

CORRELACION ENTRE EXPRESION DE ANTIGENOS HLA Y PARAMETROS CLINICO-PATOLOGICOS EN EL CARCINOMA BRONCOGENICO

Redondo M.*, Sánchez-Palencia A., Guijarro R., Cucto A., Esquivias J.**, Concha A., Ruiz-Cabello F., Garrido F.*
Servicios de Cirugía Torácica, Análisis Clínicos e Inmunología* y Anatomía Patológica**. Hospital «Virgen de las Nieves».
Granada.

Se ha estudiado la expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase I y II en 41 carcinomas broncogénicos, así como en tejido pulmonar normal distante al tumor. Observándose que en todos los casos el tejido pulmonar normal expresaba antígenos HLA de clase I, mientras que esta expresión se perdía totalmente en un 32 % de los tumores. La pérdida de estos antígenos HLA de clase I se correlaciono con una mayor agresividad tumoral, así estas pérdidas se encontraron con más frecuencia en los tumores aneuploides, en los tipos histológicos de adenocarcinoma y carcinoma de células pequeñas y en tumores pobremente diferenciados.

En cuanto a la expresión de antígenos de clase II también se encontró sobre células normales, aunque esta fue variable en intensidad, pero solo se pudo apreciar en 6 de los tumores estudiados correspondiendo todos ellos a tumores bien diferenciados.

CORRELATION BETWEEN EXPRESSION OF HLA ANTIGENS AND CLINICAL AND PATHOLOGICAL PARAMETERS IN BRONCHOGENIC CARCINOMA.

We have studied expression of HLA class I and II antigens in 41 patients with bronchogenic carcinoma, both in tumor tissue and in lung normal tissue situated far from the tumor itself. Normal tissue expressed class I HLA antigens in every case, whereas this expression lacked in 32% of tumor tissue samples. This lacking correlated with a higher tumor aggressivity, higher frequency of aneuploidy, small-cell and adenocarcinoma types, and poorly differentiated carcinomas as well.

Regarding class II expression, it was found in normal tissue -although with variable intensity - and was found in only six of the 41 patients studied. All them had well-differentiated tumors.

INTRODUCCION

Los antígenos HLA de clase I (ABC) están ampliamente distribuidos en las células corporales^(1,2) y están implicados en procesos de reconocimiento por los linfocitos T citotóxicos⁽³⁾. Los antígenos de clase II están más limitados en su distribución celular^(1,4) y actúan como elementos restrictivos de las células T helper⁽⁵⁾.

Estos antígenos están controlados por un grupo de genes localizados en el cromosoma 6. Los antígenos de clase I son glicoproteínas de la superficie celular compuestas de una cadena pesada altamente polimórfica (PM 45000) asociada de una forma no-covalente a la β_2 -microglobulina⁽⁶⁾. Los antígenos de clase II están compuestos de dos cadenas glicosiladas (PM 32000 y 29000 respectivamente)⁽⁷⁾ y están predominantemente expresadas por células implicadas en fenómenos inmunológicos (células B, células presentadoras de antígenos y linfocitos T activados)⁽⁸⁾.

Es evidente que la respuesta inmune contra células modificadas, células infectadas por virus o células tumorales no está únicamente influenciada por la naturaleza del antígeno específico, sino también por la cantidad y cualidad de las moléculas de clase I presentes en la superficie de la célula tumoral^(9,10).

Existen evidencias que sugieren que la expresión de antígenos HLA de clase I está alterada en tumores humanos⁽¹¹⁾. Dos tipos de alteraciones han sido descritas: a) Pérdida de antígenos de clase I^(12,13) y b) Expresión de moléculas aberrantes de clase I^(14,15,16). Varios trabajos indican que estas alteraciones pueden jugar un papel crucial en la diseminación tumoral y producción de metástasis⁽¹⁷⁾.

En este trabajo se analiza la expresión de antígenos HLA de clase I y II en 41 carcinomas broncogénicos. Las alteraciones fenotípicas han sido analizadas en el contexto de otros parámetros clínico-patológicos.

MATERIAL Y METODOS

Muestras de tejido

Los tejidos se obtuvieron de pacientes al cuidado del servicio de cirugía torácica del Hospital Virgen de las Nieves, los cuales no habían recibido radioterapia o quimioterapia antes de la cirugía. Se estudiaron un total de 41 carcinomas de pulmón.

El tejido fresco tumoral y normal se tomó de especímenes quirúrgicos inmediatamente después de su retirada. Las muestras se congelaron en isopentano sumergido en nitrógeno líquido. Secciones criostáticas de 5-7 micras de espesor se cortaron y secaron a temperatura ambiente durante 14-18 horas, se fijaron 10 minutos en acetona y se almacenaron a -40° C hasta su posterior uso.

El diagnóstico se confirmó por examen de las muestras de parafina. Los tumores se clasificaron según su tipo histológico, grado de diferenciación, estadio tumoral, y presencia o no de picos aneuploides.

Anticuerpos monoclonales

Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales: W6/32, contra un determinante estructural formado por las dos cadenas de los antígenos HLA de clase III. Joan I (J. Vives) y α -HLA-B⁽¹⁹⁾ anti-locus B; α -HLA-A, anti-locus A⁽¹⁷⁾, GRH1, anti β 2-Microglobulina, producido en nuestro laboratorio⁽²⁰⁾; anti-HC10, específico de cadena pesada⁽²¹⁾ y GRT2, el cual reacciona con el antígeno común leucocitario (CD45), que mide la infiltración leucocitaria tumoral⁽²²⁾. También se usaron los siguientes monoclonales anti clase II: GRB1, contra HLA-DR producido en nuestro laboratorio⁽²³⁾, B7/21 contra HLA-DP⁽²⁴⁾ y TU22 contra HLA-DQ⁽²⁵⁾.

Técnica de inmunofosfatasa alcalina

Las secciones de tejido se incubaron con el primer anticuerpo en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se lavaron con TBS (solución tamponada de tris) y se incubaron durante 30 minutos a una hora con inmunoglobulina de conejo antiratón a una dilución de 1:20 (DAKO), se volvieron a lavar con TBS y se reincubaron durante el mismo tiempo con el complejo APAAP (complejo soluble de inmunoglobulina de ratón antifosfatasa alcalina y fosfatasa alcalina) a una dilución de 1: 50 (DAKO). Después de lavar con TBS, los sitios de unión se pusieron de manifiesto con solución fresca de Naftol ASMX fosfatasa, dimetilformanida, Tris buffer, FAST RED y levamisol para inactivar la fosfatasa alcalina endógena. El lavado final con agua fue seguido de contraincubación con hematoxilina. Como control positivo se usó al monoclonal GRT2 que reconoce el antígeno CD45. Como control negativo en cada experimento el anticuerpo primario se reemplazó en una sección por TBS.

RESULTADOS

I. Expresión de antígenos HLA de clase I y II en neumocitos y células bronquiales: Se estudió la expresión de estos antígenos sobre células pulmonares procedentes del mismo pulmón que el tumor pero distantes a el, y consideradas como normales por el anatomopatologo. Se observó expresión de antígenos HLA-ABC en todos los casos, así como expresión de antígenos DR, DP y DQ, aunque dicha expresión de antígenos HLA de clase II es variable en cuanto a su intensidad dependiendo del grado de hiperplasia o metaplasia celular.

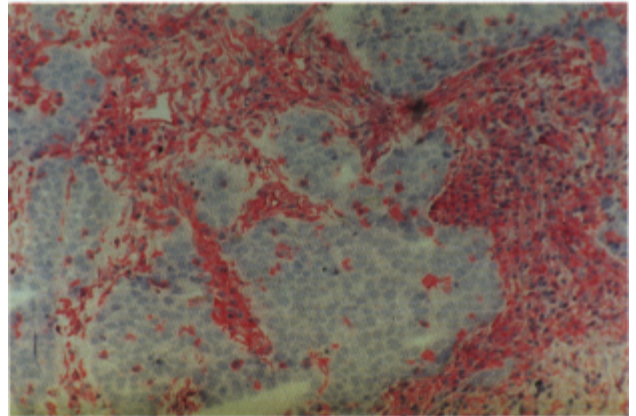


Fig. 1: Carcinoma de pulmón HLA clase I(-). AcMo w6/32: anti-ABC/ β_2 -microglobulina. Infiltrado tumoral positivo. Técnica de Fosfatasa Alcalina

TABLA 1
EXPRESION DE ANTIGENOS HLA DE CLASE I EN CARCINOMAS DE PULMON

	ABC (GRH1, W6/32, HC-10)*	Locus A (α -HLA-A)	Locus B (α -HLA-B, Joan 1)
Tumores HLA (+)	28/41 (68 %)	27/41	25/41
Tumores HLA (-)	13/41 (32 %)	14/41	10/41
Pérdidas Selectivas		1	3

* Anticuerpos monoclonales utilizados

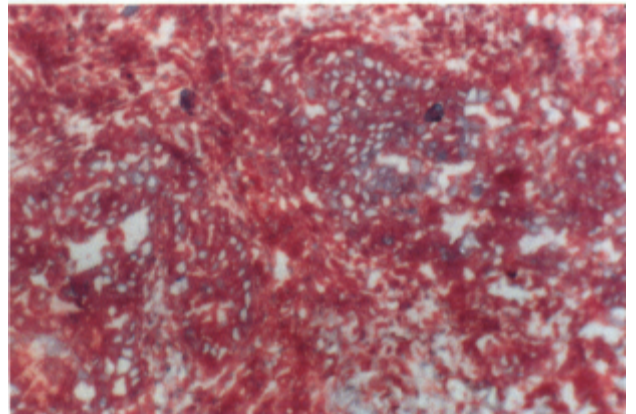


Fig. 2: Carcinoma de pulmón HLA clase I(+). AcMo GRH1: anti- β_2 -microglobulina. Infiltrado tumoral positivo. Técnica de Fosfatasa Alcalina

II. Expresión de antígenos HLA de clase I y II en carcinomas broncogénicos: Se han estudiado un total de 41 tumores, observándose pérdida total de expresión de

TABLA 2
EXPRESION DE ANTIGENOS HLA DE CLASE II EN CARCINOMAS DE PULMON

	DR (GRH1)*	DP (B-7/21)	DQ (Tu 22)
Tumores HLA (+)	5/41 (12 %)	5/41	3/41
Tumores HLA (-)	36/41 (88 %)	36/41	38/41

* Anticuerpos monoclonales utilizados

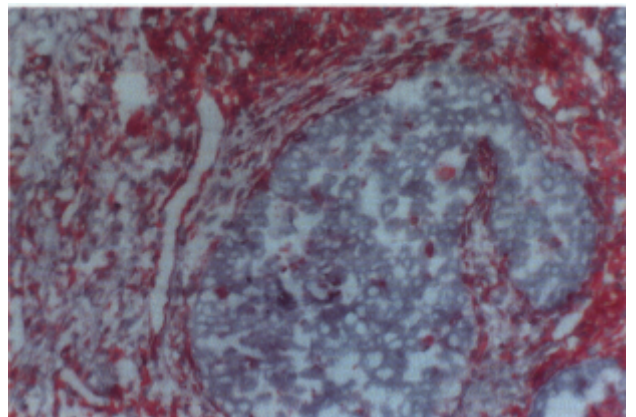


Fig. 3: Carcinoma de pulmón locus A(-). AcMo: α -HLA-A: Anti-locus A. Técnica de Fosfatasa Alcalina

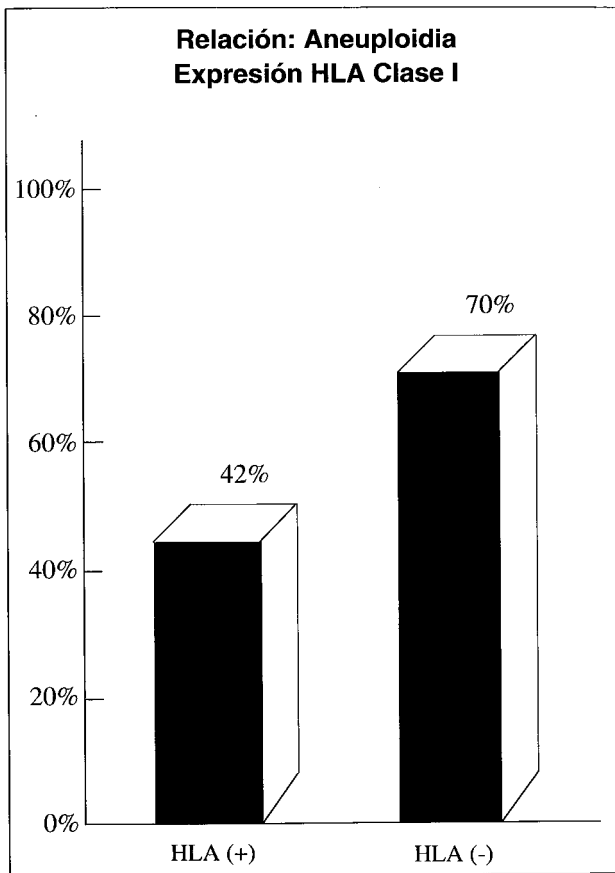


Figura 4

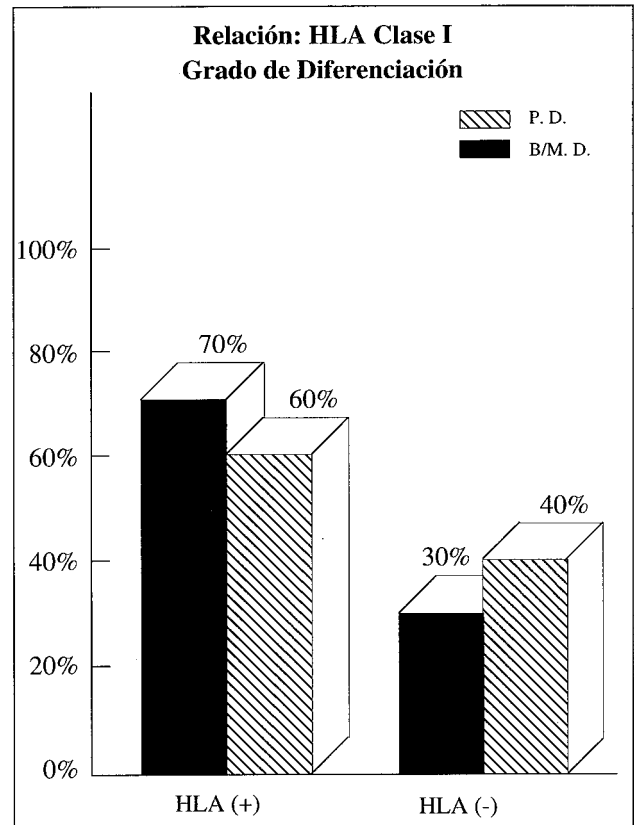


Figura 6

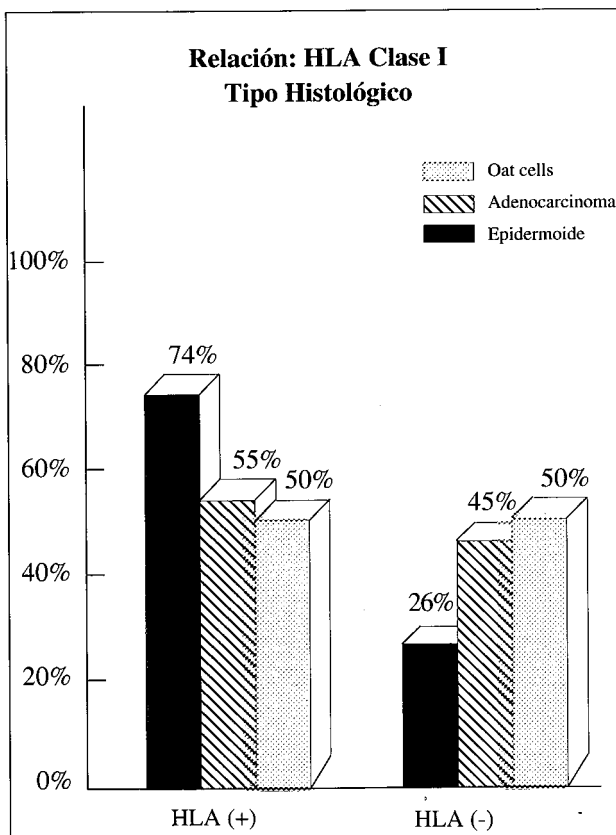


Figura 5

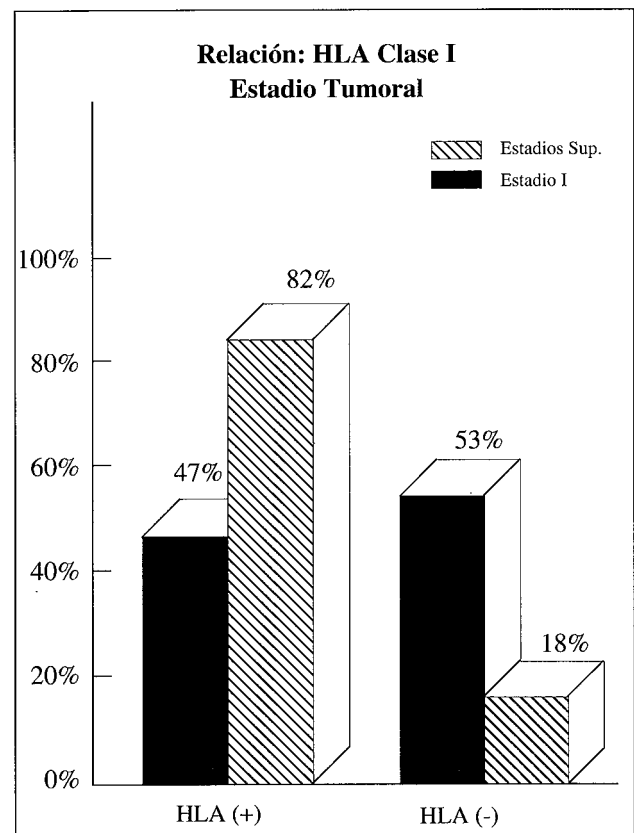


Figura 7

antígenos HI-A de clase I en 13 tumores (32%) (Figs. 1 y 2) (Tabla 1) pérdidas selectivas de locus A en un caso (Fig. 3) y de locus B en tres casos. Estas alteraciones se deben a pérdida simultánea de cadena pesada y β 2-microglobulina, como se pudo ver por la falta de reactividad de los anticuerpos monoclonales GRH1, W6/32 y HC10.

La ausencia de expresión de antígenos de clase I se detectó principalmente en tumores aneuploides (así el 70% de los tumores negativos presentaron aneuploidia) (Fig. 4), en los tipos histológicos de adenocarcinoma y carcinoma de células pequeñas (45% y 50% respectivamente no expresaron antígenos de clase I (Fig. 5), en tumores pobremente diferenciados (40%) (Fig. 6) y en el estadio tumoral I según la clasificación de la UICC (53%) (Fig. 7).

Se encontró expresión de antígenos HLA-DR y HLA-DP en cinco tumores y de antígenos HLA-DQ en tres (dos de los cuales presentaron también expresión de DR y DP) (Tabla II), siendo el resto totalmente negativos. Todos ellos correspondieron a tumores bien diferenciados excepto en uno de ellos en donde se detectó una expresión heterogénea inferior al 25%.

DISCUSION

Los antígenos de histocompatibilidad se han ligado al rechazo de tumores por linfocitos T citotóxicos mediante el estudio de células tumorales transfectadas que no expresaron estos antígenos. Se ha postulado que tanto el crecimiento tumoral como la invasividad no están sólo modificados por la ausencia de expresión^(26,27,28) sino también por un desequilibrio en la expresión de las diferentes moléculas de clase I⁽²⁹⁾ e incluso por una incrementada expresión⁽³⁰⁾, en este último caso debido a una disminución en la sensibilidad a las células NK.

En nuestro estudio hemos asociado el defecto de expresión de estos antígenos con parámetros clínico-patológicos indicadores de agresividad tumoral como son la presencia de aneuploidia, los tipos histológicos adenocarcinoma y oat-cells, y un grado pobre de diferenciación tumoral, mientras no hemos encontrado relación con el estadio tumoral. Por tanto podemos concluir que los defectos en la expresión de los antígenos de histocompatibilidad clase I están relacionados con una mayor agresividad tumoral. Estas pérdidas pueden representar un mecanismo de escape para la lisis mediada por los linfocitos T citotóxicos, ya que estas células reconocen antígenos tumorales en asociación con moléculas HLA de clase I⁽²⁸⁾.

Se ha encontrado una pérdida selectiva de locus A y tres de locus B en tumores clasificados previamente como positivos para clase I (anticadena pesada y anti-B 2 microglobulina) (Tabla I). La reactividad del infiltrado linfoide con estos anticuerpos sirve como control interno. En el caso de pérdida selectiva del locus A fue posible confirmar su presencia en linfocitos sanguíneos autólogos por medio de anticuerpos monoclonales polimórficos mediante ensayos estandar de citotoxicidad. Estos datos hablan en favor no solo del uso de anticuerpos monoclonales isotípicos sino también de anticuerpos polimórficos en orden a una mayor precisión de las alteraciones en la expresión de las moléculas VILA de clase I. En contraste a lo que sucede en modelos murinos⁽³¹⁾, en humanos todavía no se conoce si la pérdida de alguna molécula de clase I puede favorecer el escape de la inmunovigilancia.

La expresión de moléculas DR y DP se detectó en cinco casos y la expresión de DQ en tres, siendo totalmente negativa en el resto de tumores. Esta expresión de antígenos de clase II se detectó en tumores bien diferenciados, excepto en uno en el cual la expresión fue heterogénea e incluso inferior al 25% (Tabla 2). Resultados parecidos se encuentran en tumores de laringe⁽³²⁾ donde existe una expresión de «novo» de estos antígenos, en contraste a otros

tumores^(32,26). La expresión de estas moléculas sobre la superficie de las células puede conferir la capacidad para presentar el antígeno y de este modo estimular una eficiente respuesta inmune^(34,35). Nuestro grupo, también ha observado que en el cáncer de colon la expresión DR se correlaciona con un buen pronóstico⁽³⁶⁾.

Finalmente nuestros resultados demuestran que existe una mayor frecuencia de alteraciones en la expresión de antígenos de histocompatibilidad en carcinomas de pulmón en relación a otros tipos de tumores^(32,36,37). Estos defectos de expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase I están relacionados con una mayor agresividad tumoral, ocurriendo todo lo contrario con la expresión de los antígenos de clase II. Creemos necesario un estudio prospectivo para revelar el significado que estos cambios de expresión tienen en el comportamiento biológico de estos tumores.

BIBLIOGRAFIA

1. Daar. A.S, Fuggle S.V, Fabre J.V, Ting A. and Morris P.J. The detailed distribution of HLA ABC antigens in normal human organs. *Transplantation* 1984, 38: 287.
2. Natali P.G, Giacomini P, Bigotti A et al. Heterogeneity in the expression of HLA and tumour-associated antigens by surgically removed and cultured breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 1983; 43: 660-668.
3. Zinkernagel R.M. and Doherty P.C. MHC-restricted cytotoxic cells. Studies of the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cells restriction, function and responsiveness. *Adv. Immunol.* 1979; 27: 51-58.
4. Forsum U, Claesson K, Hjeln E, Karlson-Parra A. et al. Class II transplantation antigens: distribution in tissues and involvement in disease. *Scand. J. Immunol.* 1985; 21: 389-396.
5. Eckels D.D, Lake P, Lamb J.R et al. SB restricted presentation of influenza and herpes simplex virus antigen to human T-lymphocyte clones. *Nature (Lond.)* 1983; 301: 716.
6. Ploegh H.L, Orr H.T and Strominger J.L. Major histocompatibility antigens: the human (HLA A, B, Q and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. *Cell* 1981; 24: 287.
7. Cullen S.E, David C.S, Schreffler D.C and Nathenson S.G. Membrane molecules determined by the H-2 associated immune response region: isolation and some properties. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1974; 71: 648.
8. Englernan E.G, Charron D.J, Benike C.J, and Stewart G.J. Ia antigen on peripheral blood monoclear leukocytes in man. Expression biosynthesis and function of HLA-DR antigen on non-T-cells. *J. Exp. Med.* 1980; 152: 99 s.
9. Fentestein H and Schmidt V. Variations in MHC antigen profiles of tumour cells and its biological effects. *Immunol. Rev.* 198 1; 60: 85.
10. Garrido F. The biological implications of abnormal expression of histocompatibility antigens on murine and human tumors. En: C.S. David (Ed.). *H-2 gene complex: Genes, Molecules, Functions.* Bar Harbor, Maine, U.S.A., 1987; 623-639 (Nato ASI Series; vol. 144, Plenum, New York).
11. Fentestein H and Garrido F. MHC antigens and malignancy. *Nature* 1986;332:502.
12. Garrido F, P6rez M and Torres M.D. Absence of four H-2d antigenic specificities in an H2d sarcoma. *J. Immunogen* 1979; 6: 83.
13. Schirmacher V, Robinson P, Altevogt P et al. Clonal analysis of H-2 antigen expression by variants of a chemically induced murine tumour. *Transplant. Proc.* 1981; 13: 1819.
14. Orgad S, Yang S.Y, Gazit E. et al. Expression of extra class I major histocompatibility antigens on T-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL) lymphoblast. *Hum. Immunol.* 1985; 12:133.

15. Garrido F, Festenstein H and Schirmacher V. Further evidence for depression of H-2 and Ia-like specificities of foreign haplotypes in mouse tumour cell lines. *Nature* 1976; 261:705.
16. Phillips C, Strauss H.J, Wortzel R.D. and Schreiber A. Novel MHC class I molecule as a tumour-specific antigen: correlation between the antibody defined and the CTL defined target structure. *Immunogenetics* 1986;13:93.
17. Eisenbach L, Hollander N, Segal S. and Feldman M. The differential expression of class I major histocompatibility complex antigens controls the metastatic properties of tumour cells. *Transplantation Proc.* 1985; 27: 729.
18. Barnstable C.J, Bodmer W.F, Brown G et al. A production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell membrane antigens. New tools for genetics analysis. *Cell* 1978; 14: 9.
19. Burrone O.R, Krefford R.F, Gilmore D and Milstein C. Stimulation of HLA-A, B, C by IFN. The derivation of Molt 4 variant and the differential expression of HLA, B, C subset. *Embo. J.* 1985; 4: 2855.
20. López-Nevot M.A, Cabrera T, De la Higuera B, Ruiz-Cabello F and Garrido F. Production and characterization of monoclonal antibodies against leukemic cells. *Inmunologia* 1986; 5: 51-59.
21. Starn NJ, Spits H and Ploegh HL. Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products. *J. Immunol.* 1986; 137: 2299-2306.
22. Huelin C, González M, Pedrinaci S et al. Distribution of the CD45R antigen in the maturation of lymphoid and myeloid series: The CD45R negative phenotype is a constant finding in T CD4 positive lymphoproliferative disorders. *Br. J. Haematol* 1988; 69: 173-179.
23. Cabrera T, Ruiz-Cabello F, López M.A, De la Higuera B, Sánchez M. and Garrido F. Characterization of monoclonal antibodies directed against HLA class II molecules. *Hybridoma* 1986; 5: 191-197.
24. Watson AJ, Demars R, Trowbridge LS and Bach S.H. Detection of a novel HLA antigen. *Nature (Lond.)* 1983; 304: 358-361.
25. Ziegler A, Uchanska-Ziegler B, Rosenfeld G, Braun D.G and Wernet P. Heterogeneity of established human hematopoietic cell lines: surface antigens detected by monoclonal antibodies and glycosphingolipid patterns. In: W. Knapp (ed.). *Leukaemia markers*, Academic press, New York 1981; 317.
26. Ruiter D.J, Brocker E.B and Ferrone S. Expression and susceptibility to modulation by interferons of class I and II antigens on melanoma cells. Immunohistochemical analysis and clinical relevance. *J. Immunogenet.* 1986; 13: 229-234.
27. Garrido A, Pérez M, Delgado C et al. Influence of class I H2 gene expression on local tumour growth. Description of a model from clones derived from a solid BALB/C tumour. *Expl. Clin. Immunogenet.* 1986; 3: 98-110.
28. Festenstein H. The biological consequences of altered MHC expression on tumours. *Br. Med. Bull* 1987; 43: 217.
29. Katzav S, De Baetselier P, Tartakovsky B, Feldman M and Segal S. Alteration in major histocompatibility complex phenotypes of mouse cloned T 10 sarcoma cells: association with shifts from non-metastatic to metastatic cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 1983; 71: 317-319.
30. Ljunggren H.G. and Karre K. Variations in MHC antigen expression on tumours and its significance. *J. Immunogenet.* 1986; 13: 141-151.
31. Hammerling GJ, Klar D, Katzav S et al. Manipulation of metastasis and tumour growth by transfection with histocompatibility class I genes. *J. Immunogenet.* 1986; 13: 153-158.
32. Esteban F, Concha A, Huelin C et al. Histocompatibility antigens in primary and metastatic squamous cell carcinoma of the larynx. *Int. J. Cancer* 1989; 43: 436.
33. Brocker E.B, Suter L, Bruggen J, Ruiter DJ, Macher E and Sorg C. Phenotypic dynamics of tumour progression in human malignant melanoma. *Int. J. Cancer* 1985; 36: 29.
34. Londei M, Lamb J.R, Botazzo G.F and Feldmann M. Epithelial cells expressing aberrant MHC class II determinants can present antigens to cloned human T cells. *Nature (Lond.)* 1984; 312: 639-640.

35. Svennevig J.L, Lunde O.C, Holter J and Bjorgsvik D. Lymphoid infiltration and prognosis in colorectal carcinoma. Brit. J. Cancer 1984; 49: 375-377.
36. Gutiérrez J, López-Nevot M.A, Cabrera T et al. Class I and II HLA antigen distribution in normal mucosa, adenoma and colon carcinoma: relation with malignancy and invasiveness. Exp. clin. Immunogenet 1987; 4: 144-152.
37. López-Nevot M.A, García E, Romero C, Oliva R, Serrano S and Garrido F. Phenotypic and genetic analysis of HLA class I and HLA-DR antigen expression on human melanomas. Exp. Clin. Immunogeneti 1988; 5: 203.

RENTABILIDAD DE LAS TECNICAS DIAGNOSTICAS EN TUBERCULOSIS PLEURAL. UTILIDAD DEL ANTIGENO 60.

J. A. Caminero, F. Rodríguez de Castro, T. Carrillo, L. López, J. Freixinet, P. Cabrera.
Sección de Neumología y Unidad de Cirugía Torácica. Hospital Nuestra Señora del Pino.
C\ Angel Guimerá, 93 - 35005 LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.
*TRABAJO PREMIADO EN EL XVII CONGRESO DE NEUMOSUR

Con el objetivo de valorar en la tuberculosis pleural la rentabilidad diagnóstica de la detección por ELISA de IgG antiantígeno 60, hemos realizado esta técnica sobre suero y líquido pleural de 18 pacientes con esta enfermedad y de un grupo control de 33 enfermos con otras afecciones pleurales (19 neoplásicas, 7 trasudados, 5 metaneumónicas, 1 lupus eritematoso diseminado y 1 tromboembolismo pulmonar). La media de las unidades obtenidas en suero era superior ($p < 0,01$) en las 18 tuberculosis pleurales (459,83 unidades) que en los 33 controles (107,42), hecho que también ocurría cuando la técnica se desarrollaba sobre líquido pleural, donde igualmente existía diferenciación estadística ($p < 0,001$) entre las medias de la tuberculosis pleurales (273,61) y la de los controles (42,6). Existía una relación estrecha entre los niveles de IgG anti-A60 en suero y líquido pleural en el grupo de tuberculosis pleural ($r = 0,97$) y al ser valorados los 2 grupos conjuntamente ($r = 0,97$). Este dato iría a favor de que los anticuerpos en el líquido pleural podrían estar presentes por difusión pasiva desde el suero y no por producción local de los mismos.

Calculando el nivel umbral de positividad del test en 230 unidades para suero y en 150 para líquido pleural, obtuvimos una sensibilidad del 55 % sobre suero y del 50 % sobre líquido con una especificidad del 100 % para el estudio sobre ambas muestras. Comparando estos resultados con los obtenidos por el resto de las técnicas diagnósticas empleadas en tuberculosis pleural, estos superaban a los obtenidos tanto por la microscopia directa como por el cultivo de líquido y biopsia pleural.

YIELD OF DIAGNOSTIC TECHNIQUES IN PLEURAL TUBERCULOSIS. VALUE OF ANTIGEN 60.

In order to evaluate the diagnostic interest of detection of IgG anti-antigen 60 by ELISA, we have determined it both in serum and pleural fluid samples from 18 patients with pleural tuberculosis. Thirty-three patients with other pleural diseases were used as control group. Average serum value for pleural tuberculosis was 458.83 units, against 107.42 units in non-tuberculosis patients ($p < 0,01$). When pleural fluid was considered, we had an average of 273.61 units in tuberculous pleurisy against 42.6 in the control group ($p < 0,001$). There was a strong relationship between serum and pleural fluid levels both in patients with tuberculosis and in the overall series ($r = 0,97$), and this finding suggests a passive transfer from blood to pleural space.