

Evidenza di innervazione a livello delle aderenze pleuriche indotte da talcaggio*

Juan F. Montes, PhD; José García-Valero, PhD; Jaume Ferrer, MD

Obiettivo: Condurre uno studio morfologico e strutturale delle aderenze pleuriche dopo pleurodesi chimica con talco.

Metodi: 10 esemplari di conigli maschi sono stati trattati con 200 mg/kg di talco (dimensioni medie \pm ES delle particelle: $8,36 \pm 0,2 \mu\text{m}$) disciolti in una soluzione di 2 ml iniettati attraverso un catetere nel cavo pleurico. Cinque animali sono stati sacrificati ad 1 settimana e cinque ad 1 mese dall'instillazione. All'esame autoptico, dopo l'osservazione macroscopica della cavità pleurica, le aderenze pleuriche sezionate dalle superfici pleuriche in opposizione sono state processate per l'esame istopatologico, immunocitochimico e ultrastrutturale.

Risultati: Dopo 1 settimana, tutte le aderenze erano costituite da bande fibrovascolari rivestite da mesotelio e contenevano vasi sanguigni e linfatici che stabilivano una continuità strutturale tra i foglietti pleurici. Fibre nervose erano presenti nel 20% degli esemplari ed erano costituite da un singolo fascio di 5-20 assoni mielinizzati di vario diametro (da 1 a 6 μm) uniformemente distribuiti nel contesto della sezione del nervo. La localizzazione anatomica dell'aderenza non influiva sulla loro morfologia.

Conclusioni: Ad 1 settimana, le aderenze erano ben sviluppate con aspetti simili ad una pleura rigenerata piuttosto che ad una semplice cicatrice. Per la prima volta è riportata nelle aderenze pleuriche la presenza di fibre nervose potenzialmente capaci di condurre stimoli dolorosi. Sono necessari ulteriori studi per confermare i nostri risultati nelle aderenze pleuriche umane.

(CHEST Edizione Italiana 2006; 4:44-51)

Parole chiave: adesione; innervazione; linfangiogenesi; neovascolarizzazione; pleurodesi; talco; ultrastruttura

Abbreviazioni: PBS = soluzione salina tamponata con fosfati; PECAM-1 = platelet endothelial cell adhesion molecule-1

La pleurodesi chimica rappresenta una valida tecnica terapeutica nel trattamento delle recidive

*Dal Departament de Biologia Cellular (Drs. Montes e García-Valero), Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona; e Servei de Pneumologia (Dr. Ferrer), Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Supportato da grant da parte del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 98/0333) e dal Red Respira (Instituto Carlos III, FIS RTYCC03/11)-SEPAR.

Nessuno degli autori ha conflitto d'interessi da dichiarare.

Manoscritto ricevuto l'11 novembre 2005; revisione accettata il 9 marzo 2006.

La riproduzione di questo articolo è vietata in assenza di autorizzazione scritta dell'American College of Chest Physicians (www.chestjournal.org/misc/reprints.shtml).

Corrispondenza: Juan F. Montes, PhD, Departament de Biologia Cellular, Facultat de Biologia, Avda. Diagonal, 645, 08028 Barcelona, Spain; e-mail: jmontes@ub.edu

(CHEST 2006; 130:702-709)

dello pneumotorace spontaneo e nei versamenti pleurici recidivanti a varia eziologia.^{1,2} L'obiettivo della pleurodesi è ottenere la formazione di sinfisi tra pleura viscerale e parietale per impedire l'accumulo di aria o di liquido nel cavo pleurico. Molti agenti sono stati proposti per la pleurodesi, sebbene molti siano stati testati solo in ambiti sperimentali,^{2,3} ma per la pratica clinica sono due le sostanze più comunemente usate: il talco e la tetraciclina. Dato che quest'ultima non è disponibile nella maggior parte degli ospedali, il talco rappresenta l'agente sclerosante maggiormente impiegato,⁴ per la sua efficacia.

I dati riportati da numerosi studi⁵⁻⁷ mostrano un'alta percentuale di successo in base alla dose somministrata pari a circa il 90%. Anche se non esiste un'unanimità di pareri sulla definizione di successo, per la maggior parte degli autori^{6,8,9} il rilievo radiologico di assenza di accumulo di versamento pleu-

rico rappresenta il target ideale. Tuttavia, sebbene sia ragionevole su base clinica, i meccanismi fisiopatologici che portano alla creazione della pleurodesi non sono ancora completamente chiariti.

Studi clinici pionieristici^{10,11} su cani e gatti hanno dimostrato che, ad 1 mese dalla insufflazione di talco, le cavità pleuriche risultavano completamente obliterate. Bethune¹⁰ ha riportato che in pazienti sottoposti a talcaggio la sinfisi pleurica era completa da 1 a 2 mesi dopo la procedura. Una teoria derivata da studi sperimentali e proposta per spiegare i meccanismi responsabili della pleurodesi è la seguente: le particelle di talco attivano il mesotelio, i macrofagi pleurici e l'endotelio della pleura viscerale e parietale creando un ponte di fibrina tra le due superfici pleuriche. Questo essudato fibrinoso si trasforma in una rete di fibrina grazie ad una serie di fattori della coagulazione e fibrinolitici;¹² successivamente, la stabilizzazione della rete di fibrina e l'aumento dei livelli del fattore di crescita di fibroblasti¹³ porta al reclutamento di fibroblasti e alla deposizione di collagene con formazione di aderenze.¹⁴ Secondo questa teoria, le aderenze rappresentano il primo passaggio che mantiene entrambi gli strati pleurici in contatto conducendo alla formazione della sinfisi pleurica. Infatti, in molti studi sperimentali,¹⁵⁻¹⁷ il numero e l'aspetto osservato macroscopicamente delle aderenze formate determina il grado di successo della procedura. Tuttavia, nonostante la loro importanza clinica, gli aspetti cellulari ed istologici determinanti la formazione delle aderenze sono ancora poco conosciuti. Questo studio sperimentale condotto su animali (conigli) è stato ideato per analizzare le caratteristiche morfologiche ed ultrastrutturali della aderenze pleuriche prodotte dall'instillazione di talco.

MATERIALI E METODI

Studio sperimentale

Dieci esemplari di conigli bianchi, maschi, New Zealand, di peso compreso tra 1,5 e 2 kg sono stati impiegati in questo studio. Attraverso una toracotomia destra a livello del settimo spazio intercostale, come precedentemente descritto,¹⁸ sono stati inseriti nel cavo pleurico 200 mg/kg di talco (massimo diametro media \pm EMS, 8,36 \pm 0,20 μ m; Distalc; Barcellona, Spagna) disciolti in 2 ml di soluzione salina priva di endotossine. La scelta di utilizzare la dose di 200 mg/kg è stata dettata dal fatto che rappresenta la dose minima per indurre una pleurodesi efficace in questo particolare modello animale.¹⁵ Gli animali in studio sono stati suddivisi in due gruppi di 5 esemplari ciascuno che sono stati sacrificati mediante iniezione letale di pentobarbital rispettivamente ad 1 settimana ed ad 1 mese dall'instillazione di talco (talcaggio). All'esame autoptico, sono state resecate 60 aderenze pleuro-parenchimali dalle superfici in opposizione della pleura viscerale e della pleura parietale (incluso la pleura costale,

mediastinica e diaframmatica). Le aderenze sono state resecate con parte degli organi adiacenti ed i preparati istologici sono stati processati per l'esame istopatologico, immunocitochimico e ultrastrutturale. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico sulla Sperimentazione Animale del nostro Istituto.

Analisi istopatologica

Per l'analisi istopatologica, i campioni delle aderenze pleuriche sono stati fissati con paraformaldeide al 4% in 0,1 mol/L di soluzione salina tamponata con fosfati (PBS), trattati con paraffina e tagliati in sezioni dello spessore di 6 μ m. Dopo aver rimosso la cera con xilolo, le sezioni sono state idratate e colorate con ematossilina-eosina. L'esame è stato condotto con microscopio ottico a luce polarizzata.

Immunofluorescenza

I campioni di aderenze pleuriche sono stati fissati in paraformaldeide al 4% in PBS per due ore a temperatura ambiente. Dopo lavaggio con PBS, sono stati infiltrati con sucrosio al 30% a 4 °C, fissati con un composto favorente la sezione (OCT; Miles Laboratories; Naperville, IL), raffreddati rapidamente in ghiaccio secco e conservati a -20°C. Le sezioni al criostato erano tagliate dello spessore di 6 μ m, disciolte in un gel, asciugate all'aria e conservate essiccate a -20°C. In seguito erano incubate in PECAM-1 (platelet endotelial cell adhesion molecule-1) [Dako; Glostrup, Danimarca] tutta la notte a 4°C con una diluizione 1:25. L'anticorpo monoclonale legato era visualizzato mediante incubazione con fluorescina per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo ripetuti lavaggi, le sezioni erano montate (Fluoromount G; Electron Microscopy Science; Washington, PA) e osservate con un microscopio a epifluorescenza (Polyvar 2; Reichert-Jung; Vienna, Austria).

Microscopia elettronica a trasmissione

Ulteriori campioni sono stati fissati con paraformaldeide al 2% e glutaraldeide al 2,5% in PBS per 2 ore a temperatura ambiente. In seguito, i campioni sono stati trattati con tetrossido di osmio all'1% in PBS per 1 ora e, successivamente, sono stati disidratati con acetone e fissati con resina Spurr secondo la tecnica standard. Le sezioni semisottili sono state colorate con blu di metilene e visualizzate con il microscopio ottico (Polyvar 2; Reichert-Jung). Le sezioni ultrasottili sono state colorate con uranile acetato e con citrato di Reynold ed esaminate con microscopio elettronico a trasmissione (H-600 AB; Hitachi; Tokyo, Giappone).

RISULTATI

Tutte le aderenze pleuriche esaminate in questo studio erano costituite da bande fibrovascolari rivestite da mesotelio contenenti vasi linfatici e sanguigni ben sviluppati che stabilivano una continuità strutturale tra i due foglietti pleurici (Figura 1, *in alto*, A). In 2 esemplari su 10 (20%) sono state osservate all'interno delle aderenze fibre nervose mieliniche. Inoltre, il microscopio a luce polarizzata ha rivelato la presenza di corpi estranei granulomatosi di varia grandezza nella maggioranza dei campioni esaminati. La localizzazione anatomica delle aderenze non influiva sulla loro morfologia.

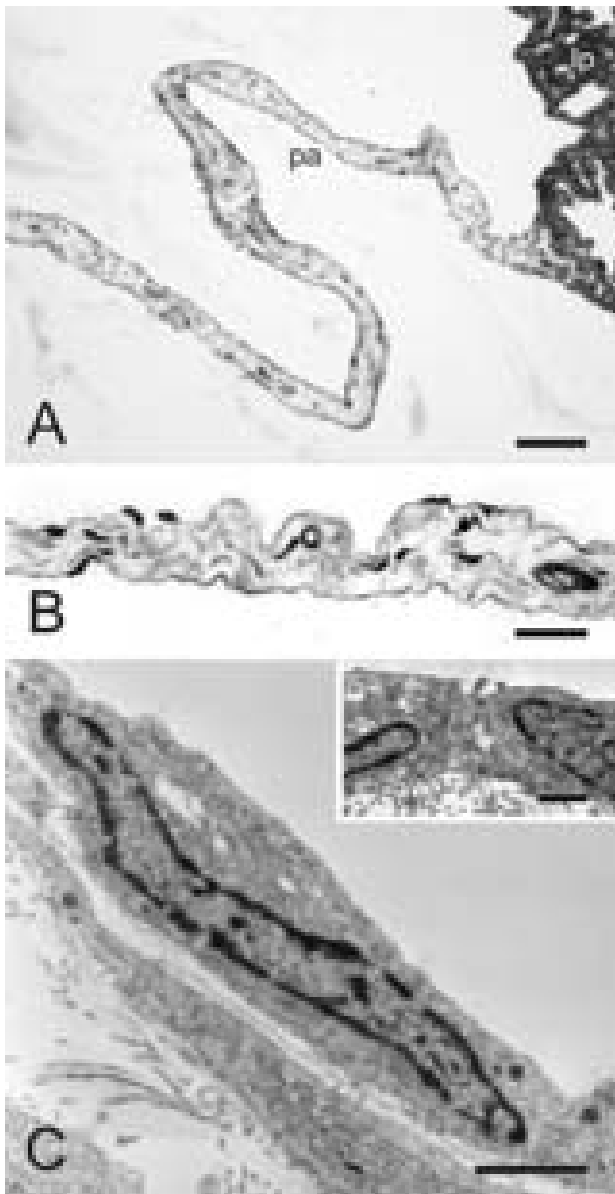


FIGURA 1. *In alto*, A: Sezione trasversale di un'aderenza pleurica (pa) tra la pleura viscerale e quella parietale (non visibile); lp = parenchima polmonare (ematossilina-eosina, barra = 200 μ m). *Al centro*, B: Sezione semisottile di un'aderenza pleurica con completa epitelizzazione e tessuto connettivo denso irregolare (blu di metilene; barra = 20 μ m). *In basso*, C: Visione ultrastrutturale di uno strato mesoteliale indifferenziato giacente su un'aderenza pleurica (barra = 0,5 μ m). L'immagine al microscopio elettronico a trasmissione visibile nel riquadro mostra una giunzione cellulare tra cellule mesoteliali (barra = 0,25 μ m).

Epitelizzazione

Il microscopio ottico ha mostrato che le superfici delle aderenze erano rivestite da uno strato continuo di cellule mesoteliali appiattite (Figura 1, *al centro*, B). Dopo 1 settimana dalla procedura si osservava il completo rivestimento da parte dell'epitelio delle aderenze. Il microscopio elettronico ha rivelato che

lo strato mesoteliale neoformato era composto da cellule indifferenziate senza villi che poggiavano su una sottile lamina basale (Figura 1, *in basso*, C). Le cellule mesoteliali erano infine unite tra di loro mediante tight-junction localizzate nella porzione apicale delle cellule (Figura 1, *in basso*, C, nel riquadro).

Matrice extracellulare e cellularità

Dopo 1 settimana dal talcaggio, i campioni di aderenze osservati al microscopio ottico erano composti da bande di tessuto connettivo irregolare in varie fasi di sviluppo (Figura 2, *in alto*, A). Le fibre di col-

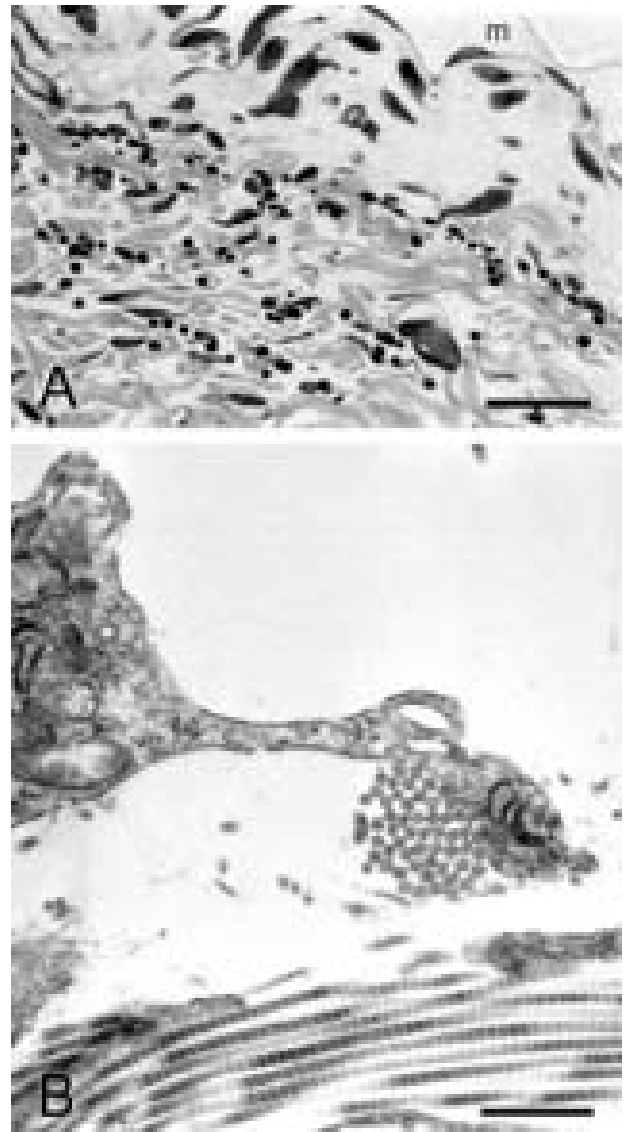


FIGURA 2. Matrice extracellulare. *In alto*, A: Sezioni semisottili di un'aderenza pleurica con tessuto connettivo con collagene irregolare in varie fasi di sviluppo. Dopo 1 settimana, solo la regione sottostante il mesotelio (m) ha un aspetto disperso e contiene numerosi fibroblasti dilatati (blu di metilene; barra = 200 μ m). *In basso*, B: Visione ultrastrutturale dei processi dei fibroblasti che formano la matrice collagene (barra = 0,5 μ m).

lagene erano disposte in filamenti ed erano spesso allineate parallelamente all'asse longitudinale delle aderenze. Le fibre più spesse si trovavano agli angoli delle aderenze. A seconda dello stadio di sviluppo, erano presenti numerosi fibroblasti tra le fibre collagene ed un numero variabile di macrofagi, linfociti e mastociti (Figura 2, *in alto*, A). I fibroblasti si presentavano dilatati con un citoplasma fortemente pigmentato, una lassa cromatina e lunghi processi citoplasmatici. Dopo 1 mese, il contenuto cellulare delle aderenze diventava più rado e includeva fibroblasti allungati che si trovavano tra spesse bande di fibre collagene (Figura 1, *al centro*, B). Al microscopio elettronico, le fibre collagene erano costituite da numerose fibrille compatte di diametro uniforme (80 nm) che mostravano un caratteristico pattern di bandeggio striato trasversalmente con periodo di 50 nm (Figura 2, *in basso*, B), tipico del collagene di tipo I. I lunghi processi citoplasmatici erano spesso visualizzati nelle vicinanze delle fibrille di collagene (Figura 2, *in basso*, B).

Neovascolarizzazione

Come descritto precedentemente, le aderenze erano ben vascolarizzate e contenevano all'interno sia vasi sanguigni che linfatici (Figura 3, *in alto*, A, e *al centro*, B). L'angiogenesi e la linfoangiogenesi erano degli eventi precoci che avvenivano dopo 1 settimana dalla procedura. Mediante l'immunolocalizzazione del marker endoteliale PECAM-1, si è notato che l'angiogenesi avveniva in entrambe le basi delle aderenze (Figura 3, *in basso*, C). Inoltre, una angiogenesi non a partenza dalle basi era osservata con la formazione di nuovi capillari all'interno delle aderenze. La linfoangiogenesi inizia contemporaneamente all'angiogenesi (Figura 3, *al centro*, B).

I nuovi vasi formati, ossia arteriole, capillari e vene, sono uniformemente distribuiti nelle aderenze, sia nella pleura parietale che in quella viscerale. I vasi di maggiore diametro sono presenti di solito ai margini dei campioni. I vasi neoformati presentano una struttura morfologica e istologica normale e, per esempio, tutte le arteriole esaminate mostrano già ad 1 settimana dalla procedura strati (tonaca intima, media e avventizia) ben sviluppati (Figura 3, *in alto*, A).

Innervazione

L'esame delle sezioni semisottili fissate con resina ha chiaramente dimostrato la presenza di fibre nervose mieliniche nel 20% degli esemplari (2 animali su 10). I nervi erano già presenti dopo 1 settimana dalla procedura, e non si sono osservate differenze nella percentuale di aderenze contenenti fibre nervose tra tempi sperimentali. In entrambi gli animali, la percentuale di aderenze contenenti fibre nervose

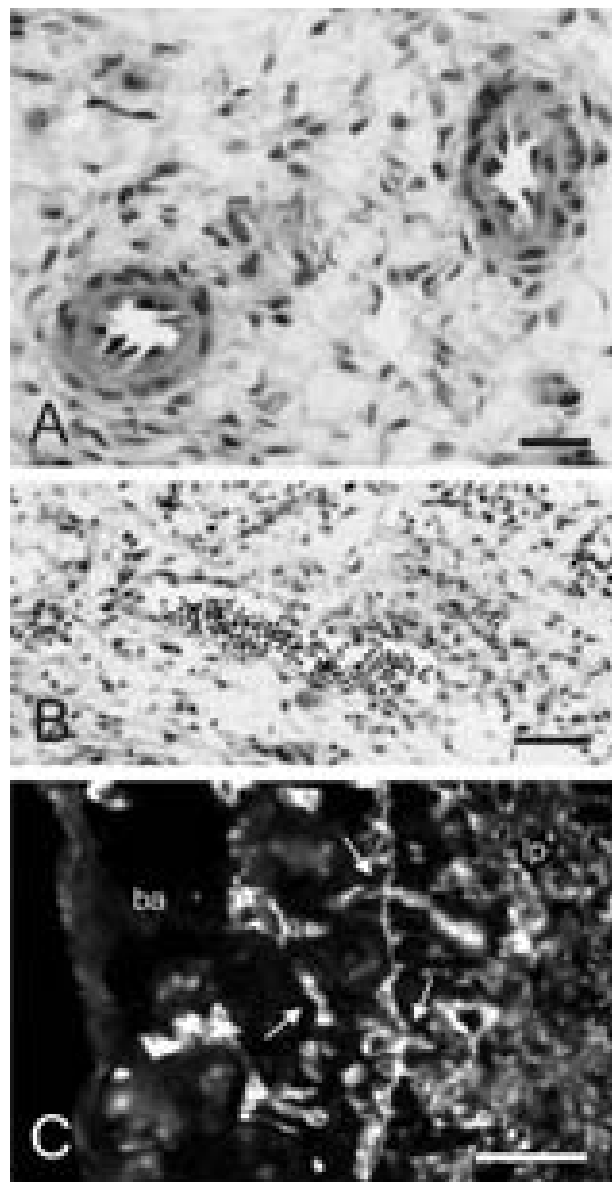


FIGURA 3. Neovascolarizzazione. *In alto*, A e *al centro*, B: Maturazione dell'aderenza pleurica contemporanea al rapido sviluppo della rete vascolare, che include arteriole (*in alto*, A) [ematossilina-eosina; barra = 25 μ m] e vasi linfatici (*al centro*, B) [ematossilina-eosina; barra = 50 μ m]. *In basso*, C: Immunolocalizzazione del marker endoteliale PECAM-1 mediante immunofluorescenza indiretta che rivela l'origine parenchimale dei vasi neoformati (freccie) che vascolarizzano l'aderenza pleurica (ba = base dell'aderenza; lp = parenchima polmonare; barra = 50 μ m).

era del 67%. Inoltre, la localizzazione della formazione delle aderenze non influiva sulla presenza o meno delle fibre nervose, dato che si osservavano fibre nervose nelle aderenze che univano la pleura viscerale con la pleura parietale costale, diaframmatica o mediastinica.

In tutti i campioni osservati, i nervi erano costituiti da un singolo fascio contenente da 5 a 20 sottili assoni mielinizzati di vario diametro (da 1 a 6 μ m) uni-

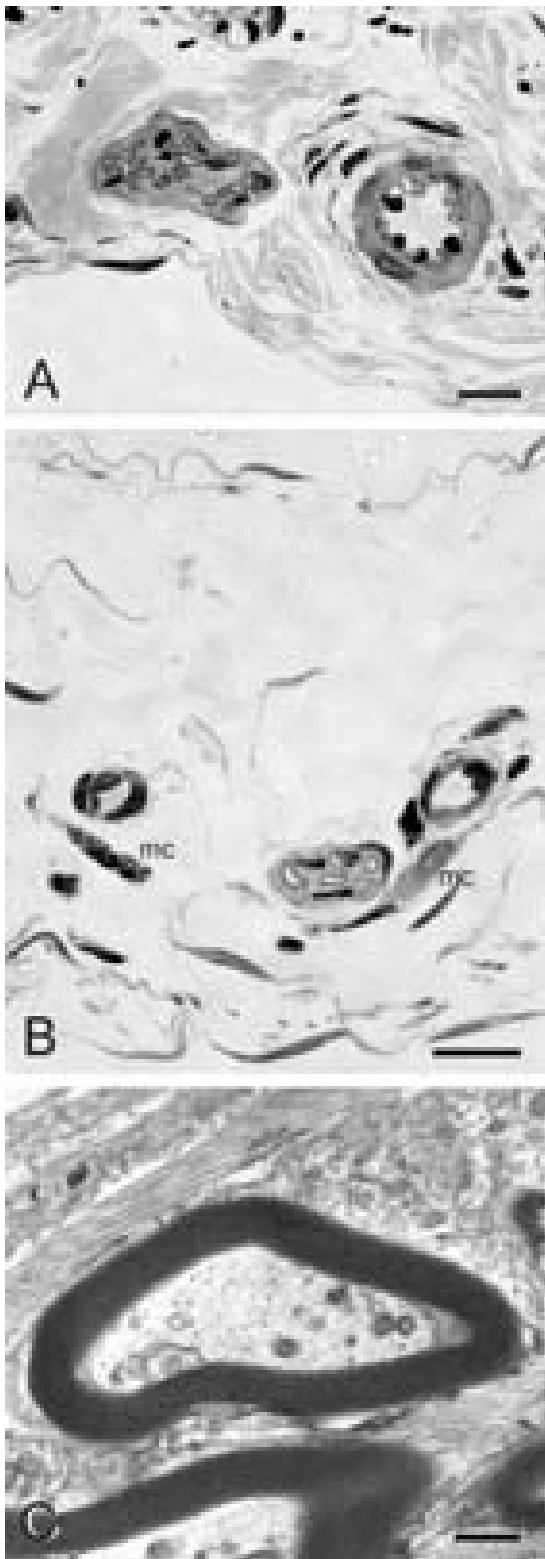


FIGURA 4. Innervazione. *In alto, A e al centro, B*: L'innervazione dell'aderenza pleurica risulta dalla crescita di nervi contenenti un numero variabile di assoni mielinizzati (blu di metilene; barre = 10 μ m). Notare l'associazione dei nervi con le arteriole (*in alto, A e al centro, B*) e i mastociti (mc) [*al centro, B*]. *In basso, C*: Visione ultrastrutturale della sezione prossimale di un nervo neoformato con una struttura quasi matura ed un epinevrio ed un endonevrio ben organizzati (barra = 0,5 μ m).

formemente distribuiti nella sezione del nervo (Figura 4, *in alto, A, e al centro, B*). Inoltre, erano sempre associati lungo l'asse longitudinale delle aderenze a vasi sanguigni, principalmente arteriole (Figura 4, *in alto, A, e al centro, B*) e frequentemente in stretto contatto con mastociti (Figura 4, *al centro, B*). Valutazioni morfometriche dei nervi hanno mostrato che sia il diametro dei nervi che il numero degli assoni variavano lungo la lunghezza del nervo e che i valori maggiori di entrambi i parametri erano notati in corrispondenza della pleura parietale dell'aderenza rispetto a quella viscerale. All'esame ultrastrutturale, le fibre nervose erano costituite da assoni mielinizzati con cellule di Schwann ed epinevrio (Figura 4, *in basso, C*).

DISCUSSIONE

Classicamente, le aderenze pleuriche sono state considerate come strutture costituite da collagene tra la pleura parietale e quella viscerale. Si ritiene che si formino nella cavità pleurica a causa di un'infezione secondaria a vari stimoli come infezioni, neoplasie o traumi.^{19,20} Sebbene si ritenga comunemente che giochino un ruolo critico nella formazione della sinfisi pleurica,¹⁴ poco si conosce sulla loro istopatogenesi. Questo studio ha lo scopo di fornire nuove indicazioni sulla morfologia ultrastrutturale delle aderenze pleuriche indotte dal talco in conigli.

Anche se abbiamo precedentemente descritto che la pleurodesi eseguita con un'alta dose di talco aumenta il rischio di deposizione a livello polmonare di talco nei conigli,²¹ la dose impiegata in questo studio (200 mg/kg) rappresenta la dose minima per ottenere una pleurodesi efficace in questo modello animale.¹⁵ Già dopo 1 settimana dalla procedura, le aderenze erano completamente formate con fibre collagene, vasi sanguigni e linfatici neoformati e completa epitelizzazione. Per la prima volta si è dimostrato la presenza di fibre mielinizzate nelle aderenze nel 20% dei casi.

Uno dei risultati principali del presente studio è stata l'osservazione che le fibre nervose, identificate istologicamente ed ultrastrutturalmente, si sviluppano nelle aderenze pleuriche di coniglio formate dopo la somministrazione intrapleurica di talco. Anche se le fibre nervose sono state osservate in aderenze peritoneali in modelli murini²² e umani,²³⁻²⁶ a nostra conoscenza, il nostro rappresenta il primo studio che riporta la formazione di nervi in aderenze pleuriche. I nostri risultati mostrano inoltre che la presenza di fibre nervose non dipende dalla localizzazione delle aderenze nella cavità pleurica, dato che si sono osservate fibre nervose nelle aderenze che

univano la pleura viscerale con la pleura parietale costale, diaframmatica o mediastinica.

Dopo la pleurodesi con talco, abbiamo osservato che la percentuale di animali con aderenze pleuriche innervate era del 20%. Non abbiamo trovato nessun dato in precedenti studi che potesse essere comparato con i nostri risultati; tuttavia, in studi clinici²³⁻²⁶ sono state riscontrate aderenze peritoneali contenenti fibre nervose nel 38%-100% dei pazienti. La differenza di percentuali di innervazione tra il nostro studio e quelli clinici può essere attribuita a differenti fattori, comprendenti variazioni biologiche e fisiologiche tra conigli ed esseri umani e differenze anatomiche tra cavità pleurica e peritoneale. È stato dimostrato che la presenza di fibre nervose nelle aderenze peritoneali dipende dalla malattia sottostante²⁵ e quindi è più frequente in caso di neoplasia rispetto ad altre malattie infiammatorie e non.²⁵

In tutte le aderenze esaminate nel presente studio, le fibre nervose risultano originare dalla pleura parietale che è principalmente innervata dai nervi intercostali (pleura costale e porzione periferica della pleura diaframmatica) e dai nervi frenici (porzione centrale della pleura diaframmatica e della pleura mediastinica).²⁷ Un recente studio elettrofisiologico e farmacologico²⁸ ha mostrato che le fibre afferenti alla pleura parietale sono mielinizzate A δ e amieliniche di tipo C. A questo riguardo, le caratteristiche morfologiche ed ultrastrutturali delle fibre nervose descritte in questo studio, comprendenti il grado di mielinizzazione (basso) e il diametro dell'assone (da 1 a 6 μ m), sono comparabili con quelle delle fibre A δ .²⁹ Anche se non si conosce l'effetto dell'innervazione delle aderenze pleuriche è interessante notare che le fibre A δ sono conduttrici dello stimolo doloroso.²⁹

La possibile implicazione clinica è sconosciuta. Anche negli studi sopra menzionati^{23,24,26} sull'innervazione delle aderenze peritoneali umane la relazione tra l'innervazione ed il dolore riportato dai pazienti risultava poco chiara. La questione importante è capire se la presenza di fibre nervose nelle aderenze pleuriche possa essere responsabile del dolore cronico. Anche se non è stato possibile in questo studio arrivare ad un dato conclusivo, nella nostra esperienza nei pazienti con tubercolosi o empiema che formano aderenze il dolore appare evolutivo. In caso di pleurodesi, il dolore rappresenta un evento avverso a breve termine frequente dopo la pleurodesi con parecchi agenti,^{4,5,8} probabilmente dovuto all'infiammazione creata nello spazio pleurico, mentre il dolore cronico è raramente riportato. È stato descritto fino al 31% dei pazienti sottoposti a trattamento videotoracoscopico con abrasione pleurica per pneumotorace spontaneo primario o

secondario,^{30,31} sebbene in questi casi sia difficile sapere se il dolore fosse dovuto alla pleurodesi stessa o alla chirurgia. Riguardo la pleurodesi con talco, a nostra conoscenza, solo due casi di dolori cronico pleuritico sono stati riportati^{32,33} e, tuttavia, probabilmente si tratta di un dato sottostimato, dato che pochi studi hanno valutato l'esito a lungo termine di questi pazienti e che il dolore cronico non è mai stato valutato prospetticamente.

Per quanto riguarda la neovascolarizzazione dopo pleurodesi, i nostri risultati mostrano che sembra simile a quella riscontrata in corso di infiammazione e neoplasia.³⁴ Infatti, la neoangiogenesi era presente già dopo 1 settimana dalla procedura con formazione di arteriole, capillari, venule e vasi linfatici. Questi dati confermano quelli riportati in precedenti studi sia clinici che sperimentali sulle aderenze sia pleuriche che peritoneali, dato che la neoformazione di vasi sanguigni è stata rilevata in aderenze pleuriche umane³⁵ e animali,^{36,37} come pure in aderenze peritoneali umane^{25,26} e animali.^{22,38,39} In ogni caso, il ruolo fondamentale della neoangiogenesi nella formazione delle aderenze era stato già dimostrato da Guo e coll.,⁴⁰ che, inibendo l'angiogenesi mediante un anticorpo anti-fattore di crescita vascolare endoteliale, riduceva sensibilmente l'efficacia della pleurodesi nei conigli.

Dal punto di vista istopatologico, tutte le strutture vascolari neoformate osservate nel presente studio presentavano un normale pattern istologico, senza le anomalie morfologiche, come l'ispessimento della tonaca media e avventizia, precedentemente descritto dagli studi sulle aderenze peritoneali.^{25,36} Tuttavia, a nostra conoscenza, questo è il primo studio che dimostra la presenza di vasi linfatici a livello della lamina elastica nella pleura viscerale dopo pleurodesi con talco. Anche se il ruolo della linfoangiogenesi nella formazione di aderenze non è chiaro, è stato sottolineato come la linfoangiogenesi nella pleura viscerale a livello della lamina elastica possa contribuire al drenaggio pleurico in corso di patologia o influire sul reclutamento di cellule proinfiammatorie nei tessuti infiammati.³⁷ È inoltre interessante notare come la maggior parte delle arteriole osservate nel presente studio fossero a stretto contatto con le fibre nervose, come descritto negli studi umani²⁶ e murini²² sulle aderenze peritoneali. Si è pensato che questa associazione sia una conseguenza del ruolo di controllo giocato dalla neoangiogenesi nello sviluppo delle fibre nervose durante la formazione delle aderenze.²⁶

Globalmente, i nostri dati mostrano che i fenomeni successivi alla pleurodesi assomigliano più ad una rigenerazione tissutale che ad un processo di riparazione. Infatti, la riparazione dell'interruzione della continuità tissutale pleurica dopo pleurodesi

non si basa sulla formazione di un tipico tessuto di granulazione, dato che il processo di riparazione è deficitario nella densa rete dei vasi allargati.^{41,42} Inoltre, l'iniziale proliferazione di fibroblasti, con costituzione di ponti di fibrina, termina nella formazione di una struttura organizzata con sviluppo di vascolarizzazione e fibre nervose che assomiglia al tessuto connettivo della pleura non danneggiata. Quindi, a livello dell'aderenza sulla pleura non si forma una cicatrice prodotta come conseguenza del processo di riparazione, ma si ristabilisce una continuità funzionale tra pleura viscerale e parietale.

In conclusione, questo studio dimostra che già dopo 1 settimana dopo la pleurodesi, le aderenze pleuriche indotte dal calcaggio sono costituite da bande fibrovascolari contenenti vasi sanguigni e linfatici ben sviluppati che assomigliano più a tessuto pleurico neofornato che ad una semplice cicatrice. Inoltre, in questo studio per la prima volta si è osservata la presenza di fibre nervose nelle aderenze pleuriche potenzialmente capaci di condurre stimoli dolorosi. Ulteriori studi sono comunque necessari per confermare i nostri risultati nelle aderenze pleuriche umane.

RINGRAZIAMENTI: Gli autori ringraziano Almudena García e lo staff del Serveis Científico-Tècnics (Universitat de Barcelona) per l'assistenza tecnica, e Christine O'Hara per la consulenza linguistica.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Light RW, Vargas FS. Pleural sclerosis for the treatment of pneumothorax and pleural effusion. *Lung* 1997; 175:213–223
- 2 Rodríguez-Panadero F, Antony VB. Pleurodesis: state of the art. *Eur Respir J* 1997; 10:1648–1654
- 3 Dikensoy O, Light RW. Alternative widely available, inexpensive agents for pleurodesis. *Curr Opin Pulm Med* 2005; 11:340–344
- 4 Lee YCG, Baumann MH, Maskell NA, et al. Pleurodesis practice for malignant pleural effusions in five English-speaking countries: survey of pulmonologists. *Chest* 2003; 124:2229–2238
- 5 Kennedy L, Sahn SA. Talc pleurodesis for the treatment of pneumothorax and pleural effusion. *Chest* 1994; 106:1215–1222
- 6 Walker-Renard PB, Vaughan LM, Sahn SA. Chemical pleurodesis for malignant pleural effusions. *Ann Intern Med* 1994; 120:56–64
- 7 Antony VB, Loddenkemper R, Astoul P, et al. Management of malignant pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1987–2001
- 8 Aelony Y, King RR, Boutin C. Thoracoscopic talc poudrage in malignant pleural effusions: effective pleurodesis despite low pleural pH. *Chest* 1998; 113:1007–1012
- 9 Milanez JR, Vargas FS, Werebe EC, et al. Thoracoscopy talc poudrage: a 15-year experience. *Chest* 2001; 119:801–806
- 10 Bethune N. Pleural poudrage: a new technique for the deliberate production of pleural adhesions as a preliminary to lobectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1935; 4:251–261

- 11 Frankel A, Krasna I, Baronofsky ID. An experimental study of pleural symphysis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1961; 42:43–51
- 12 Rodríguez-Panadero F, Segado A, Martín Juan J. Failure of talc pleurodesis is associated with increased pleural fibrinolysis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:785–790
- 13 Antony VB, Nasreen N, Mohammed KA, et al. Talc pleurodesis: basic fibroblast growth factor mediates pleural fibrosis. *Chest* 2004; 126:1522–1528
- 14 Ferrer J, García-Valero J, Montes JF. Pleural reaction to mineral dust. In: Light RW, Lee YCG, eds. *Textbook of pleural diseases*. London, UK: Arnold, 2003; 109–119
- 15 Light RW, Wang NS, Sassoon CS, et al. Talc slurry is an effective pleural sclerosant in rabbits. *Chest* 1995; 107:1702–1706
- 16 Colt HG, Russack V, Chiu Y, et al. A comparison of thoracoscopic talc insufflation, slurry, and mechanical abrasion pleurodesis. *Chest* 1997; 111:442–448
- 17 Mitchem RE, Herndon BL, Fiorella RM, et al. Pleurodesis by autologous blood, doxycycline, and talc in a rabbit model. *Ann Thorac Surg* 1999; 67:917–921
- 18 Ferrer J, Montes JF, Villarino MA, et al. Influence of particle size on extrapleural talc dissemination after talc slurry pleurodesis. *Chest* 2002; 122:1018–1027
- 19 Mason AC, Miller BH, Krasna MJ, et al. Accuracy of CT for the detection of pleural adhesions: correlation with video-assisted thoracoscopic surgery. *Chest* 1999; 115:423–427
- 20 Sasaki M, Kawabe M, Hirai S, et al. Preoperative detection of pleural adhesions by chest ultrasonography. *Ann Thorac Surg* 2005; 80:439–442
- 21 Montes JF, Ferrer J, Villarino MA, et al. Influence of talc dose on extrapleural talc dissemination after talc pleurodesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:348–355
- 22 Sulaiman H, Gabella G, Davis C, et al. Growth of nerve fibres into murine peritoneal adhesions. *J Pathol* 2000; 192:396–403
- 23 Kligman I, Drachenberg C, Papadimitriou J, et al. Immunohistochemical demonstration of nerve fibers in pelvic adhesions. *Obstet Gynecol* 1993; 82:566–568
- 24 Tulandi T, Chen MF, Al-Took S, et al. A study of nerve fibers and histopathology of postsurgical, postinfectious, and endometriosis-related adhesions. *Obstet Gynecol* 1998; 92:766–768
- 25 Herrick SE, Mutsaers SE, Ozua P, et al. Human peritoneal adhesions are highly cellular, innervated, and vascularized. *J Pathol* 2000; 192:67–72
- 26 Sulaiman H, Gabella G, Davis C, et al. Presence and distribution of sensory nerve fibers in human peritoneal adhesions. *Ann Surg* 2001; 234:256–261
- 27 Peng MJ, Wang NS. Embryology and gross structure. In: Light RW, Lee YCG, eds. *Textbook of pleural diseases*. London, UK: Arnold, 2003; 3–16
- 28 Jammes Y, Trousse D, Delpierre S. Identification and properties of parietal pleural afferents in rabbits. *J Physiol* 2005; 567:641–650
- 29 Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 2004; 1000:40–56
- 30 Passlick B, Born C, Siemel W, et al. Incidence of chronic pain after minimal-invasive surgery for spontaneous pneumothorax. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001; 19:355–359
- 31 Lang-Lazdunski L, Chapuis O, Bonnet PM, et al. Videothoracoscopic bleb excision and pleural abrasion for the treatment of primary spontaneous pneumothorax: long-term results. *Ann Thorac Surg* 2003; 75:960–965
- 32 Milton R, Cale ARJ. Chronic pain due to talc pleurodesis for spontaneous pneumothorax. *Ann Thorac Surg* 2003; 76:1740–1741

- 33 Reddy RV, Mahdi H, Watson N, et al. A 29-year-old male with malaise, chest pain and night sweats. *Eur Respir J* 2005; 25:938–941
- 34 Kilariski W. Mechanisms of tissue vascularization: digital comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Medicine 14. Uppsala, Sweden: Acta Universitatis Upsaliensis, 2005
- 35 Riehl G, Chaffanjon P, Frey G, et al. Postoperative systemic artery to pulmonary vessel fistula: analysis of three cases. *Ann Thorac Surg* 2003; 76:1873–1877
- 36 Pfeffer A. The pathology and pathogenesis of pleural adhesions in sheep. *N Z Vet J* 1986; 34:85–93
- 37 Strange C, Tomlinson JR, Wilson C, et al. The histology of experimental pleural injury with tetracycline, empyema, and carrageenan. *Exp Mol Pathol* 1989; 51:205–219
- 38 Myllärniemi H, Karppinen V. Vascular pattern of peritoneal adhesions. *Br J Surg* 1968; 55:605–608
- 39 Roy S, Clark CJ, Mohebali K, et al. Reactive oxygen species and EGR-1 gene expression in surgical postoperative peritoneal adhesions. *World J Surg* 2004; 28:316–320
- 40 Guo YB, Kalomenidis I, Hawthorne M, et al. Pleurodesis is inhibited by anti-vascular endothelial growth factor antibody. *Chest* 2005; 128:1790–1797
- 41 Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83:835–870
- 42 Jimenez PA, Jimenez SE. Tissue and cellular approaches to wound repair. *Am J Surg* 2004; 187:56S–64S