasta gamma di tumori, è l'Interleuchina 2 (IL-

2), una citochina prodotta dalle cellule T in grado di promuovere la proliferazione, la sopravvivenza e la differenziazione dei linfociti T attivati [37]. La somministrazione intravenosa, sottocutanea ed intrapleurica di IL-2 nel mesotelioma ha mostrato effetti positivi nella promozione della regressione neoplastica sia in modelli animali che in studi clinici [38].

Si sta valutando un nuovo approccio terapeutico di tipo genico che prevede l'utilizzo di geni suicidi per il trattamento del mesotelioma. E' possibile anche utilizzare virus modificati usati per trasportare citochine che, una volta entrate nell'organismo, aiutano il sistema immunitario ad attaccare le cellule cancerose [39,40].

L'apparente fallimento della chirurgia, della radioterapia e della chemioterapia come trattamenti singoli nel prolungare la sopravvivenza, ha portato a tentare un approccio multimodale alla malattia. Dal momento che la chirurgia è comunque il trattamento più efficace per il controllo locale della malattia, i protocolli multimodali tipicamente combinano la chirurgia con la radioterapia e/o la chemioterapia adiuvante. L'intento del trattamento resta il controllo locale della malattia; la chemioterapia, somministrata per via intracavitaria o come agente radiosensibilizzante, sembra offrire il modo di migliorarlo[39].

Proteomica

Negli ultimi anni la costante ricerca e l'avanzamento della tecnologia hanno permesso di continuare a migliorare la qualità dei dati ottenuti nel campo della genomica; tutto ciò ha portato alla determinazione delle sequenze di molti geni che compongono il DNA degli esseri viventi e ad un aumento continuo dei dati reperibili nei vari database. Lo sviluppo della genomica, a sua volta, ha aperto la strada ad un altro ramo relativo alla ricerca biomedica, ovvero la proteomica .

Per proteomica si intende l'approccio sperimentale che permette di decodificare le informazioni derivanti dalla genomica, identificando la proteina codificata dalla sequenza di un particolare gene e determinandone struttura, funzione e possibili modificazioni post-trasduzionali.[39].Quando si prende in considerazione una cellula o un'unità sub-cellulare, un tessuto, od un organo, è possibile definirne il proteoma, ovvero l'insieme completo di tutte le proteine che sono espresse in quel particolare sito relativamente a specifiche condizioni fisiologiche e ambientali [39,40]. La proteomica è fondamentale perché la genetica e la genomica sono insufficienti a descrivere in modo esauriente i vari processi biologici. La genomica, di fatto, è un sistema statico e risulta identico in ogni cellula o organismo, tenendo naturalmente in considerazione le possibili variazioni inter-specie; il proteoma, invece, è altamente dinamico poiché il tipo di proteina, la sua abbondanza, la sua localizzazione all'interno di un tessuto, il tipo e la quantità di modificazioni post-trasduzionali, dipendono fortemente dall'ambiente e dallo stato fisiologico in cui si vengono a trovare le cellule[41]. Ad esempio, è giustificato supporre che il profilo proteico di una cellula sana non corrisponda esattamente con il proteoma di una cellula che si trova coinvolta in qualche stato patologico.

L'analisi proteomica è un campo molto vasto e solitamente viene suddiviso in tre sottoclassi[41]:

- La “proteomica funzionale”: permette la caratterizzazione dell'attività, delle interazioni e della presenza di modificazioni post-traduzionali delle proteine affinché sia possibile descrivere a livello molecolare i meccanismi che regolano la vita della cellula. Il fine della proteomica funzionale però, non è quello di caratterizzare ogni proteina del campione, ma solo quel piccolo numero di proteine che sono implicate nella questione biologica in esame o identificare determinate proteine che svolgono la stessa funzione.
- La “proteomica profiling”: da informazioni per descrivere l'intero proteoma di una cellula, organismo o tessuto, comprendendo anche la localizzazione e l'identificazione dei prodotti di espressione proteici. In questa è possibile distinguere la proteomica di caratterizzazione che si occupa di definire le proteine presenti in una cellula, tessuto o fluido biologico e la proteomica differenziale che studia il tipo e la quantità di proteine che si trovano in uno stesso tessuto, ma in condizioni fisiologiche diverse.

Sebbene il proteoma di una cellula in un dato momento rappresenti solo l'espressione di una parte del genoma, è molto complesso. Esistono infatti molti potenziali fattori di variabilità tra un gene ed il suo corrispondente prodotto attivo. Questi includono soppressioni, amplificazioni, splicing e modificazioni co- e post- traduzionali. Tutto ciò puntualizza l'importanza dello studio del proteoma come scienza vera e propria, che come tale dovrebbe essere considerata di pari importanza allo studio del genoma, e forse anche di più.

La proteomica si avvale di una vasta area di metodiche di studio, spesso combinate assieme. Molto utilizzate sono :

- *L'elettroforesi bidimensionale (2-DE)* è una tecnica robusta per separare una miscela complessa di proteine, derivanti da un campione biologico. Il processo prevede due fasi distinte, ognuna della quali sfrutta delle proprietà caratteristiche della proteina per ottenere la separazione.

La separazione relativa alla prima dimensione è eseguita in modalità di focalizzazione isoelettrica (IEF), per cui le proteine sono differenziate grazie ad un gradiente di pH e ad un campo elettrico opportuno, in base al valore del loro punto isoelettrico; la seconda dimensione, invece, separa le proteine in base al loro peso molecolare, ovvero usando un' SDS-PAGE [42].

- *La spettrometria di massa* ha un ruolo fondamentale nell'analisi del proteoma, e i recenti sviluppi ed innovazioni hanno permesso di ottenere dei dati migliori e più significativi; questa tecnica risulta molto veloce e sensibile, ed è possibile applicarla anche lì dove le quantità di analita disponibili sono molto ridotti. Al momento è usata come un moderno strumento nella scoperta di farmaci, per la determinazione di processi biochimici implicati nelle malattie, per monitorare processi cellulari, per caratterizzare sia i livelli di espressione che le modifiche post-trasduzionali delle proteine, per ricercare differenze tra fluidi biologici o cellule di soggetti sani e malati e per identificare markers patologici [42,43].

- *Western blotting* è una tecnica importante usata in biologia cellulare e molecolare. Utilizzando un Western blot, i ricercatori sono in grado di identificare specifiche proteine da una miscela complessa di proteine estratte da cellule. La tecnica utilizza tre elementi per eseguire questa operazione: separazione per dimensioni, il trasferimento ad un supporto solido, e la marcatura proteina bersaglio utilizzando un anticorpo primario e secondario. Il Western blot è una tecnica che è molto utile per il rilevamento di proteine in quanto consente all'utente di quantificare l'espressione di proteine pure[43].

Il kit ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent Assay, più comunemente conosciuta come ELISA, è una tecnica di analisi immunoenzimatica utilizzata per rilevare la presenza di un dato antigene in un campione, o per misurare la concentrazione di anticorpi nel campione in esame .

I Kit Elisa combinano la specificità degli anticorpi con la sensibilità dei dosaggi enzimatici: la tecnica dei dosaggi immunologici permette il rilevamento o la quantificazione di un sostanza basandosi su una reazione immunologica; mentre i dosaggi enzimatici consentono la misurazione di micro quantità delle sostanze in campioni di prova, che li rende utili in determinazioni analitiche di routine. Il principio base sfrutta la capacità delle superfici di plastica di adsorbire quantità piccole ma rivelabili di proteina.

Si tratta di un saggio in fase solida effettuato su piastre da microdosaggio. Ogni piastra contiene 96 pozzetti e permette di saggiare contemporaneamente un elevato numero di campioni. Il limite significativo è invece che da informazioni solo sulla presenza/concentrazione di una molecola, ma non danno informazioni sulle sue proprietà biochimiche (es peso molecolare, localizzazione cellulare, ecc).

In particolare il kit Elisa è utilizzata per:

- Determinare presenza e concentrazione di un antigene nel campione da testare;
- Determinare presenza e concentrazione di un anticorpo nel campione da testare;
- Determinare presenza e concentrazione di citochine secrete, sia in vivo nel plasma che in vitro in medium.

Esistono vari tipi di Kit Elisa ma i più comunemente usati sono tre tipologie: Sandwich Elisa , Elisa Competitivo Diretto e Elisa Competitivo Indiretto.

Il Sandwich Elisa è veloce ed accurato e utilizzando l'antigene purificato (se disponibile) come standard, permette di determinare la quantità assoluta dell'antigene nel campione analizzato. Richiede due anticorpi che riconoscono epitopi diversi sull'antigene (Fig.4). Questo risultato può essere raggiunto sia utilizzando due anticorpi monoclonali con diversa specificità, o anticorpi policlonali (contengono molteplici specificità perché nella loro secrezione intervengono diverse cellule B che riconoscono regioni o epitopi diversi sull'antigene). Ha quindi i vantaggi di non dover utilizzare anticorpi purificati e ha un elevato indice di specificità. La sensibilità di questa tecnica dipende da 4 variabili:

- numero di molecole del capture antibody legato alla fase solida;
- avidità del capture antibody per l'antigene;
- avidità del detection antibody per l'antigene;
- attività specifica del detection antibody.

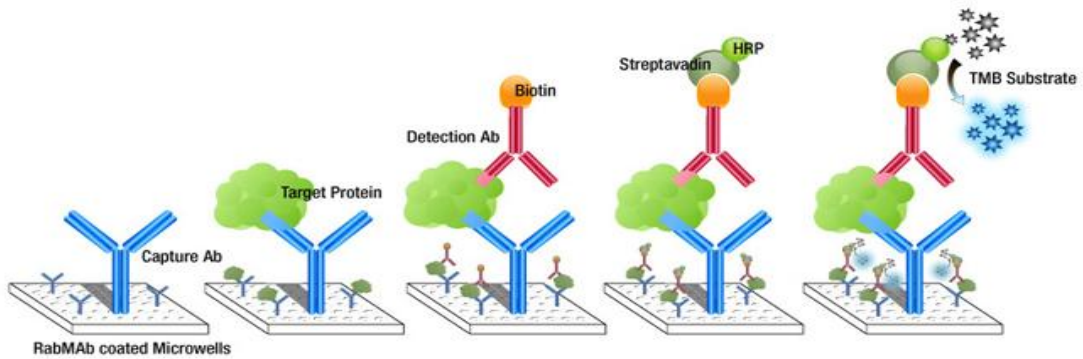


Fig.4: esempio di Sandwich Elisa .Fonte :www.epitomics.com

L'Elisa Competitivo Diretto è un saggio che coinvolge l'uso del coniugato antigene-enzima e dell'antigene incognito. Una quantità fissa di antigene marcato e diluizioni decrescenti di antigene libero (come standard o campione) vengono messe a reagire insieme nei confronti di un anticorpo in difetto legato alla fase fissa. In questo modo, l'antigene marcato e quello libero si troveranno a competere per un numero limitato di siti anticorpali. Dopo aver lavato il complesso, si aggiunge il substrato per l'enzima e si misura l'attività enzimatica spettrofotometricamente (Fig.5). La concentrazione del prodotto enzimatico misurata risulterà inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita (antigene non marcato).

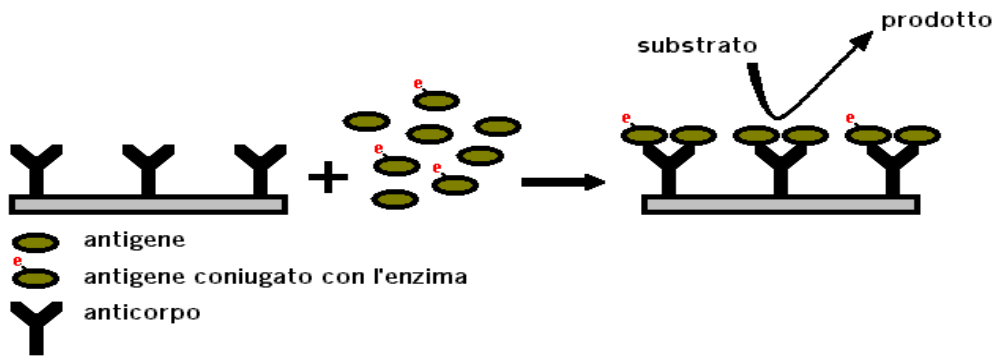


Fig.5: Competitive Elisa. Fonte:www.cosmobio.com

Nell' Indirect Elisa si valuta la presenza dell'anticorpo contro un antigene all'interno del campione. Si procede aggiungendo l'antigene purificato di modo che si leghi alla piastra oppure il siero/plasma da analizzare. Dopo un periodo di incubazione e consecutivi lavaggi, si procede inserendo anticorpi primario specifico per l'antigene, che formerà il complesso antigene-anticorpo. Le molecole che non si sono legate vengono eliminate tramite lavaggi. Si addiziona un secondo anticorpo marcato, che abbia specificità per le immunoglobuline, a loro volta, legate all'antigene. Il secondo anticorpo si lega al complesso antigene-anticorpo immobilizzato sulla piastra e la quantificazione avviene misurando la quantità di anticorpo secondario legato, grazie all'utilizzo di substrati colorimetrici. La reazione di competizione avviene fra l'antigene immobilizzato e quello libero in soluzione come standard o proveniente dal campione, nei confronti dell'anticorpo presente in concentrazione fissa (Fig.6). La misura del prodotto enzimatico sarà direttamente proporzionale nel caso della misura del titolo dell'anticorpo da determinare, mentre inversamente proporzionale per l'analita.

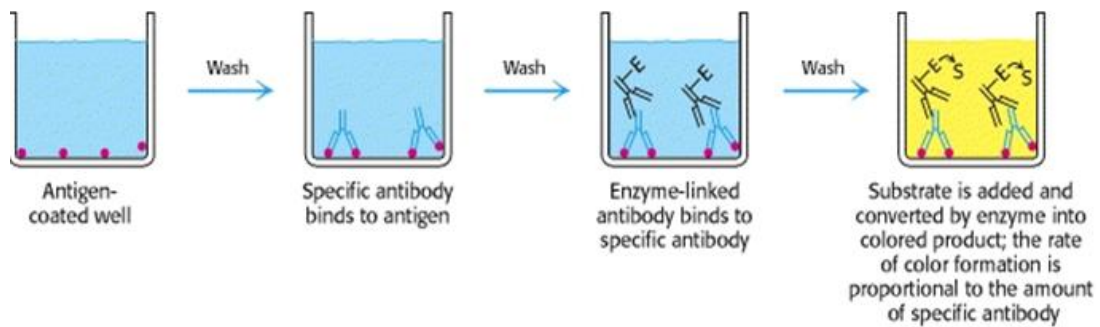


Fig.6:Kit Elisa Competitivo Indiretto. Fonte: www.pharmatutor.org

In generale possiamo dire che le tecniche ELISA non competitive offrono una maggiore sensibilità rispetto alle competitive e che la rilevabilità finale di un'analisi competitiva è limitata dalla costante di affinità dell'anticorpo usato. Inoltre la sensibilità finale dei saggi non competitivi è determinata dal binding non specifico degli immunoreagenti marcati, mentre per tutti i saggi l'uso dell'anticorpo secondario consente un'amplificazione della risposta del saggio, poiché quando si lavora con il solo anticorpo primario la sensibilità dell'analisi è fortemente influenzata dall'affinità del sistema Ag-Ab-E. Non bisogna dimenticare che quando si lavora con campioni reali (sieri, urine, tessuti, ecc), possono essere presenti proteine in grado di modificare i traccianti enzimatici (proteasi), oppure di inibirne l'attività.

Per sensibilità (analitica) si intende la capacità di un metodo di distinguere piccole variazioni di concentrazione di analista; mentre per specificità (analitica) si intende la capacità di una metodica di determinare efficacemente solo e soltanto l'analista.

La sensibilità di un Kit Elisa, di qualunque tipologia esso sia, è influenzato da diverse variabili quali:

- concentrazione dell'analita;

- sensibilità del sistema di rilevazione;
- affinità dell'anticorpo da utilizzare;
- tempo di incubazione;
- tempo di sviluppo del prodotto enzimatico;
- precisione del saggio;
- volumi utilizzati.

5. Analisi dei possibili marcatori

I Biomarcatori sarebbero utili nella gestione di tre aspetti clinici del MPM: diagnosi precoce, la prognosi e la previsione sull'esito del trattamento. Tra i biomarcatori diagnostici "classici" misurati in fluidi biologici troviamo le citocheratine e antigeni di superficie cellulare, ma nessuno di essi permette la discriminazione tra pazienti con MPM da quelli con altri tumori maligni o malattie non maligne. Osteopontina, mesotelina solubile e fattore di potenziamento megacariociti (MPF) sembrano essere i più promettenti dei recenti biomarcatori, ma sono ancora soggetti ad alcune limitazioni. I pannelli costituiti da un piccolo gruppo di biomarcatori non migliorano la resa diagnostica, e risultati di profilo molecolare sono troppo preliminari per essere portati nella pratica clinica quotidiana. Questa carenza di biomarcatori accurati rende, quindi, la diagnosi, la prognosi e la prevenzione del MPM impegnative [44]. Il "gold standard" attuale della diagnosi del MPM è una combinazione di due marcatori immunohistochimici negativi e due positivi validi per il MPM di tipo epitelioide e di tipo bifasico, ma non per quello di tipo sarcomatoide poiché non ha marcatori specifici, il che rende più difficile la sua diagnosi [45,46]. L'Osteopontina manca di specificità per il mesotelioma, mentre sia la mesotelina solubile (nel siero e nei liquidi pleurici) e *MPF* hanno elevata specificità, ma mancano di sensibilità per la rilevazione di sottotipi non epiteliali, ragion per cui sono considerati coadiuvanti diagnostici. Le mutazioni del gene *BAP1*, che assiste sia la crescita e la soppressione delle cellule tumorali, sono potenziali markers di MPM [46].

Come detto in precedenza le caratteristiche di immunohistochimica dell'MPM epitelioide sono abbastanza chiare, mentre le analisi immunohistochimica di mesotelioma sarcomatoide, il tipo meno comune,

sono limitate e la sua distinzione da altri tumori della parete toracica, polmone e pleura è spesso problematico. Da studi fatti su pazienti con mesotelioma pleurico sarcomatoide l'anticorpo monoclonale D2-40 e podoplanina sono marcatori immunoistochimici altamente sensibili per il mesotelioma sarcomatoide.[47].

In letteratura sono presenti anche studi comparativi tra tumori benigno, MPM e carcinoma, da cui si è evinto la possibile valutazione di possibili altri nuovi marcatori. Lo studio si è basato su campioni provenienti da 22 pazienti con MPM epitelioide, 10 con adenocarcinoma, 10 con carcinoma a cellule squamose e 11 campioni di pazienti con mesotelioma benigno (di cui 6 con infiammazione delle pleure e 5 con iperplasia). Utilizzando le tecniche di elettroforesi bidimensionale, MS e WB si è evidenziato una differente espressione proteica in tutte e tre le tipologie di malattia. Nello specifico, le anomalie di espressione più evidenti sono state di otto proteine: Vimentina (VIM), Desmina e Calretinina (marcatori già conosciuti), PreLamin A/C, Aldolasi A (ALDOA), Myosin Light Chain 2 (MYL2), Myosin Light Chain 3 (MYL3) e Myosin Light Chain 6B (MYL6B). Confrontando i valori di MPM rispetto al mesotelioma benigno si è notato un aumento nell'espressione della prelamin A / C, VIM, e calretinina e una diminuzione di espressione di desmina, ALDOA, MYL6B, MYL3, and MYL2. Il confronto MPM contro il carcinoma polmonare ha invece mostrato l'aumento di espressione di PreLamin A/C, VIM e Calretinina e la diminuzione di espressione di desmina, ALDOA, MYL6B, MYL3, e MYL2.

Infine, non è stata trovata una differenza di dati statisticamente significativa tra mesotelioma benigno e carcinoma per tutte le proteine eccezione per preLamin A/C e MYL6B[48].

Per valutare la capacità predittiva delle proteine di discriminare i due tumori maligni, sono stati poi confrontati l' MPM e il carcinoma come parametri sono stati presi in considerazione la sensibilità, la specificità e la AUC .Oltre alla Calretinina che ha confermato essere un presunto biomarker MPM con valori di sensibilità e la specificità di 0,71 e 0,86, rispettivamente, la PreLamin A / C e VIM presentano valori confrontabili di sensibilità (circa 0.7) ma con una maggiore specificità della PreLamin A / C rispetto alla stessa Calretinina (0,95 rispetto a 0,86). Inoltre, la capacità di discriminazione di queste proteine è stato anche valutato per MPM vs tutti i controlli (campioni tumorali e non tumorali). Anche se i valori di sensibilità e specificità sembrano essere ridotti, i valori di AUC per Calretinina e PreLamin A / C erano sempre > 0.7 .(49)

5.1 Vimentina, Desmina e Prelamin A/C

In seguito ad analisi su campioni di biopsie di soggetti con MPM, tumori benigni(infiammazioni della pleura e iperplasie) e carcinoma polmonare (adenocarcinoma e carcinoma delle cellule squamose) utilizzando tecniche alcune tecniche di proteomica come l'elettroforesi bidimensionale, il Western blot e la spettrometria di massa, sono state prese in considerazione otto proteine come possibili marcatori per la differenziazione del MPM: Vimentina(VIM), Desmina e Calretinina (marcatori già conosciuti), prelamin A/C, ALDOA, MYL2 ,MYL3 e MYL[48].

Particolare attenzione è stata riposta su 3 proteine di interesse, oggetto di studio in questa tesi , quali : Vimentina, Desmina e PreLamin A/C.

Le prime due proteine appartengono famiglia delle IF(filamenti intermedi) che sono codificate da una grande famiglia di geni (~ 70) presenti negli esseri umani, nei topi e in altri mammiferi . Ci sono sei principali categorie di filamenti intermedi che si presume siano legati a determinati tipi di cellule . I filamenti di tipo I e II contengono cheratine acide e basiche(si trova principalmente nelle cellule epiteliali), di tipo III sono formate per lo più da vimentina (nelle cellule mesenchimali) e desmina (nelle cellule muscolari),IF tipo IV sono costituite da neurofilamenti (nei neuroni),IF tipo V da lamine (nel nucleo delle cellule) e di tipo VI da nestina (nei neuroni embrionali). Inoltre, ci sono le proteine associate IF (IFAPs) che compongono i filamenti intermedi in fasci e reti, e tra di esse troviamo la plectina, ankyrina, desmoplakina e fillagrina[49] .

La Vimentina, una proteina di 57 kDa, è una delle proteine più ampiamente espresse e altamente conservate del tipo III IF famiglia di proteine. La Vimentina, appartiene alla famiglia dei filamenti intermedi (IF) di proteine, è ubiquitariamente espressa in cellule mesenchimali normali ed è nota per mantenere l'integrità cellulare e fornire la resistenza contro lo stress. La Vimentina si esprime in una vasta gamma di tipi di cellule, comprese le cellule pancreatiche precursori, cellule di Sertoli, cellule precursori neuronali, cellule giganti trofoblastiche, i fibroblasti, le cellule endoteliali, vasi sanguigni, cellule tubulari renali, macrofagi, neutrofili, cellule mesangiali, leucociti e stromale renale cellule .L'aumento dell'espressione della Vimentina è stato segnalato in vari tumori epiteliali tra cui il cancro alla prostata, tumori gastrointestinali, i tumori del sistema nervoso centrale, il cancro al seno, melanoma maligno, il cancro del polmone e altri tipi di tumori. La sovraespressione di Vimentina nel cancro è correlata ad una maggiore crescita del tumore, invasività e, di conseguenza, ad una prognosi infausta. Tuttavia, il ruolo della vimentina nella progressione del cancro

rimane oscuro. Negli ultimi anni, vimentina ha acquisito molta importanza come marker per la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), un processo di riprogrammazione cellulare in cui le cellule epiteliali acquisiscono un fenotipo mesenchimale che rende le cellule a modificare drasticamente la loro forma e mostrano aumento della motilità. Questo EMT è caratterizzata dall'espressione della vimentina nelle cellule epiteliali, che normalmente esprimono solo la cheratina. Di conseguenza, durante il processo inverso di EMT, noto come transizione mesenchimale-epiteliale (TEM), le cellule iniziano acquisizione fenotipo epiteliale e mostra un'espressione vimentina diminuita. Sebbene EMT è associato a un numero di eventi tumorigeniche, il ruolo di vimentina negli eventi sottostanti che mediano questi processi rimane non molto chiaro[49].

La Desmina, proteina IF muscolo-specifica, forma una struttura tridimensionale che collega l'apparato contrattile, tramite i dischi Z, al nucleo, ai dischi intercalari (ID), e ai costameres della membrana plasmatica, mitocondri e altri organelli membranose. In qualità di principale integratore della struttura-funzione di tutti questi componenti, la desmina ha la capacità di agevolare processi chimici e meccanici riguardo la segnalazione e il trasporto tra la matrice nucleare e extracellulare, così come il cross-talk tra diversi organelli cellulari. La deregolamentazione di tali comunicazione intracellulari conduce a patologie croniche al muscolo scheletrico e a patologie cardiache, mutazioni nei geni che codificano per desmina e lamins sembrano essere finora principali cause genetiche di queste malattie.

Eventuali carenze, mutazioni, scissione e altre alterazioni post-traduzionali della desmina possono causare difetti di membrane e difetti a organelli membranosi, determinando in tal modo miopatie scheletriche e cardiache

,collettivamente chiamate *desmin related myopathies (DRMs)* o *desminopatie*, riscontrate sia nei topi che nell'uomo. Possibile causa di disfunzioni della desmina è la mutazioni del gene Desmina (DES) o alterazioni sempre a livello genico di tipo post-traslazionali provoca miopatie scheletriche e cardiache[50].

Negli ultimi 20 anni, sono stati considerati come biomarcatori per distinguere tra MM e *Reactive Mesothelial Cells (RMC)* una vasta gamma di proteine tra cui la Desmina. Tuttavia, i risultati di queste indagini sono stati contraddittori. Nella loro sistematica revisione, si è visto che l'antigene di membrana epiteliale(EMA) e desmina sembrano essere i biomarcatori più utili, ma, la sensibilità diagnostica e specificità di questi marcatori sono inferiori al 90%, e svolgono un ruolo limitato nella pratica clinica quotidiana[51]

Lamina A e C sono due proteine strutturali della lamina nucleare, uno strato fibroso sul lato nucleo-citoplasmatico della membrana nucleare interna, che è pensato per fornire un quadro di riferimento per la membrana nucleare e interazioni della cromatina. Lamina A e C sono presenti in quantità uguali nella lamina di mammiferi e giocano un ruolo importante nel montaggio nucleare, organizzazione della cromatina, membrana nucleare, e nella formazione dei telomeri. Sfruttando la tecnica del Western Blot si è rilevato una banda a 73 kDa corrispondente ai precursori prelamin A / C delle rispettive Lamine, confermate dall'identificazione con MS. Da un punto di vista funzionale, PreLamin A / C in grado di accelerare la senescenza delle cellule muscolari lisce, interrompere la mitosi e indurre danni al DNA in cellule muscolari lisce, con conseguente fallimento mitotico, instabilità genomica e senescenza prematura[48]. Difetti durante i processi post-traslazionali di questa proteina sono stati studiati in topi e tali anomalie hanno portato alla comparsa di cardiomiopatia, distrofia

muscolare e progeria. Potremmo ipotizzare che l'aumento di questo precursore potrebbe essere imputabile ad un difetto dei meccanismi di post-traduzionali che generano le due forme mature. D'altra parte, anche l'aumento della Lamina B, insieme prelamin A / C, potrebbe essere visto come un senescente risposta al proliferare incontrollato delle cellule mesoteliali [48].

6. Le prospettive di studio

Negli ultimi anni la ricerca ha preso una direzione precisa che sta migliorando significativamente le prospettive nella lotta al mesotelioma pleurico

maligno:

- 1) Identificazione di targets terapeutici e validazione di biomarcatori.
- 2) Studi genetici sul patrimonio genetico del mesotelioma che verranno raccolti nel nascente consorzio mondiale per lo studio del genoma dei tumori umani (Cancer Genome Atlas). I risultati di questa ricerca consentiranno di identificare i geni responsabili della trasformazione neoplastica e di quelli potenzialmente controllabili mediante innovativi approcci terapeutici (terapia genica o farmacologica)
- 3) Progetto per la Terapia personalizzata del mesotelioma pleurico. Presso il Wellcome Sanger Institute di Cambridge (UK) è stato condotto un progetto di studio genetico del Mesotelioma con obiettivo la messa a punto di terapie personalizzate per ciascun paziente con Mesotelioma pleurico, in quanto recentissime evidenze hanno dimostrato che talora profili genomici più aggressivi spesso sono posizionati in prossimità di profili meno aggressivo nell'ambito del tessuto tumorale dello stesso paziente [52].

SCOPO DELLA TESI

Al fine di ottenere una diagnosi precoce e specifica per il Mesotelioma Pleurico Maligno , un ruolo di spicco e di fondamentale utilità lo ha l'identificazione di nuovi marcatori biologici. In seguito a ricerche condotte dal gruppo di ricerca del Prof. Lucacchini del Dipartimento di Farmacia in collaborazione con il Prof. Cristaudo responsabile dell'UO di Medicina del Lavoro dell'Azienda ospedaliera pisana, su campioni biotici provenienti da pazienti malati di MPM, tumori benigni e carcinomi polmonari sono state individuate tramite un approccio proteomico, nuove proteine che possono essere considerate come potenziali marcatori biologici nella diagnosi differenziale dell'MPM . Tra queste degne di nota sono risultate Vimentina (VIM), Desmina (marcatori già conosciuti), e prelamin A/C. Oggetto di questa tesi è la valutazione di un reale utilizzo di queste proteine, nel dettaglio Vimentina e Desmina , come marcatori del mesotelioma pleurico maligno , analizzando i livelli di concentrazione delle proteine durante la fase di diagnosi e la fase di terapia e la messa a punto di un kit ELISA specifico per la PreLamin A/C per una sua futura validazione.

I campioni utilizzati in questo caso non sono più biopsie, ma siero e plasma, fluidi biologici facilmente reperibili permettendo un campionamento su più larga scala.

Il metodo da noi utilizzato per la validazione della proteine prese in considerazione è il Kit ELISA, che tramite anticorpi specifici per una determinata proteina, permette di consolidare o smentire l'ipotesi da noi avanzata.

Avere a disposizione una vasta gamma di marcatori biologici per il mesotelioma pleurico maligno permetterebbe inoltre, non solo una diagnosi precoce ma anche un loro utilizzo in ambito clinico per valutare l'efficacia di una terapia.

MATERIALI E METODI

Kit ELISA per Vimentina

I Pazienti

Con un approccio di tipo casuale, sono stati selezionati 87 pazienti suddivisi poi in tre categorie:

- 41 soggetti esposti a fattori di rischio per l' insorgenza del tumore, ma che non lo hanno sviluppato, definiti "EX-ESPOSTI (EX)";
- 25 soggetti con diagnosi di MPM, non ancora in trattamento, definiti "DIAGNOSI"(D);
- 21 soggetti con MPM in terapia, definiti "TERAPIA"(T).

Dai pazienti non in terapia (EX e D) è stato ottenuto un solo campione di siero, mentre dai pazienti T sono stati prelevati 3 campioni consecutivi relativi a diverse fasi della terapia definiti rispettivamente T1 (21 campioni totali), T2 (19 campioni totali) e T3 (14 campioni totali).

Caratteristiche del Kit

Il rilevamento della Vimentina nei campioni di siero è stato effettuato tramite Human Vimentin (VIM) ELISA kit (MyBioSource, San Diego, California, USA)

Il kit Vimentina è caratterizzato da una specificità eccellente per Vimentina umana, senza presentare significative reattività crociata o interferenze tra il VIM e analoghi e da una sensibilità (o limite di rilevazione) di 0,1 ng/mL.

I principi del test

Kit VIM ELISA applica la tecnica immuno-enzimatica di tipo competitivo, utilizzando un anticorpo monoclonale anti-VIM ed un coniugato VIM-HRP. Il campione del test e il tampone sono incubati insieme con il coniugato VIM-HRP nella piastra pre-rivestite per un'ora. Dopo il periodo di incubazione, i pozzetti sono decantati e lavati per cinque volte. I pozzetti vengono quindi incubati con substrato per enzima HRP. Il prodotto della reazione enzima-substrato forma un complesso di colore blu. Infine, una soluzione di arresto (stop solution) viene aggiunta per fermare la reazione, facendo virare la soluzione in gialla. L'intensità del colore è misurata spettrofotometricamente a 450 nm in un lettore per micropiastre.

L' intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di VIM, poiché la VIM dei campioni e la VIM del coniugato VIM-HRP competono per il sito di legame dell'anticorpo anti-VIM. Dal momento che il numero di siti è limitato, quanti più siti sono occupati dalla VIM dal campione, tanto minore è il numero di quelli legati al coniugato VIM-HRP. Una curva standard è tracciata in base all'intensità del colore (OD) e alla concentrazione di standard. La concentrazione di VIM in ciascun campione viene interpolata dalla curva standard.

Materiali

Il Kit comprende i seguenti materiali:

MATERIALI	SPECIFICAZIONE	QUANTITA'
PIASTRA	96 pozzetti	Stripwell
ENZIMA CONIUGATO	6.0 mL	1 fiala
STANDARD A	0 ng/mL	1 fiala
STANDARD B	1.0 ng/mL	1 fiala
STANDARD C	2.5 ng/mL	1 fiala
STANDARD D	5.0 ng/mL	1 fiala
STANDARD E	10 ng/mL	1 fiala
STANDARD F	25 ng/mL	1 fiala
SUBSTRATE A	6 mL	1 fiala
SUBSTRATE B	6 mL	1 fiala
STOP SOLUTION	6 mL	1 fiala
WASH SOLUTION (100 x)	10 mL	1 fiala

Preparazione dei campioni

Si scongelano lentamente i campioni di siero prima del test, successivamente si applica una diluizione 1:10 con PBS(7.0/7.2).

Preparazione dei reagenti

Si diluiscono 10 ml di soluzione di lavaggio (Wash Solution) concentrata (100 x) con 990 mL di acqua deionizzata o distillata per preparare 1000 mL di Soluzione di lavaggio (1 x). La soluzione 1 x lavaggio è stabile per 2 settimane a 2-8 ° C. Non diluire gli altri componenti che sono pronto all'uso.

Procedura di Analisi

- Si fissa il numero necessario di pozzetti sul supporto poi si aggiunge 100 µl di Standard e di campione nei pozzetti pre-rivestiti di anticorpo. Si aggiungono 100 µl di PBS (pH 7,0-7,2) nel pozzetto che costituirà il Bianco.
- Si aggiungono 50 µl di coniugato in ogni pozzetto (non del Bianco). Si mescola bene. Si copre e si lascia ad incubare la piastra per 1 ora a 37 ° C.
- Si rimuovono la miscela di incubazione gettando il contenuto della piastra in un lavandino o in un adeguato contenitore per rifiuti. Si riempie ogni pozzetto completamente con 400 µl di soluzione di lavaggio 1x, e si lava via nuovamente il contenuto della piastra in un lavandino. Si ripete questa procedura cinque volte per un totale di cinque lavaggi. Dopo il lavaggio, si capovolge e si sbatte la piastra su dei tovaglioli di carta o di carta assorbente , fino a quando non viene visualizzata tracce di soluzione o umidità. La rimozione completa del liquido ad ogni passo è essenziale per una buona prestazione.
- Si aggiungono 50 µl di Substrato A e 50 µl di substrato B in ogni pozzetto compreso il controllo del bianco, successivamente si copre e si incuba per 10-15 minuti a 37 ° C ,evitando la luce solare.
- Si aggiungono 50 µl di soluzione di bloccaggio(Stop Solution) in ogni pozzetto, compreso nel pozzetto di controllo. Mescolare bene.
- Si determina la densità ottica (OD) a 450 nm con il lettore di piastra detto Wallac.

Calcolo dei risultati

Calcolare la media dei valori doppi per ogni standard e campione. Si sottrae il valore del bianco dal valore di ogni O.D di standard e campione. Quindi si calcola l'equazione lineare della retta di taratura e il coefficiente di regressione lineare. Tramite un'interpolazione si calcola quindi la concentrazione incognita dei campioni.

Kit ELISA per Desmina

I pazienti

Sono stati selezionati, secondo un criterio casuale, 88 campioni di plasma provenienti da altrettanti pazienti. I campioni sono stati divisi in tre gruppi:

- 41 campioni provenienti da soggetti sani, definiti "EX-ESPOSTI";
- 27 campioni prelevati da pazienti a cui è stato diagnosticato il Mesotelioma Pleurico Maligno, denominati "DIAGNOSI";
- 20 campioni prelevati da pazienti affetti da Mesotelioma Pleurico Maligno, ma in fase di terapia, denominati "TERAPIA".

Caratteristiche del kit

Il rilevamento della Desmina nei campioni di plasma è stato effettuato tramite ELISA kit for Desmina (USCN, Busines Co., Ltd.).

Questo dosaggio ha alta sensibilità e ottima specificità per il rilevamento della Desmina, la dose minima rilevabile è in genere inferiore a 0.124ng / mL.

I principi del test

Il kit è un tipo di dosaggio immuno-enzimatico detto a Sandwich. La micropiastra fornita in questo kit è stata pre-rivestita con un anticorpo specifico per Desmina (DES). Standard o campioni vengono quindi aggiunti ai pozzetti con un anticorpo biotina-coniugato specifico Desmina (DES). Successivamente, Avidina coniugata con perossidasi di rafano (HRP) viene aggiunta a ogni pozzetto e si lascia in incubazione. Dopo si aggiunge il TMB e solo quei pozzi che contengono Desmin (DES), anticorpo biotina coniugato e l'enzima coniugato Avidina avranno un cambiamento di colore. La reazione enzima-substrato viene terminata mediante l'aggiunta di soluzione di acido solforico e il cambiamento di colore viene misurato spettrofotometricamente a una lunghezza d'onda di $450 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$. La concentrazione di Desmin (DES) nei campioni è determinata confrontando l'assorbimento dei campioni con la curva standard.

Materiali

Il Kit è composto da:

<i>MATERIALI</i>	<i>QUANTITA'</i>
Piastra con 96 pozzetti già pronta	1
Standard	2
Reagente A	1×120μL
Reagente B	1×120μL
TMB (substrato)	1×9mL
Wash Buffer (30x)	1×20mL

Foglio sigillante per la piastra	4
Diluyente per Standard	1×20mL
Diluyente per Reagente A	1×12mL
Diluyente per Reagente B	1×12mL
Stop Solution	1×6mL

Preparazione dei Campioni

I campioni di plasma vengono raccolti in EDTA o eparina (come anticoagulanti) e centrifugati per 15 minuti a $1000 \times g$ a $2 - 8^{\circ} C$ entro 30 minuti dal prelievo. i campioni possono essere consumati subito per un dosaggio o divisi in aliquote e conservati a $-20^{\circ} C$ o $-80^{\circ} C$ per un uso successivo. Evitare ripetuti cicli di congelamento / scongelamento. Il campione viene diluito 1:4 con PBS 0.01mol/L (pH=7.0-7.2).

Preparazione dei Reagenti

Si portano tutti i componenti del kit e i campioni a temperatura ambiente ($18-25^{\circ} C$) prima dell'utilizzo.

Standard – si prepara lo standard con 1,0 ml di diluyente standard, tenuto per 10 minuti a T ambiente e agitato delicatamente (non si deve formare la schiuma). La concentrazione dello standard nella soluzione di riserva (Stoch solution) è 20ng / mL.

Si dispongono 7 eppendorf contenenti 0,5 ml di diluyente per lo standard e si producono una serie di diluizione a doppio come riportato in figura 7.

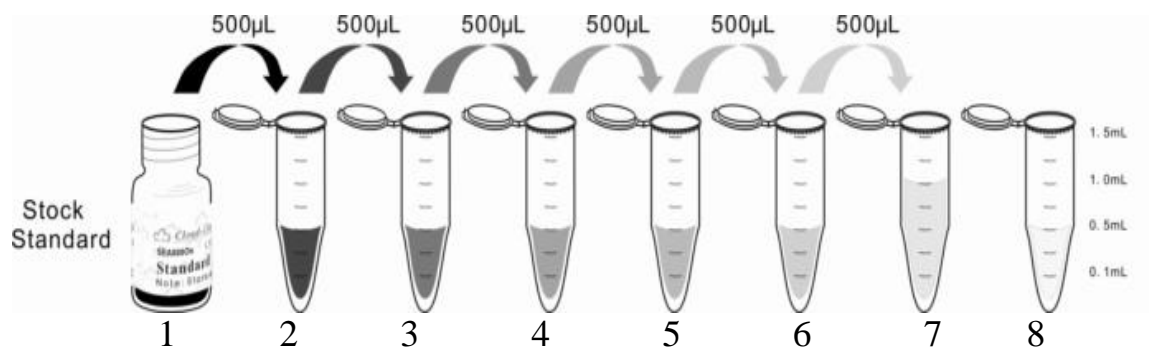


Fig 7: Diluizioni seriali. Fonte: USCN, Busines Co.,Ltd

Si mescola ogni provetta accuratamente prima del successivo trasferimento. Si impostano i 7 punti scelti con la diluizione dello standard come 20ng / ml, 10ng / ml, 5ng/ mL, 2.5ng / mL, 1.25ng / mL, 0.625ng / mL, 0.312ng / mL, e l'ultima provetta, con solo il diluente per lo standard, è il bianco.

ES: Tube	1	2	3	4	5	6	7	8
ng/mL	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0

Reagenti A e B: si agitano i due flaconi e diluire secondo il rapporto 1:100 con i rispettivi Diluenti per Reagente A e Diluente per Reagente B.

Wash Buffer: si diluiscono 20 ml di soluzione di Wash Buffer (30 ×) con 580 ml di acqua deionizzata o distillata per preparare 600 mL di soluzione di lavaggio (1 ×).

Procedura di Analisi

- Si aggiunge in ogni pozzetto 100µl di standard (con le giuste diluizioni) ,il bianco e i campioni correttamente diluiti. Si copre con il foglio sigillante e incubare per 2 ore a 37 ° C.
- Si rimuove il liquido di ogni pozzetto senza lavare.
- Si aggiungono 100µl di Reattivo A in ogni pozzetto e si incubano per 1 ora a 37 ° C , coprendo sempre con il foglio sigillante.

- Si elimina la soluzione e lavare con 350µL di Wash Buffer 1x ogni pozzetto, si lascia riposare per 1 ~ 2 minuti.
- Si rimuove il restante liquido da tutti i pozzetti completamente sbattendo la piastra su carta assorbente.
- Si ripete completamente per altre 3 volte e dopo l'ultimo lavaggio, si elimina ogni residuo di tampone di lavaggio o di umidità all'interno dei pozzetti.
- Si aggiungono 100µl di Reagente B in ogni pozzetto. Si incuba per 30 minuti a 37 ° C ,coprendolo con il foglio sigillante.
- Si ripete il processo di lavaggio/asciugatura per un totale di 5 volte come condotto precedentemente.
- Si aggiungono 90µL di TMB in ciascun pozzetto, si copre e si incuba per 15 - 25 minuti a 37 ° C (non superare i 30 minuti). Proteggere dalla luce. Il liquido diventa blu con l'aggiunta del substrato.
- Si aggiungono 50µL di Stop Solution in ogni pozzetto. Il liquido diventerà giallo con l'aggiunta di quest'ultima. Mescolare il liquido,toccano il lato della piastra, se il cambiamento di colore non appare uniforme, si picchietta delicatamente la piastra per garantire l'omogeneità della miscela.
- Si rimuove ogni goccia d'acqua e l'impronta digitale sul fondo della piastra e si conferma che non ci sia nessuna bolla sulla superficie del liquido. Quindi, si esegue la lettura della micropiastra a 450 nm immediatamente.

Calcolo dei risultati

Si calcola la media dei valori duplicati per ogni standard, del bianco e dei campioni e sottrarre il valore medio della densità ottica che è pari a zero. Si costruisce un grafico con la concentrazione della desmina sul y

e l'assorbimento sull'asse x. All'interno vi traccio i punti che corrispondono ai valori degli standard e costruisco una retta. Se sono stati diluiti i campioni, la concentrazione ottenuta dalla retta standard deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione.

Messa a punto Kit ELISA "home-made" per Prelamin A/C

.

Materiali

Per la costruzione del kit sono stati utilizzati:

- Tampone carbonato/bicarbonato pH 9.75 (Na_2CO_3 25mM, NaHCO_3 25mM).
- PBS pH 7.1 : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 20mM/ NaCl 0.9%/ H_2O .
- TWEEN 20
- BSA al 3% in PBS-TWEEN 20(0.05%)
- anticorpo primario preLMN A/C (Rabbit Anti-Human Prelamin A DIATHEVA)
- Ab secondario: anti-Rabbit HRP coniugato (1:25000)
- Standard (STD) preLMN A/C (Ricombinant Prelamin DIATHEVA)
- Piastre vergini per ELISA (THERMO SCIENTIFIC NUNC)

- Kit commerciale (Cell Signaling Thecnology) per lettura saggio ELISA (soluzione di sviluppo TMB substrate e soluzione di stop)
- Strumento per incubazione piastra ELISA (THERMO-SHAKER PST-60HL BIOSAN)
- Strumento per lettura ELISA (Wallac Victor² 1420 multilabel counter PERKIN ELMER)

I principi del test

La valutazione della presenza della Prelamin A/C nei campioni di siero e plasma è stato effettuato tramite Il kit ELISA “home-made” messo a punto all’interno dei nostri laboratori.

Il kit è di tipo competitivo indiretto, competitivo perchè sfrutta la competizione tra antigene (nel nostro caso la proteina Prelamin A/C), legato al pozzetto, e l’antigene all’interno del campione aggiunto assieme all’anticorpo I , per il legame con l’anticorpo I specifico per l’antigene. Indiretto perché la determinazione quantitativa della proteina nel campione è inversamente proporzionale all’assorbimento ottenuto dal legame Ab II- AbI- preLMN A/C attaccata al pozzetto.

Realizzazione di un kit “home-made”

La messa a punto del kit ha richiesto la scelta della giusta concentrazione di proteina per il coating e di anticorpo primario. Sono state saggiate 6 concentrazioni di proteina 10ng 50ng 100ng 250ng 500ng e 1000ng

combinare a tre differenti concentrazioni di anticorpo primario (1 ng, 100ng e 250 ng). Per il nostro kit viene effettuato il coating di 250ng per pozzetto di preLMN A/C. Il rivestimento dei pozzetti della piastra viene effettuato, sia per fare successivamente la retta di taratura sia per andare a determinare i campioni incogniti, con la stessa procedura sperimentale:

- Si prepara una soluzione ad una concentrazione di 0.0025µg/µl dell'preLMN A/C in tampone carbonato/bicarbonato pH 9.75.
- In ogni pozzetto vengono aggiunti 100 µl della soluzione precedente (0.25µg di proteina per pozzetto) e si lascia in incubazione a temperatura ambiente, senza agitazione, per 48 h circa.
- Terminate le 48 h di incubazione per il coating, si procede aggiungendo diverse concentrazioni di proteina standard. Si è scelto di procedere con le seguenti concentrazioni: 800ng/100µl; 600ng/100µl; 400ng/100µl; 200ng/100µl; 100ng/100µl; 50ng/100µl; 25ng/100µl e 0ng/100µl (Bianco).
- Al termine dell'incubazione la proteina non legata viene lavata via e si effettua un lavaggio di ogni pozzetto con 350 µl di soluzione PBS/TWEEN 20. Viene effettuato il blocking (procedura che permette di andare a saturare i siti non specifici presenti nel coating): in ogni pozzetto si aggiungono 200 µl di una soluzione di BSA al 3% in T-PBS e si lascia in incubazione a temperatura ambiente e senza agitazione per 2 h.
- Preparazione delle soluzioni standard alle seguenti concentrazioni:
 - Sol. 1 8000 ng/mL
 - Sol. 2 6000 ng/mL
 - Sol. 3 4000 ng/mL
 - Sol. 4 2000 ng/mL
 - Sol. 5 1000 ng/mL

Sol. 6 500 ng/mL

Sol. 7 250 ng/mL

Bianco 0 ng/mL

La preparazione delle soluzioni viene fatta con una procedura di diluizione seriale a partire da una soluzione madre alla concentrazione 16000 ng/mL dello standard in T-PBS e con l'aggiunta di anticorpo primario con concentrazione di 2500 ng/mL. Il BIANCO contiene una soluzione T-PBS.

- Si getta la soluzione di BSA e si effettua un lavaggio di ogni pozzetto con 350 µl di soluzione T-PBS.
- Si aggiungono in ogni pozzetto 100 µl della soluzione standard di riferimento e anticorpo primario (250ng). Lascio in incubazione alla temperatura di 37°C e 350 rpm per 2 h.
- Si effettuano 5 Lavaggi da 2 min per ogni pozzetto con 350 µl di soluzione T-PBS.
- Si aggiungono in ogni pozzetto 100 µl di una soluzione di anticorpo 2° con diluizione 1:25000, marcato con enzima, in T-PBS, e si lascia in incubazione a 37°C e 350 rpm per 30 min.
- Si effettuano 5 lavaggi da 2 min di ogni pozzetto, con 350 µl di soluzione T-PBS.
- Si aggiungono in ogni pozzetto 100 µl della soluzione di sviluppo TMB substrate. Si lascia in incubazione al buio a 37°C e 350 rpm per 30 minuti dopodiché si aggiungono 100 µl della stop solution e si effettua la lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 450 nm allo strumento (Wallac).

Sulla base dei dati ottenuti e le concentrazioni note degli standard viene costruita la retta di taratura e ricavata l'equazione che verrà poi utilizzata

per ottenere la concentrazione di preLMN A/C nei campioni biologici incogniti.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Vimentina

Dai test tramite kit ELISA per Vimentina abbiamo ottenuto i seguenti valori della curva:

	ASSORBANZA	log abs	[VIM], ng/mL	log [VIM], ng/mL
PBS	1,51			
A	1,655	0,218797998	0	-----
B	0,824	-0,08407279	1	0
C	0,512	-0,29073004	2,5	0,39794
D	0,362	-0,44129143	5	0,69897
E	0,301	-0,5214335	10	1
F	0,145	-0,838632	25	1,39794

Sfruttando questi dati di assorbanza e concentrazione, abbiamo ricavato l'equazione lineare $y=0,5153x-0.0751$ con coefficiente di regressione lineare $R^2 = 0,9782$ (Fig.8)

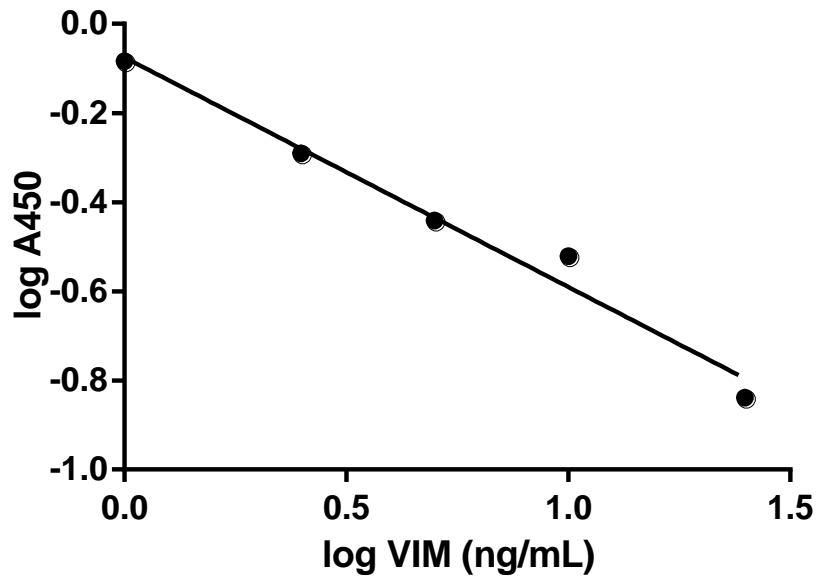


Fig.8: retta di taratura della Vimentina

Di seguito in figura 9 è riportato il grafico a box ottenuto dall'analisi di tutti i campioni processati suddivisi per classi di studio. Il grafico visualizza il valore medio e il valore massimo e minimo all'interno della classe.

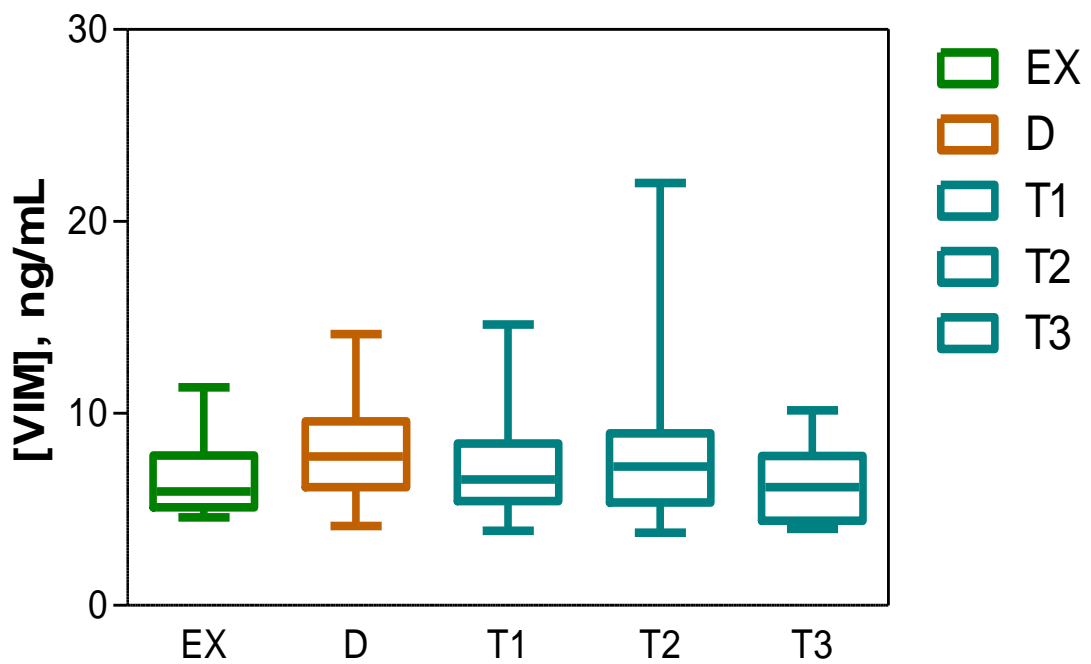


Fig.9: Box-plot delle concentrazioni Vimentina

Per valutare che la differenza tra le medie sia significativa e corrispondente ad una effettiva differenza nell'espressione della proteina VIM nei campioni suddetti, si utilizza il *test t di Student*. La differenza delle medie si considera significativa per valori di p minori di 0,05 (Gli asterischi indicano il grado di significatività: * $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$). In tabella sono riportati i valori di p ottenuti dai diversi confronti

t TEST	P
EX vs D	0,050 *
D vs T1	0,039*
D vs T2	0,149
D vs T3	0,0099**
EX vs T3	0,0075**

Anche nel siero, la concentrazione di vimentina risulta maggiore in modo significativo nei pazienti in diagnosi rispetto agli ex-esposti confermando i risultati ottenuti nell'analisi proteomica su biopsie. Dal confronto dei livelli di Vimentina tra pazienti in diagnosi e in terapia, interessante la riduzione ottenuta al tempo più lungo di trattamento, dove le concentrazioni di vimentina ritornano ai valori di controllo.

Già nota è la correlazione tra l'incremento di VIM nello sviluppo e nella progressione dei tumori [53], poiché assieme ad altre proteine, favorisce la transizione epiteliale mesenchimale (EMT). I risultati sui campioni di siero/plasma, ottenuti tramite tecnica ELISA, hanno confermato i dati acquisiti con il WB, dove è stata rilevata una differenza significativa non solo tra i controlli (ex-esposti) e pazienti, ma anche tra i pazienti in diagnosi e terapia.

Desmina

Dai test tramite Kit Elisa per Desmina abbiamo ottenuto i seguenti valori della curva:

	[DES],ng/mL	Abs-Bianco
Bianco	0	0
A	0,312	0,042
B	0,625	0,071
C	2,5	0,297
D	10	0,603
E	20	0,912

Da questi dati si ottiene l'equazione lineare della retta $y = 0,04476 + 0,07137x$ con $R^2 = 0,9543$ (Fig.10).

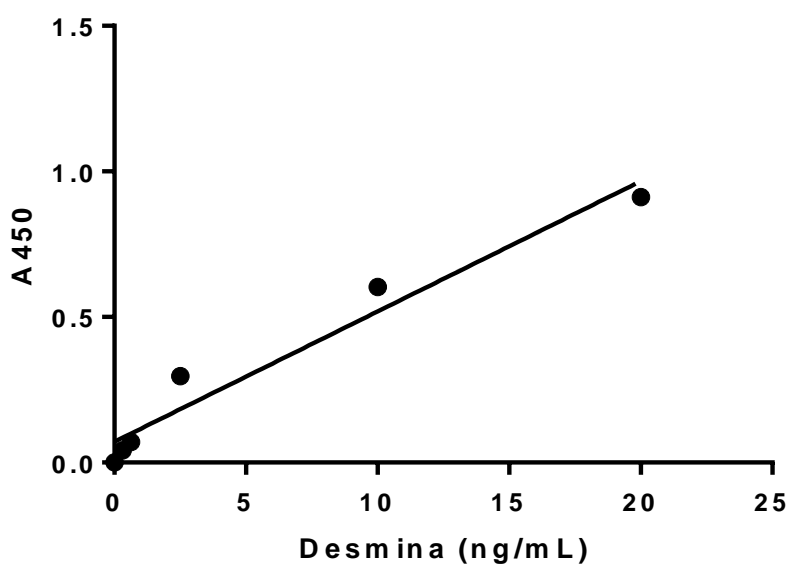


Fig.10: retta di taratura della Desmina

Di seguito in figura 11 è riportato il grafico a box ottenuto dall'analisi di tutti i campioni processati suddivisi per classi di studio. Il grafico visualizza il valore medio, il valore massimo e il valore minimo della desmina all'interno della classe.

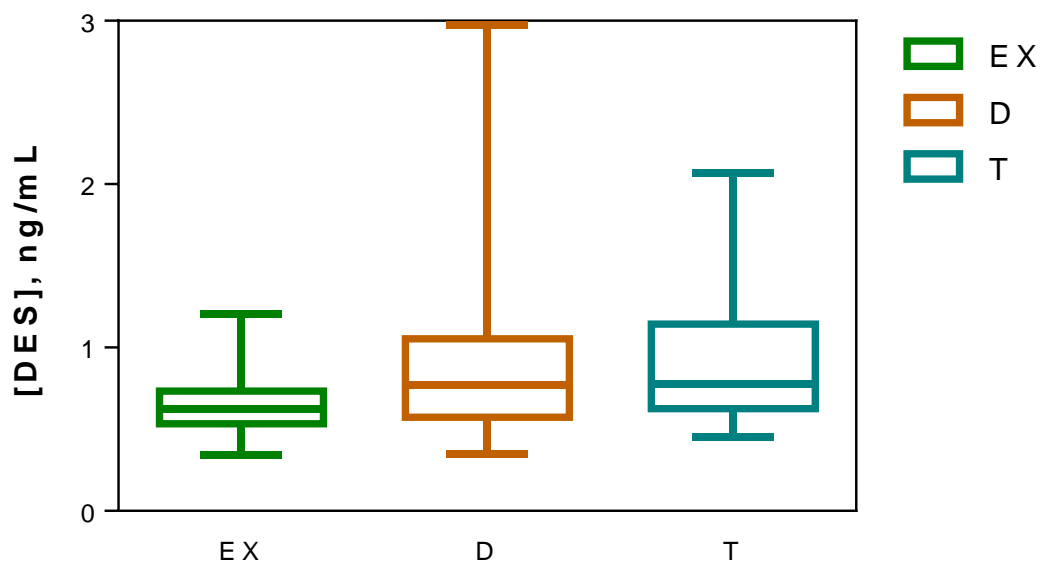


Fig.11: Blox-plot delle concentrazioni Desmina

Per valutare che la significatività nella differenza della concentrazione di desmina plasmatica tra i gruppi di pazienti, si utilizza il *test t di Student*. La differenza delle medie si considera significativa per valori di p minore di 0,05 (Gli asterischi indicano il grado di significatività: * $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$).

t TEST	<i>p</i>
EX vs D	0,0046 **
EX vs T	0,0029 **
D vs T	0,4673

Si evidenzia un aumento significativo di 1.5 volte nel confronto tra EX vs D che rimane a valori sovrapponibili alla diagnosi anche dopo terapia.

I dati della Desmina ottenuti dai campioni biotipici con la tecnica del WB presentano una diminuzione della proteina nei pazienti affetti da MPM, ciò però non è confermato dagli esperimenti effettuati con tecnica ELISA dove nei campioni di plasma si osserva un minimo aumento dei valori della Desmina nei pazienti (D e T) rispetto ai controlli (EX).

ANALISI ROC (Receiver operating characteristic)

Al fine di valutare la sensibilità e la specificità dei due potenziali biomarcatori i dati ottenuti relativi alle concentrazioni delle proteine nel gruppo di controllo e nel gruppo diagnosi sono stati analizzati con il programma Med Calc al fine di ottenere la curva ROC. Tale curva ha permesso di evidenziare i valori di sensibilità e specificità per vimentina e desmina. Vimentina risulta avere una sensibilità del 74% rispetto ad una specificità del 60% (Fig.11). Una specificità più spiccata invece per desmina con valori dell' 83% a scapito però di una sensibilità del 48% come si può vedere in figura 12.

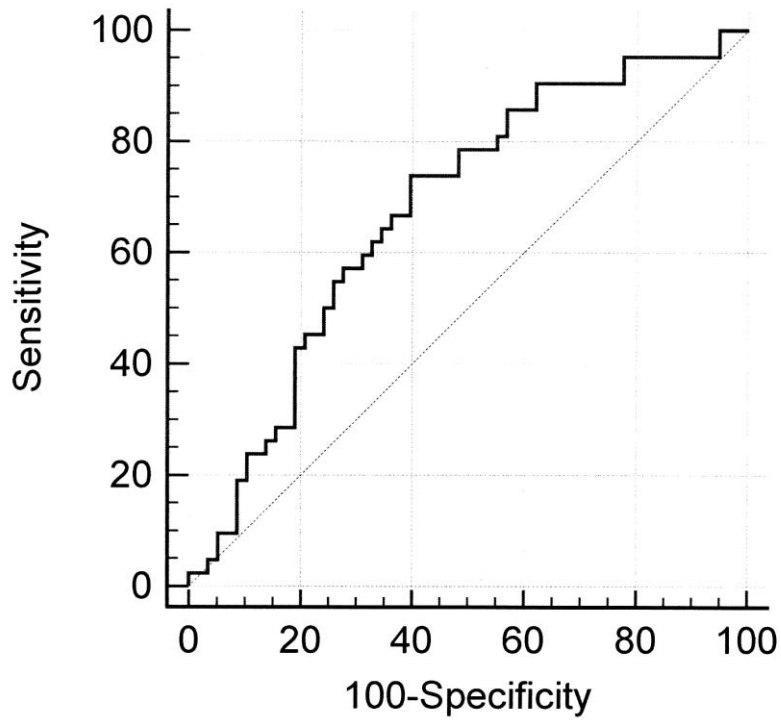


Fig 11:curva ROC Vimentina

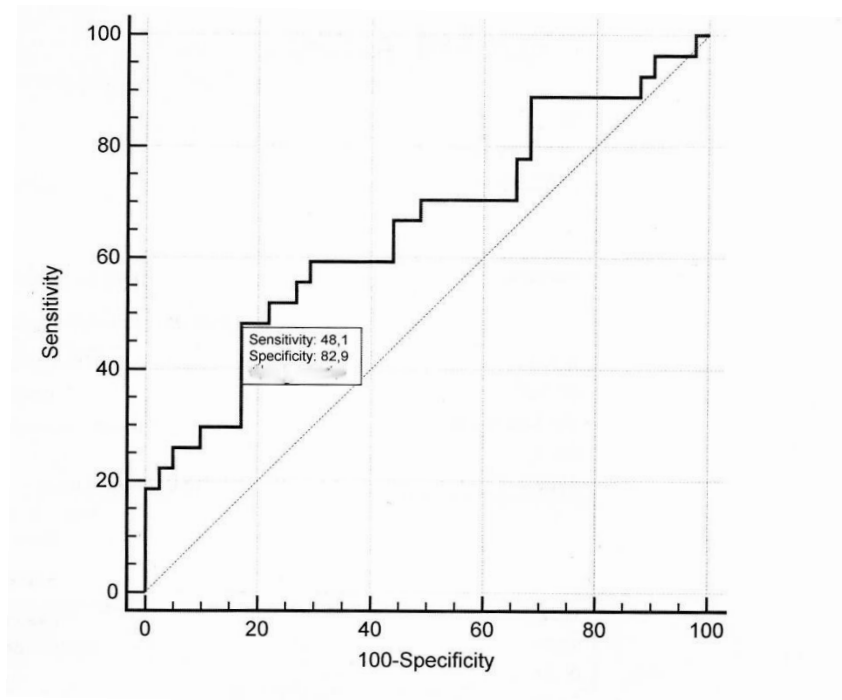


Fig.12:curva ROC Desmina

PreLamin A/C

Tramite il Kit Elisa “home-made” per la PreLamin A/C abbiamo ottenuto i seguenti valori della curva :

	[PreLMN], ng/mL	Abs
Bianco	0	1,407
A	8000	0,475
B	6000	0,538
C	4000	0,528
D	2000	0,799
E	1000	1,044
F	500	1,269
G	250	1,315

Riportando tali valori all'interno di un grafico otteniamo la seguente curva di taratura (Fig.13):

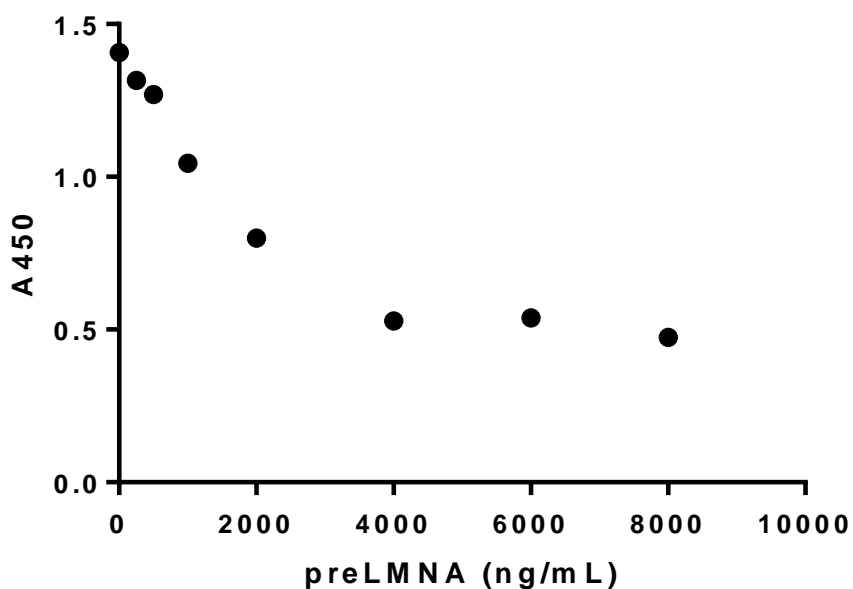


Fig.13: Curva di taratura PreLamin A/C

Per decidere la natura e la diluizione dei campioni si è testata un'aliquota di siero e plasma di un paziente la cui banda al Western Blot contro l'anti-PreLMN fosse molto evidente. I valori ottenuti sono riportati nelle seguenti tabelle, considerando che il valore dell'assorbimento del Bianco è 1.242.

Diluizione del SIERO	Abs 450nm
1:10	1,127
1:50	1,042
1:100	1,212
Diluizione del PLASMA	Abs 450nm
1:10	1,194
1:50	1,062
1:100	1,100

Dato che i campioni di siero diluiti 1:10 e 1:50 spazzavano rispettivamente del 10 e 8%, mentre quelli di plasma del 4 e del 15%, si è deciso di utilizzare come matrice il siero. Poiché lo spiazzamento non era sufficientemente alto e a diluizioni del campione di 1:10 si osservava uno spiazzamento minore rispetto a una diluizione di 1:50 in entrambe le tipologie del campione, si è provato a bollire il campione in presenza di 200ng di PreLamin, con il fine di ridurre eventuali interazioni molecolari che inibissero il legame antigene- anticorpo. I risultati degli assorbimenti sono stati:

CAMPIONE	ABS 450 nm	SPIAZZAMENTO (%)
Bianco	1.176	
Siero 1:10	0.935	31%
Siero 1:50	1.070	10%
Siero 1:10 + PreLMN	0.348	71%
Siero 1:50 + PreLMN	0.495	58%
Siero 1:10 + calore	1.256	-----
Siero 1:50 + calore	1.357	-----
Siero 1:10 + calore + PreLMN	0.995	16%
Siero 1:50 + calore+ PreLMN	0.637	46%

Tale protocollo non ha dato una significativa variazione della percentuale di spiazzamento, quindi la bollitura non elimina eventuali interazioni molecolari che potrebbero inibire il legame antigene- anticorpo.

CONCLUSIONE

La diagnosi del mesotelioma può essere molto difficile. Un'accurata diagnosi dipende da un adeguato tessuto di analisi per distinguere correttamente l'MPM da altre tipologie di tumori maligni. Tuttavia la variabilità istologica può rendere difficoltosa la diagnosi considerando che i biomarcatori presenti non sono esclusivi.

In conclusione, questa tesi raccoglie una serie di validazioni effettuate con la tecnica immuno-enzimatica tramite ELISA per confermare l'effettivo ruolo di potenziali biomarcatori quali Vimentina, e Desmina. Un obiettivo a breve termine da perseguire sarà quello di effettuare il kit della pre-Lamin A/C messo a punto in questa tesi sui campioni sierici di pazienti in diagnosi e terapia per verificare la variazione di concentrazione della proteina rispetto ai controlli.

Nel complesso, i nostri risultati suggeriscono nuovi potenziali biomarcatori che aggiunti a quelli precedentemente identificati potrebbero determinare un pannello di proteine utili nella diagnosi differenziale di MPM e applicabile in particolare nella medicina del lavoro per l'identificazione precoce della insorgenza della malattia e nella sorveglianza sanitaria dei soggetti esposti per motivi di lavoro all'asbesto

BIBLIOGRAFIA

1. *Anatomia del corpo umano*, Vol.2 a cura di Marco Gesi, Michela Ferrucci, Giulia Ghelarducci Apparato respiratorio, 153-159
2. *Fisiologia- Un approccio integrato*, 3° edizione D.U.Silverthorn, 619-622
3. *AIRC- Associazione Italiana Ricerca sul Cancro*
4. *Malignant Mesothelioma*, Isthiaq A, Salman Ahmed Tipu, Sundas I (Review article)
5. *ONA- Osservatorio Nazionale Amianto*, Dipartimento di ricerca e cura del Mesotelioma, <http://osservatorioamianto.jimdo.com/dipartimento-ricerca-e-cura-del-mesotelioma/>
6. Rusch VW." *A proposed new international TNM staging system for malignant pleural mesothelioma*". From the International Mesothelioma Interest Group. *Chest* 1995;108:1122-28.
7. Pass HI, Kennedy RC, Carbone M. "*Evidence for and implications of SV40 like sequences in human mesotheliomas*". In DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds.
8. Galateau-Salle, Françoise. "*Pathology of Malignant Mesothelioma*". Springer-Verlag London Limited: London. 2006
9. Borasio P, Berruti A, Billè A. "*Malignant pleural mesothelioma: clinicopathologic and survival characteristics in a consecutive series of 394 patients*". *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008;33(2):307-313

10. Huang SXL, Jaurand M-C, Kamp DW, Whysner J, Barchowsky a, Bonner JC. *“Pulmonary endpoints (lung carcinoma and asbestosis) following inhalation exposure to asbestos”*. J.Toxicol. Environ. Health. 2011; 14:179-245
11. Kamp DW, Graceffa P, Pryor WA, Weitzman SA. *“The role of free radicals in asbestos-induced diseases”*. Free Radic. Biol. Med. 1992; 12:293-315.
12. Liu G, Beri R, Mueller A, Kamp DW. *“Molecular mechanism of asbestos-induced lung epithelial cell apoptosis”*. Chem. Biol. Interact. 2010; 188:309-18 [PubMed: 20380827]
13. Weitzman SA, Graceffa P. *“Asbestos catalyzes hydroxyl and superoxide radical generation from hydrogen peroxide”*. Arch. Biochem. Biophys. 1984; 228:373-76
14. Ahmed I, Koulaouzidis A, Iqbal J, Tan WC. *“Malignant peritoneal mesothelioma as a rare case of ascites: a case report”*. J Med Case reports. 2008;2:121
15. Baker PM, Clement PB, Young RH. *“Malignant peritoneal mesothelioma in women: a study of 75 cases with emphasis on their morphologic spectrum and differential diagnosis”*. Am J Clin Pathol. 2005; 123:724-737
16. Hasleton PS. *“Spencer’s pathology of the lung”*; 5th ed. McGraw Hill 1996
17. Mott FE. *“Mesothelioma: a review”*. The Ochsner Journal 2012; 12:70-79
18. Bridda A, Padoan I, Mencarelli L, Frego M. *“Peritoneal mesothelioma: a review”*. Med Gen Med. 2007;9(2):32
19. Mesothelioma International. www.mesotheliomainternational.org
20. Radiologia diagnostic ed interventistica, Università di pisa. www.rad.unipi.it
21. Heffner JE, Klein JS. *“Recent advances in the diagnosis and management of malignant pleural effusions”*. Mayo Clin Proc 2008;83(2):235-250

22. Edwards JC, Abrams KR, Leverment JN. *“Prognostic factors for malignant mesothelioma in 142 patients: validation of CALGB and EORTC prognostic scoring systems”*. Thorax. 2000;55(9):731-735
23. Gordon W Jr, Antman KH, Greenberger JS et al. *“Radiation therapy in the management of patients with mesothelioma”*. Int J Radiat Oncol Biol Phys.1982;8:19-25.
24. Eschwege F, Schlienger M. *“Radiotherapy of malignant pleural mesotheliomas: a propos of 14 cases irradiated at high doses”*. J Radiol Electrol Med Nucl.1973;54:255-59.
25. Sugarbaker DJ, Jaklitsch MT, Soutter AD, et al. *“Multimodality therapy of malignant mesothelioma”*. In: Roth JA, Ruckdeschel JC, Weisenburger TH, eds. Thoracic Oncology. 2nd ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co;1996:538-55.
26. Allen KB, Faber LP, Warren WH. *“Malignant pleural mesothelioma: extrapleural pneumonectomy and pleurectomy”*. Chest Surg Clin North Am.1994;4:113-126.
27. Rosenzweig KE, Fox JL, Zelafsky MJ, et al. *“A pilot trial of high-dose-rate intraoperative radiation therapy for malignant pleural mesothelioma”*. Brachytherapy 2005;4:30-3.
28. Rusch VW, Rosenzweig KE, Vankatraman E, et al. *“A phase II trial of surgical resection and adjuvant high-dose hemithoracic radiation for malignant pleural mesothelioma”*. J Thorac Cardiovasc Surg 2001;122:788-95.
29. Ahamad A, Stevens CW, Smythe WR, et al. *“Promising early control of malignant pleural mesothelioma following post-operative intensity modulated radiotherapy (IMRT) to the chest”*. Cancer J 2003;9:476-84.

30. Chan MF, Chui CS, Song Y, et al. "A novel radiation therapy technique for malignant pleural mesothelioma combining electrons with intensity-modulated photons". *Radiotherapy and Oncology* 2006;79:218-23.
31. Nowak AK, Byrne MJ, Williamson R, et al. "A multicentre phase II study of cisplatin and gemcitabine in malignant mesothelioma." *Br J Cancer* 2002;87:491-6.
32. Scagliotti GV, Shin DM, Kindler HL, et al. Phase II "study of pemetrexed with and without folic acid and vitamin B12 as front-line therapy in malignant pleural mesothelioma". *J Clin Oncol* 2003;21:1556-61.
33. Sugarbaker PH, Yan TD, Stuart OA, Yoo D. "Comprehensive management of diffuse malignant peritoneal mesothelioma". *Eur J Surg Oncol* 2006;32:686-91
34. Garcia-Carbonero R, Paz-Ares L. "Systemic chemotherapy in the management malignant peritoneal mesothelioma". *Eur J Surg Oncol* 2006;32:676-681
35. Robinson BW, Musk AW, Lake RA. "Malignant mesothelioma". *Lancet*. 2005;366:397-408
36. Schlom J. Therapeutic cancer vaccines: "Current status and moving forward". *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(8):599-613
37. Armstrong AC, Eaton D, Ewing JC. "Science, medicine, and the future: Cellular immunotherapy for cancer". *BMJ* 2001;323:1289-93.
38. Goey SH, Eggermont AM, Punt CJ, Slingerland R, Gratama JW, Oosterom R, Oskam R, Bolhuis RL, Stoter G. "Intrapleural administration of interleukin 2 in pleural mesothelioma: a phase I-II study". *Br J Cancer* 1995;72:1283-8.
39. American Cancer Society. "What's New in malignant Mesothelioma Research?". 2012 January 12.

40. Pandey A, Mann M. “*Proteomics to study genes and genomes*”. Nature 2000; 405: 837-846.
41. Choudhary J, Grant SGN. “*Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning*”. Nature Neuroscience 2004; 5 (7): 440-445
42. Graves PR, Haystead TAJ. “*Molecoular biologist’s guide to proteomics*”. Microbiol Mol Biol Rev 2002; 66: 39-46.
43. A. Andrews, Electrophoresis: “*theory, techniques and biochemical and clinical applications*”Oxford University Press, 1986.
44. S. Ong e A. Pandey, “*An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics.*,” *Biomol Eng*, vol. 18, pp. 195-205, 2001.
45. Welch JJ, Hasan B, Passioukov A.” *Biomarkers for malignant pleural mesothelioma: current status*”. Mol Diagn Ther. 2008.
46. Panou I., Vyberg M, Weinreich UM, Meristoudis C, Falkmer UG, Røe OD. “*The established and future biomarkers of malignant pleural mesothelioma.*” Cancer Treat Rev. 2015 Jun;41(6):486-495. di: 10.1016/j.ctrv.2015.05.001. E pub 2015 May 8.
47. Chirieac LR, Pinkus GS, Pinkus JL, Godleski J, Sugarbaker DJ, Corson JM. “*The immunohistochemical characterization of sarcomatoid malignant mesothelioma of the pleura*”. Am J Cancer Res. 2011;1(1):14-24. Epub 2010 Sep 30.
48. Giusti L, Da Valle Y, Bonotti A, Donadio E, Ciregia F, Ventroni T, Foddis R, Giannaccini G, Guglielmi G, Cristaudo A, Lucacchini A. “*Comparative proteomic analysis of malignant pleural mesothelioma evidences an altered expression of nuclear lamin and filament-related proteins*”.Proteomics Clin

Appl. 2014 Apr;8(3-4):258-68. doi: 10.1002/prca.201300052. Epub 2014 Feb 12.

49. Satelli A and Shulin Li. “*Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy*” Cell Mol Life Sci. Author manuscript; available in PMC 2012 Sep 1. Published in final edited form as: Cell Mol Life Sci. 2011 Sep; 68(18): 3033–3046. Published online 2011 Jun 3. doi: 10.1007/s00018-011-0735-1.
50. Hiroshi M, Nozomu Ku, Mana F, Takayuki N, MD, Katsuo U, Motoyasu S, Tsutomu S, Akishi O, Isao M, Makoto O, Yoshihiko A, and Junzo S. “*Comparative Immunohistochemical Analysis of IMP3, GLUT1, EMA, CD146, and Desmin for Distinguishing Malignant Mesothelioma From Reactive Mesothelial Cells*”. Am J Clin Pathol. 2014 Jan;141(1):85-93. doi: 10.1309/AJCP5KNL7QTELLYI.
51. Capetanaki Y, Papathanasiou S, Diokmetzidou A, Vatsellas G, Tsikitis M. “*Desmin related disease: a matter of cell survival failure*” Curr Opin Cell Biol. 2015 Feb;32:113-20. doi: 10.1016/j.ceb.2015.01.004. Epub 2015 Feb 11.
52. ONA- Osservatorio Nazionale Amianto, Dipartimento di ricerca e cura del Mesotelioma.
53. Satelli, A., Li, S. “*Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy*”. Cell. Mol. Life Sci. 2011,68, 3033–3046.
54. Lee, A. Y., Raz, D. J., He, B., Jablons, D. M.. “*Update on the molecular biology of malignant mesothelioma*”. Cancer 2007,109, 1454–1461