



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"

FACOLTA' DI
SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA IN
*Immunologia
e Biotecnologie applicate*

CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO
XX

Titolo della tesi
*La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza
delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei
linfociti CD4⁺ T helper*

Dottoranda
Stefania Rizzo

Docente Guida/Tutor: Prof. *Gino Doria*

Coordinatore: Prof. *Paolo Rossi*

*"La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e
promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper"*

INDICE

Sommario	p. 1
 Introduzione	
1. Il sistema immunitario	p. 3
2. Tolleranza	p. 4
2.1 Tolleranza centrale	p. 5
2.2 Tolleranza periferica	p. 9
3. Cellule T regolatorie	p. 10
4. Tumori	p. 16
4.1 Acquisizione dell'autonomia moltiplicativa	p. 18
4.2 Insensibilità ai fattori inibitori di crescita	p. 18
4.3 Evasione dall'apoptosi	p. 19
4.4 Potenziale illimitato di proliferazione	p. 20
4.5 Angiogenesi e metastasi	p. 20
5. Immunosorveglianza	p. 21
5.1 Eliminazione del tumore	p. 25
5.2 Cellule coinvolte nell'immunità al tumore	p. 28
5.2.1 Cellule T	p. 28
5.2.2 Cellule NK e linfociti T $\gamma\delta^+$	p. 28
6. Tolleranza indotta dalle cellule tumorali	p. 30
6.1 Fase di equilibrio	p. 31
6.2 Fase di evasione	p. 32
6.2.1 Difetti nella presentazione antigenica	p. 33

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

6.2.2 Difetti nel signaling	p. 34
6.2.3 Secrezione di fattori immunosoppressivi	p. 34
6.2.4 Vie di regolazione negativa	p. 35
6.2.5 Modulazione del catabolismo del triptofano	p. 35
7. Cellule T regolatorie e immunita' tumorale	p. 36
8. Chemioterapici	p. 39
8.1 Ciclofosfamide	p. 39
9. Immunoterapia dei tumori	p. 42
 Metodi	 p. 44
Risultati	p. 50
Discussione	p. 81
Ringraziamenti	p. 88
Bibliografia	p. 89
Parole chiave	p. 98

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

SOMMARIO

I tumori possono attivamente riuscire ad evadere il riconoscimento e la distruzione da parte delle cellule effettrici del sistema immune attraverso l'attivo stabilirsi della tolleranza immunologica che coinvolge i linfociti ad attività soppressoria (Treg).

La capacità di queste cellule di influenzare efficientemente la funzione effettrice delle cellule T ha stimolato un grande interesse per il loro potenziale di regolare le risposte immuni durante le infezioni, le malattie autoimmuni e il tumore.

È stato proposto che la deplezione di queste cellule possa determinare una migliore risposta alla immunoterapia tumorale.

L'immunoterapia è una promettente strategia antitumorale che viene sempre più spesso e con successo associata con gli attuali trattamenti antitumorali.

Nel topo la ciclofosfamide determina un aumento della risposta immune specifica contro il tumore dopo immunoterapia adottiva, e attualmente trattamenti combinati di immunoterapia vengono usati in numerosi trials clinici.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare gli eventi biologici indotti dalla chemioterapia. In particolare, ci si è soffermati su: (a) effetto del trattamento della ciclofosfamide sia sulle cellule del sistema immune che sullo sviluppo delle cellule Treg, (b) trasferimento adottivo di cellule T naïve e *homing* verso gli organi linfoidi secondari, (c) attivazione e funzioni effettrici degli stessi linfociti T.

I risultati sono stati successivamente traslati su un modello tumorale murino EG7-OVA, una linea tumorale che costitutivamente esprime OVA come antigene tumorale e che è caratterizzata da una aumentata frequenza di cellule Treg CD4⁺ CD25⁺.

E' stato mostrato che un singolo inoculo del farmaco chemioterapico determina riduzione di cellule T, B e ciò che è interessante di cellule Treg.

Il trattamento con ciclofosfamide promuove la sopravvivenza e l'*homing* di linfociti T antigene specifici verso milza e linfonodi, rendendole quindi cellule competenti per svolgere le funzioni effettrici volte all'eliminazione dell'antigene.

Inoltre, in presenza di massa tumorale la CTX determina aumento dei linfociti T CD4⁺ nel linfonodo drenante il tumore e la riduzione delle cellule Treg.

In conclusione, questi risultati rivelano un nuovo meccanismo attraverso cui la chemioterapia può aumentare la risposta antitumorale dopo trasferimento adottivo di linfociti T e forniscono nuovi sviluppi per la definizione di nuove strategie di chemioterapia e immunoterapia in pazienti con tumore.

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

INTRODUZIONE

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

1. IL SISTEMA IMMUNITARIO

Gli individui sani si proteggono dai microbi grazie a molti meccanismi diversi; alcuni di questi meccanismi di protezione rientrano nella cosiddetta immunità innata chiamata anche immunità naturale che media l'iniziale protezione contro le infezioni.

A fianco dell'immunità innata esistono meccanismi di difesa maggiormente evoluti che vengono stimolati dalla esposizione agli agenti infettivi e che, in seguito a ripetute esposizioni ad un determinato microbo, accrescono la loro intensità e il loro potenziale difensivo.

Questa forma di immunità viene definita immunità acquisita o specifica.

Le risposte immuni specifiche possono essere classificate, a seconda della componente cellulare coinvolta, in:

- ✓ **Immunità umorale** mediata da molecole circolanti responsabili del riconoscimento specifico e della eliminazione dell'antigene, chiamate anticorpi.
- ✓ **Immunità cellulare** mediata da cellule denominate linfociti T.

Il sistema immune specifico possiede numerose caratteristiche di fondamentale importanza per il suo corretto funzionamento; tra queste, la specificità per i singoli antigeni, la diversità del riconoscimento antigenico, la memoria nei confronti dell'esposizione all'antigene, la capacità di auto-limitazione, la specializzazione delle risposte verso microbi differenti, la capacità di discriminare tra costituenti autologhi e antigeni estranei.

Tutte queste caratteristiche sono necessarie affinché il sistema immune sia in grado di svolgere la sua normale funzione di difesa dell'organismo. La specificità e la memoria rendono il sistema immune capace di generare

risposte immuni più intense verso stimolazioni persistenti o ricorrenti da parte dello stesso antigene, così da combattere efficacemente infezioni ripetute o prolungate. La diversificazione è essenziale per la difesa degli organismi nei confronti della miriade di possibili patogeni ambientali. La specializzazione rende l'ospite capaci di adattare le risposte immuni per combattere meglio i molti differenti microbi in grado di infettare l'uomo. L'auto-limitazione consente al sistema di ritornare ad uno stato di riposo dopo aver eliminato l'agente estraneo, rendendo in tal modo possibile una risposta ottimale ad altri antigeni che eventualmente si presentino. La capacità di distinguere tra *self* e *non self*, e quindi la tolleranza al *self*, è essenziale per prevenire risposte verso propri costituenti cellulari e tissutali, pur mantenendo un repertorio diversificato di linfociti specifici per gli antigeni esogeni.

2. TOLLERANZA

Le cellule effettrici del sistema immune esprimono sulla superficie un unico recettore derivato da riarrangiamenti casuali dei geni del TCR. Nel caso dei linfociti T questi riarrangiamenti generano un potenziale repertorio di linfociti T maturi le cui dimensioni vengono stimate nell'ordine di $1-2 \times 10^8$ cellule nel topo e 1×10^{12} nell'uomo.

Il numero totale di specificità dei linfociti T per i diversi antigeni in ogni individuo è chiamato repertorio dei linfociti T. Ogni repertorio individuale di linfociti T helper e citotossici maturi ha almeno due caratteristiche essenziali:

- Il riconoscimento e l'eliminazione da parte dei linfociti T dei peptidi derivanti dagli antigeni estranei si ha solo quando questi ultimi sono

associati con molecole *self* codificate dal complesso maggiore di istocompatibilità.

- Il repertorio dei linfociti T maturi è costituito da linfociti che non riconoscono antigeni *self*, incontrati durante la loro maturazione, in associazione a molecole MHC autologhe.

La non responsività del sistema immune verso gli antigeni autologhi è chiamata tolleranza immunologica al *self*. La perdita di questa caratteristica che si traduce in risposte immuni verso i costituenti propri dell'organismo genera autoimmunità. Pertanto, comprendere come si generi il repertorio delle cellule T mature è estremamente importante per capire la specificità dei linfociti T, può aiutare a scoprire la patogenesi di tali malattie e stimolare nuovi approcci terapeutici.

Studi compiuti in numerosi modelli animali hanno permesso di identificare il ruolo centrale delle cellule T, in particolar modo i CD4, in questo processo.

La tolleranza al *self* nel repertorio dei linfociti T viene indotta attraverso due principali meccanismi inibitori: la tolleranza centrale e la tolleranza periferica. Solo recentemente, è stato identificato un nuovo meccanismo di salvaguardia del *self* mediato da una sottopopolazione di cellule T dette regolatorie (Treg) che sopprimono l'attivazione di quelle cellule auto-reattive che sono sfuggite dalla selezione. (1)

2.1 Tolleranza centrale

Sulla base dell'osservazione che la mancanza del timo si associava alla comparsa di deficienze immunologiche, è stato ipotizzato che questo organo fosse il luogo principale in cui si verifica la maturazione delle cellule T.

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

L'assenza congenita del timo, come avviene nella sindrome di Di George nell'uomo o nel ceppo di topi "nudi", è caratterizzata da un difetto di maturazione a carico delle cellule T che si traduce nell'assenza o in una grave riduzione numerica di tali cellule sia in circolo che nei tessuti linfoidei periferici.

Tutte le cellule dell'organismo originano nel midollo osseo da una cellula staminale comune che successivamente si evolve lungo particolari linee differenziative. I precursori dei linfociti T originatisi nel midollo osseo migrano nella zona corticale del timo dove alcune cellule sono stimulate a proliferare mentre la maggior parte di queste, in seguito a processi selettivi, va incontro a morte. Si stima che la massiccia proliferazione di queste cellule generi al giorno circa 5×10^7 cellule T, ma solo $1-2 \times 10^6$ di cellule mature venga immessa nel torrente circolatorio. La perdita del 95% di timociti riflette i processi di stringente selezione che formano il repertorio delle cellule T mature.

Nelle successive fasi di sviluppo, il linfocita T proliferante passa attraverso una serie di stati maturativi caratterizzati da una diversa espressione delle molecole di membrana. La maggior parte dei precursori T altamente immaturi nel timo del topo adulto esprime elevati livelli del recettore per un fattore di crescita emopoietico denominato ligando di c-kit, e della molecola di adesione glicoproteica solfatata CD44, mentre l'espressione della catena α del recettore dell' IL-2 CD25 è molto bassa. Alcuni dei precursori altamente immaturi possono anche esprimere transitoriamente CD4 subito dopo l'entrata nel timo, ma molto presto tale espressione viene perduta e la maggior parte di queste cellule non esprime né il CD4 né il CD8. Questa popolazione viene quindi definita doppio negativa (DN). Nella corticale i timociti iniziano ad esprimere molecole TCR generate casualmente dotate

delle più diverse specificità. Durante la maturazione i segmenti genici del TCR vanno incontro a riarrangiamento dando luogo alla formazione di geni funzionali della catena β e successivamente della catena α del TCR. In seguito al processo di riarrangiamento genico viene espresso il complesso TCR:CD3 (complesso molecolare di trasduzione del segnale) e si verifica l'espressione sulla superficie cellulare di molecole accessorie come CD4 e CD8. Tali cellule sono dette doppio positive (DP). Tutti gli eventi seguenti dopo la progressione a DP dipendono da interazioni di peptidi con molecole di MHC sulle cellule stromali timiche.

Il successivo evento fondamentale per la maturazione intra-timica delle cellule T, dopo l'espressione del TCR, CD4 e CD8, è la selezione delle cellule che formeranno il repertorio dei linfociti T maturi periferici. I processi di selezione sono responsabili della sopravvivenza delle cellule T che esprimono TCR capaci di riconoscere solo peptidi derivati da antigeni estranei in associazione con forme alleliche delle molecole MHC *self*.

È stato ipotizzato che il sistema immune può non essere tollerizzato verso tutti gli antigeni periferici ma solo un "limitato" ma ampio spettro di antigeni *self* è rappresentato nel timo.

La selezione timica è divisa in positiva e negativa. (1)

La selezione positiva è il processo che porta alla generazione di linfociti maturi che esprimono solo TCR ristretti per MHC *self*. Questo processo che avviene a carico dei timociti $CD4^+CD8^+TCR\alpha\beta^+$ è dovuto ad un debole riconoscimento, vale a dire con avidità di interazione bassa, di complessi autologhi MHC-peptide presentati dalle cellule epiteliali timiche (TEC), in particolar modo dalle cellule epiteliali timiche midollari (mTEC). Queste cellule esprimono un ampio spettro di antigeni *self* che virtualmente rappresentano tutti i tessuti del corpo. Questo fenomeno, unico alle TEC, è

stato denominato espressione genica promiscua (pGE). Sebbene ci siano numerosi modi attraverso cui gli antigeni possono venir presentati ai linfociti T per la selezione intra-timica, è stato proposto che le cellule dendritiche (DC) possano acquisire gli antigeni direttamente dalle mTEC in diversi modi. Primo, le DC cross-presentano efficientemente frammenti antigenici derivati da cellule epiteliali timiche apoptotiche; secondo, l'acquisizione degli antigeni sulle DC può derivare o attraverso gli esosomi secreti dalle mTEC o attraverso un processo denominato “nibbling”; infine recentemente si è dimostrato un flusso antigenico intercellulare attraverso le gap junction. Tuttavia una chiara dimostrazione *in vivo* del meccanismo che coinvolge le DC non è stato ancora dimostrato.

Alternativamente, le rare mTEC possono esse stesse in linea di principio contribuire alla delezione delle cellule T. **(2)**

Durante la selezione negativa, i timociti con un TCR che si lega con alta affinità ai peptidi autologhi associati a molecole MHC *self* vengono eliminati, mediante delezione clonale, o inattivati, mediante anergia clonale. Questo processo sembra esser dovuto da interazioni ad alta avidità tra timociti DP e complessi MHC-peptide *self* espressi sulle APC timiche.

Via via che i timociti DP che sopravvivono maturano, migrano verso la zona midollare e diventano $CD4^+CD8^-$ o $CD4^-CD8^+$ per poi ritrovarsi nei tessuti linfoidi periferici.

Esperimenti condotti in topi transgenici hanno rivelato che è la specificità del $TCR\alpha\beta$ per le molecole MHC I o MHC II a dirigere le cellule selezionate negativamente verso il fenotipo $CD8^+$ o $CD4^+$ rispettivamente. **(3)** Inoltre, fattori di trascrizione e varie molecole, in diverse combinazioni tra loro, come Notch, GATA 3 e membri della famiglia Ikaros, sono importanti nel guidare lo sviluppo delle cellule T. **(4)**

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti $CD4^+$ T helper”

Tuttavia qualche cellula sfugge a questa selezione. Per questo motivo, oltre alla tolleranza centrale, il sistema immunitario ha sviluppato ulteriori meccanismi di tollerizzazione di cloni linfocitari autoreattivi che sono attivi nelle sedi periferiche (tolleranza periferica).

2.2 Tolleranza periferica

La tolleranza periferica è il meccanismo di tolleranza T verso antigeni tessuto-specifici non presenti nel timo; i meccanismi verso le proteine *self* sono probabilmente simili a quelli della tolleranza nei confronti di antigeni estranei e sono:

- anergia clonale dovuta al riconoscimento di antigeni *self* in assenza di costimolazione. Lo stato di attivazione delle APC tissutali è un importante fattore in grado di condizionare lo sviluppo della tolleranza al *self* o di fenomeni autoimmuni.
- Morte cellulare indotta da attivazione verso antigeni *self*. Antigeni presenti a concentrazioni elevate possono stimolare ripetutamente linfociti T specifici eliminandoli tramite apoptosi mediata da FAS.
- Indifferenza clonale sebbene non rappresenti un meccanismo di tolleranza in quanto non viene indotto attivamente uno stato di non responsività immunologica.
- Soppressione di linfociti T autoreattivi da parte di cellule T ad azione regolatoria (Treg). (1)

In tutti i casi, il meccanismo predominante che determina la tolleranza periferica sembra essere mediato dalle cellule Treg. (5)

3. CELLULE T REGOLATORIE

Un requisito fondamentale per l'ottimale funzionamento del sistema immunitario consiste nella capacità di differenziare ciò che è estraneo all'organismo (*non self*) da quello che ne è proprio (*self*). Questo viene raggiunto nel timo attraverso la selezione negativa di cellule T auto-reattive. Poiché una certa percentuale di queste cellule sfugge ai meccanismi di tolleranza centrale, devono esistere meccanismi di tolleranza periferica che controllano tali cellule. È stata identificata una popolazione di cellule T, cellule T regolatorie (Treg), che mediante attiva soppressione dell'attivazione e dell'espansione delle cellule reattive contro i costituenti propri dell'organismo gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento della tolleranza al *self* e nell'omeostasi cellulare.

La prima evidenza della produzione di cellule T con capacità soppressoria nel timo deriva da esperimenti condotti da Nishizuka Y. e Sakakura T. i quali mostrarono che la timectomia neonatale di topi normali, in particolar modo tra i 2 e i 4 giorni di vita, induceva malattie auto-immunitarie ad ampio spettro. Il trasferimento di splenociti provenienti da topi non timectomizzati era in grado di prevenire lo sviluppo di tali disordini. Come atteso, la popolazione di cellule responsabile della prevenzione di tali disordini era costituita da cellule T. Lo studio dell'espressione di differenti molecole di superficie in questa popolazione ha portato alla conclusione che le cellule T regolatorie erano comprese nella popolazione di cellule CD5⁺.

(6)

Esistono diverse popolazioni di cellule T con attività regolatoria: CD4⁺CD25⁺ (natural arising, Treg), cellule Tr1 secernenti IL-10, cellule Th3 secernenti TGF-β, CD8⁺CD28⁻, CD8⁺CD122⁺, cellule γδ e cellule T

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

NK. Mentre la maggioranza di queste cellule sono generate in periferia da cellule T naïve dopo attivazione antigenica, solo le cellule CD4⁺CD25⁺ sono prodotte nel timo come una popolazione distinta e funzionalmente matura di cellule T in grado di esercitare attività soppressoria prima dell'incontro con l'antigene. Questa popolazione ha suscitato un grande interesse sia nell'uomo che nel topo non solo per la capacità di inibire le risposte autoimmuni ma anche per la soppressione di una vasta gamma di risposte immuni fisiologiche e patologiche verso antigeni *non self*.

La prima definizione di cellule T regolatorie CD4⁺CD25⁺ venne data da Sakaguchi nel 1995 il quale dimostrò che il trasferimento in topi nudi di una popolazione di cellule T CD4⁺ prive di una sottopopolazione che esprimeva elevati livelli della catena α del recettore per IL-2 (CD25) causava una serie di disordini autoimmunitari. Tali disturbi potevano essere prevenuti ricostituendo l'animale con CD4⁺CD25⁺. (7)

Recenti ricerche hanno identificato il fattore di trascrizione Foxp3 come marker esclusivo delle cellule CD4⁺CD25⁺. Recentemente è stato identificata una mutazione del gene Foxp3 nei topi *scurfy* che determina una patologia X-linked con iperattivazione delle cellule T CD4⁺ e con produzione massiccia di citochine pro-infiammatorie. Nell'uomo mutazioni del gene Foxp3 sono la causa di una patologia letale chiamata IPEX (*Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked inheritance*) che porta allo sviluppo di malattie autoimmunitarie organo specifiche, ipergammaglobulinemia E, disordini ematologici, ed infezioni.

Recenti ricerche hanno dimostrato che il fattore di trascrizione Foxp3 gioca un ruolo molto importante nello sviluppo e nelle funzioni delle Treg. La trasduzione retrovirale del gene in cellule CD4⁺CD25⁻ può convertire queste cellule a Treg capaci di sopprimere la proliferazione *in vitro* e di inibire lo

sviluppo di malattie autoimmuni *in vivo*. Inoltre, il numero di queste cellule è notevolmente aumentato nei topi transgenici per Foxp3, al contrario topi Ko per il gene presentano iperattivazione delle cellule T paragonabile ai topi *scurfy*. Il fattore di trascrizione Foxp3 appartiene a una famiglia più ampia di fattori di trascrizione chiamati FOX; è costituito da diversi domini strutturali fra cui: *zinc-finger*, una struttura a cerniera di leucina e, al c-terminale, un dominio a forcina con il quale si lega al DNA inibendo la trascrizione dei geni a valle. Il fattore Foxp3 è infatti un regolatore negativo della trascrizione. Studi recenti hanno mostrato come questo fattore riconosce una sequenza di DNA in prossimità di un consenso riconosciuto dal fattore NFAT che attiva la trascrizione di geni codificanti per molte citochine infiammatorie, fra le quali IL-2, IL-4 e TNF α . Si ritiene che la proteina Foxp3 competa per il sito di legame al DNA con NFAT portando all'inibizione della trascrizione dei geni per le suddette citochine. (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14)

Numerosi studi sono stati fatti in questi anni per capire il meccanismo attraverso cui questa popolazione di cellule T determina inibizione della proliferazione cellulare. Tutto oggi i meccanismi molecolari che sono alla base dell'azione inibitoria delle Treg non sono ancora del tutto chiariti tuttavia in letteratura sono stati proposti vari modelli. La soppressione *in vitro* è mediata dal contatto cellula-cellula o da meccanismi che prevedono la secrezione di citochine come IL-4, IL-10, TGF- β , e solo recentemente, da meccanismi dipendenti dal granzima B. Infatti, le cellule Treg purificate da topi GZ-B^{-/-} mostrano una compromessa capacità soppressoria. Inoltre, questo processo risulta indipendente dalle perforine, in quanto cellule Treg purificate da topi Ko per le perforine, dimostrano capacità soppressoria analoga alle cellule Treg di controllo. (14)

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

Come queste cellule vengano generate nel timo o in periferia e come vengono attivate o mantenute dal sistema immune sono altri punti su cui i ricercatori stanno cercando di dare una risposta. Lo sviluppo nel timo sembra richiedere interazioni tra il TCR e i complessi MHC-peptide *self* espressi dalle cellule stromali. Si suppone che tale sviluppo, promosso dall'espressione di Foxp3, sia dovuto al grado di avidità tra il TCR e le molecole di MHC II che è compreso tra il valore di avidità richiesto per la selezione positiva e negativa. (15) Tre giorni dopo la nascita queste cellule cominciano a migrare dal timo agli organi periferici (linfonodi e milza).

Tuttavia, si è visto che le cellule Treg possono essere generate in periferia mediante stimolazione *ex vivo* in presenza di citochine come IL-2 e TGF- β .

È stato dimostrato che la catena α del recettore per la citochina IL-2 e la citochina stessa rappresentano un requisito fondamentale per la sopravvivenza delle Treg.

Topi IL-2^{-/-}, IL-2R α ^{-/-} o IL-2R β ^{-/-} presentano malattie infiammatorie simili ai disordini autoimmuni dovuti alla drastica riduzione nel timo e nella periferia di questi topi delle cellule CD4⁺CD25⁺. Inoltre, l'assenza della catena comune γ porta alla completa mancanza delle Treg. Nei topi normali Foxp3 sopprime la trascrizione del gene per IL-2 ma up-regola l'espressione del CD25; al contrario alte dosi di IL-2 up-regolano l'espressione del CD25 convertendo le cellule T CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ ad un fenotipo CD25⁺ sia *in vivo* che *in vitro*. Quindi, IL-2 esogena può determinare un aumento della soppressione e le Treg sono cellule altamente dipendenti da questa citochina per la loro sopravvivenza. Tuttavia, la completa assenza di queste cellule in topi IL-2R γ ^{-/-}, indica che anche il legame di altre citochine come IL-4, IL-7, IL-9, e IL-15 a recettori che presentano la catena γ comune è coinvolto nella sopravvivenza periferica delle Treg. L'analisi dell'espressione del mRNA e

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

di IL-2 nelle sottopopolazioni linfocitarie ha rivelato che sono le cellule $CD4^+CD25^{low}$ che trascrivono attivamente il gene e producono la proteina. È verosimile che sia attiva nel timo una popolazione simile a quella periferica che contribuisca alla sopravvivenza delle cellule Treg generate nella midollare timica.

IL-2 è anche richiesta per la generazione de novo in periferia, a partire da cellule T naïve, di cellule Treg. La produzione locale di IL-2 nel sito di infiammazione può espandere le cellule Treg attive contro antigeni microbici o antigeni *self* rilasciati da tessuti danneggiati.

Solo recentemente, inoltre, è stato dimostrato il ruolo della citochina IL-4 nella modulazione della attività mediata dalle cellule Treg. L'aggiunta di IL-4 a co-culture di cellule T $CD4^+$, Treg e cellule presentanti l'antigene (APC) inibisce la soppressione delle cellule T $CD4^+$ rendendole resistenti alla attività regolatoria esercitata dalle cellule Treg. Inoltre, IL-4 induce la proliferazione delle cellule Treg. Tuttavia, la attività soppressoria viene mantenuta. (16)

Oltre alle citochine, numerose molecole accessorie espresse dalle Treg sono coinvolte nella determinazione dell'attivazione, espansione e soppressione:

- CTLA-4 espresso costitutivamente sia nel timo che in periferia. Sono stati ipotizzati diversi possibili ruoli di CTLA-4 nel meccanismo di soppressione; uno di questi è la sua interazione con le molecole di CD80/CD86 espresse sulle APC con trasduzione di segnali attivatori le Treg. Tuttavia numerose ricerche hanno indicato che questa molecola potrebbe non essere indispensabile per le funzioni delle Treg poiché topi Ko per CTLA-4 hanno cellule $CD4^+Foxp3^+$ che presentano capacità soppressoria *in vitro* equivalente a quella dei topi *wild type*.

- GITR, membro della famiglia del recettore del TNF, anch'esso espresso costitutivamente sulle Treg. Da notare che il ligando del GITR è espresso dalle DC immature oltre che da cellule B e macrofagi e viene down-regolato in seguito a maturazione delle DC. Non è noto, tuttavia, come il cambiamento nell'espressione del GITR-L durante la maturazione delle DC possa contribuire all'attivazione delle cellule Treg durante le risposte immuni.
- CD40, strutturalmente simile al GITR, necessario per lo sviluppo nel timo delle cellule Treg. (17, 18, 19)
- LAG-3, gene 3 di attivazione linfocitaria o CD223, proteina transmembrana che lega le molecole di MHC II. È stato mostrato che LAG-3 è richiesto per la funzione regolatoria delle cellule T. (20)
- I TLRs, recettori che riconoscono complessi molecolari microbici a largo spettro e fattori rilasciati da molecole endogene durante l'infiammazione. Le cellule $CD4^+CD25^+$ Treg esprimono alcuni membri della famiglia dei TLRs, come TLR4. La stimolazione *in vitro* delle cellule $CD4^+CD25^+$ Treg con un'alta concentrazione di lipolisaccaridi (LPS) induce la stimolazione di TLR4 che porta alla proliferazione di queste cellule, alla loro sopravvivenza e all'aumento della loro capacità soppressoria. (21)

Nell'uomo, da poco, è stato individuato un nuovo marker indispensabile per l'anergia e le funzioni soppressive delle cellule Treg. Si tratta della galectina-10 che è espressa sulle Treg mentre è totalmente assente sia sulle cellule T $CD4^+$ naïve che attivate. A causa della sua espressione intracellulare, la galectina-10 non sembra essere coinvolta nel meccanismo di soppressione mediato dal contatto cellula-cellula; tuttavia, l'inibizione

specifica della galectina-10 rende le Treg capaci di proliferare ed incapaci di espletare le funzioni soppressorie nei confronti delle altre cellule. (22)

4. TUMORI

I tumori o neoplasie sono l'insieme di una popolazione di cellule somatiche che ha preso origine quasi sempre da una sola cellula dell'organismo che ha subito una serie sequenziale di danni genomici (mutazioni) trasmissibili alla progenie. (23)

Sulla base dei risultati forniti da ricerche sull'induzione sperimentale di tumori negli animali con agenti chimici e fisici, è noto che la cancerogenesi nell'uomo sia un processo multifasico derivato da alterazioni genetiche che portano alla progressiva trasformazione di cellule normali in cellule altamente maligne. Le lesioni in differenti siti di organi sembrano rappresentare una tappa intermedia in cui le cellule evolvono progressivamente in tumore invasivo attraverso una serie di stadi pre-maligni. (24)

Le cellule tumorali presentano rispetto alle cellule normali diverse alterazioni essenziali alla fisiologia della cellula che rappresentano caratteristiche comuni alla maggior parte se non a tutti i diversi tipi di tumore: (Tabella 1)

Tabella 1 | Impatto delle caratteristiche intrinseche al tumore sul sistema immunitario

Caratteristica	Fattori coinvolti	Effetto sul sistema immune
Segnali di crescita autocrini	IL-4 IL-6	• promuove il differenziamento a Th2 • inibisce le risposte infiammatorie attraverso aberrante attivazione JAK-STAT3
	IL-10	• promuove il differenziamento a Th2
Insensibilità ai fattori inibitori di crescita	resistenza al TGF- β	• inibisce la presentazione dell'antigene • inibisce la proliferazione delle cellule T • inibisce la citotossicità delle NK • attiva le Treg
Evasione dall'apoptosi	proteine della famiglia di BCL-2	• antigeni tumorali • sovverte le funzioni delle DC;
	MUC1	• antigene tumorale
	survivina	• promuove l'apoptosi; antigene tumorale
	ridotta attivazione delle caspasi	• ridotta immunogenicità tumorale
Potenziale illimitato di proliferazione	P53 mutata	• antigene tumorale
	TERT	• antigene tumorale
Angiogenesi	COX2	• promuove le risposte Th2 • inibisce la citotossicità
	VEGF	• inibisce l'attivazione delle cellule T • inibisce l'attivazione di NF-κB nelle DCs
Metastasi	ridotta espressione di NECL2	• inibisce la citotossicità NK • inibisce la produzione di IFN-γ
	alterato traffico lisosomiale	• aumenta l'immunogenicità
	MMPs	• induce rottura del CD25 • attiva il TGF-β

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

4.1 Acquisizione dell'autonomia moltiplicativa

Come è noto la proliferazione cellulare richiede la stimolazione da parte di fattori di crescita solubili mitogeni prodotti da uno o diversi tipi cellulari (un processo conosciuto come heterotypic signalling). La maggior parte delle cellule tumorali, al contrario, acquisiscono la capacità di sintetizzare i propri fattori di crescita rendendosi indipendenti dai segnali derivati dal normale microambiente tissutale (stimolazione autocrina). La maggior parte dei meccanismi che portano alla completa autonomia delle cellule tumorali verso i fattori di crescita deriva da alterazioni dei componenti citoplasmatici nel processo di trasduzione del segnale. (24)

Tuttavia, alcuni fattori di crescita prodotti dalle cellule tumorali oltre a fornire segnali stimolatori di crescita possono simultaneamente sovvertire la risposta immune. Per esempio, IL-4 e IL-10 sono fattori di crescita autocrini per il carcinoma tiroideo ma entrambe le citochine possono dirigere la risposta cellulare T dal profilo citochinico Th1 a Th2 portando così all'inattivazione della risposta immunitaria antitumorale che nella maggior parte dei casi implica risposte di tipo Th1. Allo stesso modo, IL-6 che rappresenta uno dei fattori di crescita autocrini solubili più importanti nella patogenesi di numerosi tipi di cancro, mediante aberrante attivazione di STAT-3 favorisce la crescita tumorale attraverso l'inibizione delle risposte infiammatorie. (25)

4.2 Insensibilità ai fattori inibitori di crescita

L'omeostasi cellulare, in un tessuto normale, viene mantenuta da molteplici segnali anti-proliferativi che includono sia inibitori solubili che fattori

presenti nella matrice extracellulare o sulla superficie delle cellule circostanti.

Uno dei maggiori fattori inibitori della crescita cellulare è il TGF- β . Molti tumori utilizzano questa citochina per inattivarne il pathway di segnale, per esempio mediante mutazione o perdita del proprio recettore o dalla mutazione del fattore di trascrizione SMAD4. **(24)**

Inoltre, il TGF- β è uno dei più potenti agenti immunosoppressivi conosciuti. Tra le varie funzioni, inibisce la presentazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche (DCs), l'attività del IFN- γ , riduce la proliferazione delle cellule T, sopprime l'attività citotossica delle cellule NK (NKs). Oltre a ciò, recenti risultati indicano che uno specifico subset di DCs associate al tumore è in grado di stimolare la proliferazione delle cellule T regolatorie. **(25)**

4.3 Evasione dall'apoptosi

La morte cellulare programmata viene attuata dalla cellula in condizioni fisiologiche per controbilanciare gli effetti dell'eccessiva proliferazione cellulare. **(23)**

Un'importante caratteristica della maggior parte dei tumori è l'evasione dall'apoptosi. La resistenza all'apoptosi può essere acquisita attraverso una serie di strategie. La più comune di queste (circa il 50% dei tumori) è l'inattivazione della proteina p53. **(24)**

È stato riportato che pazienti con il cancro hanno CTLs del sangue periferico che riconoscono peptidi derivati dalle proteine anti-apoptotiche appartenenti alla famiglia di BCL-2, che includono BCL-2, BCL-X_L e MCL1. Altri importanti inibitori, non appartenenti alla famiglia di BCL-2, sono stati recentemente identificati. Tra questi, la survivina, un importante

antigene tumorale, potrebbe indurre up-regolazione dell'espressione del ligando del CD95. L'espressione del CD95L sulle cellule tumorali potrebbe così contribuire alla delezione di cellule T attivate esprimenti il CD95 che invadono il sito del tumore. (25)

4.4 Potenziale illimitato di proliferazione

È noto da molto tempo che le cellule tumorali presentano in coltura un comportamento diverso da quelle normali. Una cellula tumorale presenta, infatti, una indefinita capacità di replicarsi (immortalizzazione). Ciò dipende o dalla perdita dell'espressione delle proteine che inducono senescenza (es. p53) o dalla up-regolazione del gene che codifica per l'enzima telomerasi per cui i telomeri, che vengono perduti ad ogni divisione mitotica, vengono continuamente risintetizzati. (24)

4.5 Angiogenesi e metastasi

L'ossigeno e i nutrienti che vengono forniti dalle cellule attraverso la circolazione sono cruciali per le funzioni e per la sopravvivenza della cellula obbligando virtualmente tutte le cellule a risiedere nel tessuto entro i 100µm di un vaso sanguigno.

Tuttavia, una volta superato il diametro di 1mm la massa neoplastica non può più ricevere in quantità sufficiente i nutrienti e l'ossigeno. Le cellule neoplastiche sintetizzano e rilasciano fattori angiogenetici che portano alla formazione di un letto vascolare proprio attraverso cui circolano le sostanze nutritive. (23)

Un'ulteriore caratteristica delle cellule tumorali è la loro capacità di invadere e colonizzare i tessuti vicini. In questo processo sono coinvolte numerose classi di proteine tra cui le integrine, le molecole di adesione cellula-cellula e diverse proteasi extra-cellulari. (24)

5. IMMUNOSORVEGLIANZA

Introduzione

Il processo di trasformazione maligna sviluppa da un processo dinamico attraverso cui le cellule, caratterizzate dalla elevata frequenza di mutazioni, riescono ad evadere i meccanismi (intrinseci ed estrinseci) che normalmente limitano l'espansione incontrollata di tali cellule.

I numerosi meccanismi **intrinseci** di soppressione della crescita tumorale includono l'apoptosi, il riparo e la senescenza cellulare. Il maggior processo di morte cellulare, dipendente dai mitocondri, è sensibile ai segnali dei fattori di sopravvivenza, di danno o di stress e culmina con l'attivazione delle caspasi. Al contrario, una seconda via di morte cellulare è attivata dai recettori di morte espressi sulla membrana cellulare, come il recettore per il TNF, Fas/CD95, e TRAIL-2, DR-5. Inoltre, anche proteine cellulari (p53, oncogeni) sono importanti nel rilevare perturbazioni causate da danni potenzialmente mutagenici, funzionando quindi come veri e propri soppressori tumorali intrinseci.

Dall'altro lato, sono stati identificati almeno tre meccanismi **estrinseci** attraverso cui le cellule ed i tessuti adiacenti rilevano la presenza di cellule maligne. Un primo meccanismo dipendente da specifici segnali trofici nel microambiente cellulare si basa sulla capacità delle cellule di ostacolare l'innata tendenza al suicidio; un secondo sembra dipendere da link tra i geni

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

che controllano le giunzioni cellulari e la proliferazione; il terzo comporta il riconoscimento e l'eliminazione, attraverso meccanismi estremamente diversi, delle cellule trasformate da parte di leucociti del sistema immune (**immunosorveglianza**). (26, 27)

Immunosorveglianza

Sebbene i tumori derivino da tessuti autologhi, il processo di trasformazione maligna può accompagnarsi all'espressione di molecole riconosciute come estranee dal sistema immune. Questo avviene a causa dell'elevata frequenza di mutazioni che caratterizza le cellule neoplastiche, o a causa dell'espressione deregolata di geni normali. Queste molecole, chiamate antigeni tumore associati (TAA), possono indurre una risposta immune diretta verso le cellule tumorali che le esprimono. In effetti, molte osservazioni cliniche e sperimentali suggeriscono che i tumori possono stimolare la risposta immune dell'ospite. La frequente osservazione istologica della presenza, all'interno o alla periferia della massa tumorale, di infiltrati di cellule T, NK, macrofagi, suggerisce che i tumori possano essere effettivamente immunogenici. Il frequente riscontro di una proliferazione linfocitaria (iperplasia) a livello dei linfonodi drenanti la neoplasia così come l'aumentata espressione di MHC-II e di ICAM-1 (manifestazioni ascrivibili all'azione delle citochine) costituiscono un segno della capacità dei tumori di stimolare la risposta immune. (1)

La reazione immune ed infiammatoria che ne deriva è tuttavia generalmente debole ed inefficace.

Se le cellule tumorali esprimono spesso molecole che le rendono immunogeniche per l'ospite, è possibile che una funzione del sistema

immune possa essere quella di riconoscere (attraverso specifiche strutture sulla superficie delle cellule tumorali stesse o da molecole solubili rilasciate nel microambiente tumorale) i precursori del cancro e, nella maggior parte dei casi, distruggere questi precursori prima che diventino clinicamente visibili. Questa ipotetica funzione svolta dal sistema immune viene definita come **immunosorveglianza**.

Il concetto di **immunosorveglianza**, proposto molti anni fa da Paul Ehrlich (1909), è stato direttamente dimostrato solo con lo sviluppo di ceppi di topi knockout.

È ben noto, infatti, che animali che mancano dei componenti essenziali del sistema immune innato o adattativo come gli enzimi della ricombinazione RAG-2 che portano alla completa assenza di cellule T, B e NKT, il TCR- γ con assenza delle cellule T $\gamma\delta^+$, sono più suscettibili allo sviluppo di tumori sia spontanei che indotti chimicamente. (25, 27)

Nonostante siano stati compiuti, nel corso degli ultimi anni, numerosi progressi per la comprensione dei complessi meccanismi, cellulari e molecolari, di regolazione della risposta immune nel microambiente tumorale, la capacità di sviluppare nuove ed efficaci strategie di immunoterapia tumorale viene impedita da meccanismi diversi di soppressione della risposta immune.

Nonostante ci siano forti evidenze che supportano l'esistenza del processo della sorveglianza immunologica, gli individui immunocompetenti possono sviluppare ancora il cancro sia per la capacità del tumore di generare un microambiente tollerante con conseguente incapacità del sistema immune innato e acquisito di eradicare le cellule trasformate sia per lo sviluppo di distinti meccanismi di evasione del sistema immune. (25)

The diagram illustrates the three outcomes of cancer immunosurveillance: Elimination, Equilibrium, and Escape.

Transformed Cell: A cell with tumor antigens, MICA/B (human), and UBP (mouse). It is associated with "Danger": uric acid, ECM products. Factors like p53, Rb, and Ras are shown as being downregulated (e.g., ↓ p53, ↓ Rb, ↑ Ras).

Normal Cell: A cell with tumor antigens, MICA/B (human), and UBP (mouse). It is associated with "Repair/senescence/apoptosis; Intrinsic tumor suppression".

Factors influencing the transition: Carcinogens, Radiation, Chronic inflammation, Inherited, and Viruses.

Elimination (cancer immunosurveillance): A cell undergoing elimination, showing "Innate and adaptive immunity" (CD4, CD8, Treg, Th1, Th2, Th17, Th22, Th23, Th24, Th25, Th26, Th27, Th28, Th29, Th30, Th31, Th32, Th33, Th34, Th35, Th36, Th37, Th38, Th39, Th40, Th41, Th42, Th43, Th44, Th45, Th46, Th47, Th48, Th49, Th50, Th51, Th52, Th53, Th54, Th55, Th56, Th57, Th58, Th59, Th60, Th61, Th62, Th63, Th64, Th65, Th66, Th67, Th68, Th69, Th70, Th71, Th72, Th73, Th74, Th75, Th76, Th77, Th78, Th79, Th80, Th81, Th82, Th83, Th84, Th85, Th86, Th87, Th88, Th89, Th90, Th91, Th92, Th93, Th94, Th95, Th96, Th97, Th98, Th99, Th100, Th101, Th102, Th103, Th104, Th105, Th106, Th107, Th108, Th109, Th110, Th111, Th112, Th113, Th114, Th115, Th116, Th117, Th118, Th119, Th120, Th121, Th122, Th123, Th124, Th125, Th126, Th127, Th128, Th129, Th130, Th131, Th132, Th133, Th134, Th135, Th136, Th137, Th138, Th139, Th140, Th141, Th142, Th143, Th144, Th145, Th146, Th147, Th148, Th149, Th150, Th151, Th152, Th153, Th154, Th155, Th156, Th157, Th158, Th159, Th160, Th161, Th162, Th163, Th164, Th165, Th166, Th167, Th168, Th169, Th170, Th171, Th172, Th173, Th174, Th175, Th176, Th177, Th178, Th179, Th180, Th181, Th182, Th183, Th184, Th185, Th186, Th187, Th188, Th189, Th190, Th191, Th192, Th193, Th194, Th195, Th196, Th197, Th198, Th199, Th200, Th201, Th202, Th203, Th204, Th205, Th206, Th207, Th208, Th209, Th210, Th211, Th212, Th213, Th214, Th215, Th216, Th217, Th218, Th219, Th220, Th221, Th222, Th223, Th224, Th225, Th226, Th227, Th228, Th229, Th230, Th231, Th232, Th233, Th234, Th235, Th236, Th237, Th238, Th239, Th240, Th241, Th242, Th243, Th244, Th245, Th246, Th247, Th248, Th249, Th250, Th251, Th252, Th253, Th254, Th255, Th256, Th257, Th258, Th259, Th260, Th261, Th262, Th263, Th264, Th265, Th266, Th267, Th268, Th269, Th270, Th271, Th272, Th273, Th274, Th275, Th276, Th277, Th278, Th279, Th280, Th281, Th282, Th283, Th284, Th285, Th286, Th287, Th288, Th289, Th290, Th291, Th292, Th293, Th294, Th295, Th296, Th297, Th298, Th299, Th300, Th301, Th302, Th303, Th304, Th305, Th306, Th307, Th308, Th309, Th310, Th311, Th312, Th313, Th314, Th315, Th316, Th317, Th318, Th319, Th320, Th321, Th322, Th323, Th324, Th325, Th326, Th327, Th328, Th329, Th330, Th331, Th332, Th333, Th334, Th335, Th336, Th337, Th338, Th339, Th340, Th341, Th342, Th343, Th344, Th345, Th346, Th347, Th348, Th349, Th350, Th351, Th352, Th353, Th354, Th355, Th356, Th357, Th358, Th359, Th360, Th361, Th362, Th363, Th364, Th365, Th366, Th367, Th368, Th369, Th370, Th371, Th372, Th373, Th374, Th375, Th376, Th377, Th378, Th379, Th380, Th381, Th382, Th383, Th384, Th385, Th386, Th387, Th388, Th389, Th390, Th391, Th392, Th393, Th394, Th395, Th396, Th397, Th398, Th399, Th400, Th401, Th402, Th403, Th404, Th405, Th406, Th407, Th408, Th409, Th410, Th411, Th412, Th413, Th414, Th415, Th416, Th417, Th418, Th419, Th420, Th421, Th422, Th423, Th424, Th425, Th426, Th427, Th428, Th429, Th430, Th431, Th432, Th433, Th434, Th435, Th436, Th437, Th438, Th439, Th440, Th441, Th442, Th443, Th444, Th445, Th446, Th447, Th448, Th449, Th450, Th451, Th452, Th453, Th454, Th455, Th456, Th457, Th458, Th459, Th460, Th461, Th462, Th463, Th464, Th465, Th466, Th467, Th468, Th469, Th470, Th471, Th472, Th473, Th474, Th475, Th476, Th477, Th478, Th479, Th480, Th481, Th482, Th483, Th484, Th485, Th486, Th487, Th488, Th489, Th490, Th491, Th492, Th493, Th494, Th495, Th496, Th497, Th498, Th499, Th500, Th501, Th502, Th503, Th504, Th505, Th506, Th507, Th508, Th509, Th510, Th511, Th512, Th513, Th514, Th515, Th516, Th517, Th518, Th519, Th520, Th521, Th522, Th523, Th524, Th525, Th526, Th527, Th528, Th529, Th530, Th531, Th532, Th533, Th534, Th535, Th536, Th537, Th538, Th539, Th540, Th541, Th542, Th543, Th544, Th545, Th546, Th547, Th548, Th549, Th550, Th551, Th552, Th553, Th554, Th555, Th556, Th557, Th558, Th559, Th560, Th561, Th562, Th563, Th564, Th565, Th566, Th567, Th568, Th569, Th570, Th571, Th572, Th573, Th574, Th575, Th576, Th577, Th578, Th579, Th580, Th581, Th582, Th583, Th584, Th585, Th586, Th587, Th588, Th589, Th590, Th591, Th592, Th593, Th594, Th595, Th596, Th597, Th598, Th599, Th600, Th601, Th602, Th603, Th604, Th605, Th606, Th607, Th608, Th609, Th610, Th611, Th612, Th613, Th614, Th615, Th616, Th617, Th618, Th619, Th620, Th621, Th622, Th623, Th624, Th625, Th626, Th627, Th628, Th629, Th630, Th631, Th632, Th633, Th634, Th635, Th636, Th637, Th638, Th639, Th640, Th641, Th642, Th643, Th644, Th645, Th646, Th647, Th648, Th649, Th650, Th651, Th652, Th653, Th654, Th655, Th656, Th657, Th658, Th659, Th660, Th661, Th662, Th663, Th664, Th665, Th666, Th667, Th668, Th669, Th670, Th671, Th672, Th673, Th674, Th675, Th676, Th677, Th678, Th679, Th680, Th681, Th682, Th683, Th684, Th685, Th686, Th687, Th688, Th689, Th690, Th691, Th692, Th693, Th694, Th695, Th696, Th697, Th698, Th699, Th700, Th701, Th702, Th703, Th704, Th705, Th706, Th707, Th708, Th709, Th710, Th711, Th712, Th713, Th714, Th715, Th716, Th717, Th718, Th719, Th720, Th721, Th722, Th723, Th724, Th725, Th726, Th727, Th728, Th729, Th730, Th731, Th732, Th733, Th734, Th735, Th736, Th737, Th738, Th739, Th740, Th741, Th742, Th743, Th744, Th745, Th746, Th747, Th748, Th749, Th750, Th751, Th752, Th753, Th754, Th755, Th756, Th757, Th758, Th759, Th760, Th761, Th762, Th763, Th764, Th765, Th766, Th767, Th768, Th769, Th770, Th771, Th772, Th773, Th774, Th775, Th776, Th777, Th778, Th779, Th780, Th781, Th782, Th783, Th784, Th785, Th786, Th787, Th788, Th789, Th790, Th791, Th792,

Adv Immunol. 2006;90:1-50.

5.1 Eliminazione del tumore

La fase dell'eliminazione che include l'originale concetto di immunosorveglianza comprende i meccanismi effettori sia della risposta innata che adattativa.

È stato proposto che l'inizio della risposta anti-tumorale avvenga nel momento in cui le cellule del sistema immune innato vengono “avvertite” dalla presenza dello sviluppo del tumore derivante dalla distruzione locale dei tessuti in conseguenza del processo di angiogenesi o di invasione tissutale.

I cambiamenti strutturali dello stroma indotti durante questi processi possono produrre molecole pro-infiammatorie che, in associazione alle chemochine spesso prodotte dalle cellule tumorali stesse, richiamano cellule del sistema immune innato nel sito di infiammazione.

È possibile che, consistente con il “danger model” postulato da Matzinger, le cellule dendritiche rappresentino le cellule sentinella nella segnalazione dei segnali di stress, danno e/o di trasformazione cellulare. Inoltre, gli stessi segnali di “pericolo” possono essere rappresentati da proteine di shock termico (HSPs) (rilasciate come risultato di necrosi), da fattori pro-infiammatori (incluse citochine rilasciate da cellule tumorali apoptotiche o da cellule del sistema immune innato). Alcune di queste citochine (IL-1, TNF- α , IFN-I, GM-CSF, IL-15) possono anche promuovere la differenziazione e le funzioni delle DC aumentando il cross-talk tra DC e NK e, successivamente, DC e cellule T.

L'insieme delle cellule del sistema immune innato (NK, NKT, macrofagi e linfociti T $\gamma\delta^+$) che vengono richiamate nel sito di danno possono riconoscere molecole, come ligandi per NKG2D, che vengono indotte sulle

cellule tumorali o dalla trasformazione cellulare stessa o dall'infiammazione. Ulteriormente, le cellule T e le NKT, possono essere in grado di riconoscere il tumore in via di sviluppo attraverso l'interazione tra il TCR e complessi peptide tumorale/MHC o tra glicolipidi e complessi CD1 sulle cellule tumorali stesse. Queste cellule effettrici possono poi liberare molecole citotossiche allo scopo di eliminare le cellule trasformate e secernere IFN che attraverso meccanismi diretti o indiretti controllano la crescita tumorale e amplificano le risposte immuni.

In una fase successiva, gli antigeni tumorali liberati da diversi meccanismi di morte cellulare attivano le risposte immuni adattative specifiche per il tumore. Le DC attivate o dall'ambiente citochinico o dopo interazione con le cellule NKT possono acquisire gli antigeni tumorali o direttamente attraverso la fagocitosi di corpi apoptotici di cellule tumorali o attraverso meccanismi indiretti che coinvolgono il trasferimento degli antigeni tumorali. Le DC acquisendo così un fenotipo maturo e altamente attivato possono migrare, in risposta a citochine e/o chemochine, ai linfonodi dove attivano linfociti T $CD4^+$ Th1 specifiche per il tumore. Queste ultime facilitano lo sviluppo dei linfociti T $CD8^+$ CTL attraverso la cross-presentazione dei peptidi tumorali con le molecole di MHC I sulle DC.

Nell'ultima fase, lo sviluppo dell'immunità adattativa determina la totale capacità dell'organismo di eliminare completamente il tumore. Infatti, i $CD4^+$ e i $CD8^+$ migrano al sito tumorale dove partecipano all'eliminazione delle cellule tumorali.

Le $CD4^+$ attraverso la produzione dell'IL-2 e insieme alla IL-15 prodotta dall'organismo mantengono la sopravvivenza e la funzione delle $CD8^+$.

Queste ultime riconoscono efficacemente i loro target e determineranno la morte cellulare attraverso meccanismi diretti o indiretti che vengono attivati da IFN- γ . (27) (Fig. 2)

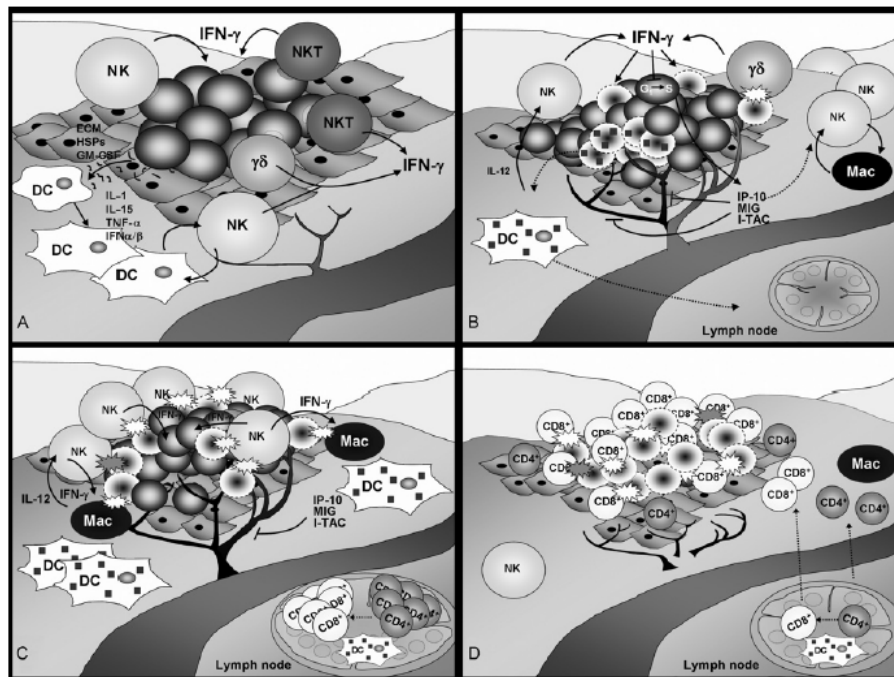


Fig. 2 Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity.

Adv Immunol. 2006;90:1-50.

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

5.2 Cellule coinvolte nell'immunità al tumore

Gli antigeni tumorali evocano *in vivo* sia risposte umorali che cellulari. *In vitro* molti meccanismi effettori immunologici sono in grado di uccidere le cellule tumorali, ma resta ancora da stabilire quali di questi meccanismi siano realmente importanti nell'indurre *in vivo* risposte immuni protettive nei confronti dei tumori spontanei e come potenziarli in modo il più possibile specifico per il tumore.

Componenti cellulari sia del sistema immune innato che adattativo sono coinvolti nell'immunità tumorale. (27, 28)

5.2.1 Cellule T

Esperimenti effettuati in modelli murini hanno dimostrato che l'assenza di RAG-2 (o RAG-1), con conseguente incapacità di riarrangiare i geni del TCR e quindi completamente privi sia di linfociti T che di B e di NKT, provoca in circa il 50% di questi animali lo sviluppo di neoplasie intestinali già all'età di 18 mesi di vita. Un ampio spettro di malattie, tra cui lo sviluppo dell'adenocarcinoma mammario o al colon, è stato anche osservato in topi RAG-2^{-/-} x STAT1^{-/-}. In conclusione, i linfociti svolgono un ruolo importante nella protezione dai tumori sia indotti chimicamente che spontanei. (28, 29)

5.2.2 Cellule NK e linfociti T $\gamma\delta^+$

Le natural killer (NK) sono cellule specializzate nella distinzione tra cellule sane e normali da quelle anormali come cellule infettate dai virus o cellule

tumoriali trasformate. A differenza dei CTL, le NK per il riconoscimento di cellule target, non vanno incontro a maturazione timica, non presentano riarrangiamento del TCR e sembra che vengano attivamente inibite da recettori che riconoscono molecole MHC I. In generale, le cellule normali che esprimono elevati livelli di molecole MHC I sono generalmente protette dalla lisi, mentre cellule tumorali o infettate da virus possono esprimere ridotti livelli di MHC I divenendo così suscettibili all'attacco mediato dalle NK.

Le funzioni effettrici delle cellule NK includono la citotossicità e la capacità di produrre una varietà di citochine infiammatorie in seguito ad attivazione. L'esocitosi dei granuli è il maggior meccanismo di uccisione mediato da queste cellule, tuttavia esprimono anche membri della famiglia del TNF.

Il ruolo delle NK, così come dei linfociti T $\gamma\delta^+$, nella sorveglianza ai tumori rimane controverso. Entrambe le popolazioni cellulari esprimono la perforina, mediano la citotossicità, e, dopo riconoscimento delle cellule target, producono molte citochine anti-tumoriali come IFN- γ . Topi privi sia della perforina che della $\beta 2m$ sviluppano spontaneamente il linfoma a cellule B che, quando trapiantato in topi *wild type* singenici, può esser rigettato dalle NK o dai linfociti T $\gamma\delta^+$.

Altre cellule coinvolte

Altre popolazioni di cellule possono esser coinvolte nelle risposte immuni ai tumori.

Queste includono i neutrofili, gli eosinofili, le cellule NKT, le cellule Treg e le cellule dendritiche. (27, 28)

6. TOLLERANZA INDOTTA DALLE CELLULE TUMORALI (meccanismi pre-esistenti)

Un importante cambiamento nel campo dell'immunologia tumorale avvenne nei primi anni del 1990. Sorprendenti esperimenti, infatti, evidenziarono come la maggior parte degli antigeni espressi dalle cellule tumorali non erano necessariamente neo-antigeni presenti unicamente su quelle cellule ma piuttosto antigeni di differenziazione tissutale espressi anche su cellule normali. Queste importanti ma inaspettate scoperte hanno portato ad ipotizzare l'esistenza *in vivo* di complessi meccanismi di tolleranza dei linfociti T contro gli antigeni tumorali *self*.

La maggior parte delle attuali conoscenze del riconoscimento di antigeni tumorali da parte delle cellule T CD4⁺ derivano dall'analisi *in vivo* del destino e della funzione di cellule T transgeniche specifiche per un particolare antigene tumorale. Questo sistema che prevede il trasferimento adottivo di cellule T CD4⁺ naïve specifiche per l'emoagglutinina (HA) in topi con linfoma esprimenti HA come antigene tumorale determina ridotta risposta di queste cellule dopo stimolazione *in vitro* e mancanza di attivazione dopo vaccinazione *in vivo* con un potente immunogeno. Quindi, il riconoscimento dell'antigene tumorale da cellule T antigene specifiche determina come conseguenza di tale incontro uno stato di anergia.

Le stesse conclusioni sono state estese anche a cellule T CD8⁺.

Comunque, una dettagliata analisi di queste popolazioni ha rivelato in modo sorprendente come la maggior parte del pool delle cellule T antigene specifiche rimane naïve o ignorante al tumore, mentre solo una minoranza è resa funzionalmente anergica.

Ciò che rimane ancora poco chiaro è, tuttavia, capire se questo stato di non risposta delle cellule T sia dovuto al tumore stesso o, specificatamente, da cellule presentanti l'antigene (APC). Le DC, i macrofagi, e le cellule B sono cellule derivate dal midollo osseo che possono potenzialmente tutte presentare gli antigeni tumorali alle cellule T. In particolare, le DC giocano un ruolo importante e decisivo nel determinare attivazione o tolleranza verso gli antigeni tumorali. Tale decisione viene influenzata dall'ambiente in cui le DC incontrano l'antigene: l'assenza di mediatori infiammatori piuttosto che determinare attivazione dei linfociti T conduce sfortunatamente a tolleranza. In aggiunta, con il progredire del tumore, il microambiente non solo si impoverisce di segnali infiammatori necessari per la piena e funzionale attivazione delle DC ma si arricchisce di ulteriori fattori immunosoppressivi (IL-10 e VEGF) che influenzano negativamente la maturazione e le funzioni delle DC.

Sebbene i meccanismi molecolari che determinano attivazione o tolleranza non sono noti, solo recentemente numerose evidenze hanno evidenziato in STAT3 giocare un critico ruolo in questo processo. STAT3 rappresenta quindi un nuovo target molecolare per la manipolazione della tolleranza o dell'attivazione immune con profonde implicazioni per l'immunoterapia tumorale. (30)

6.1 Fase di equilibrio

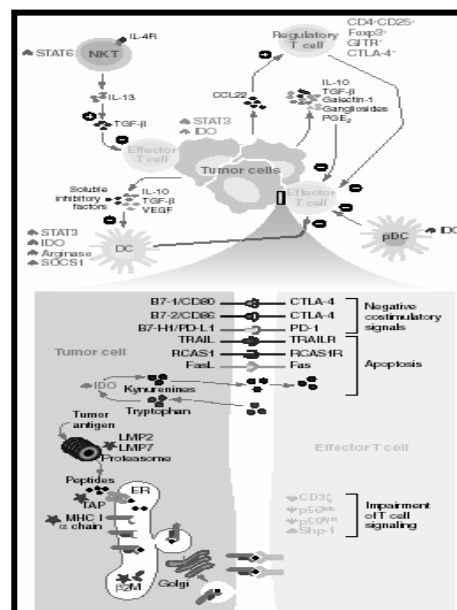
Sebbene la fase dell'eliminazione del processo dell'immunoediting possa eradicare una significativa percentuale di cellule trasformate, esiste un periodo di latenza in cui il sistema immune dell'organismo e le cellule tumorali che non sono state eliminate dai meccanismi effettori del sistema

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

immune entrano in un equilibrio dinamico. Sebbene molte cellule tumorali vengano distrutte, in questa fase vengono generate attraverso centinaia di mutazioni nuove varianti che determinano resistenza dall'attacco del sistema immune. Tra queste l'instabilità genomica sembra essere il meccanismo predominante nella generazione di nuove varianti tumorali con ridotta immunogenicità. (27)

6.2 Fase di evasione

Le cellule tumorali presentano molti meccanismi immunosoppressivi di evasione delle risposte immuni che includono alterazioni nei componenti del macchinario per la presentazione antigenica, difetti nel processo di trasduzione del segnale, secrezione di fattori immunosoppressivi e/o proapoptotici, ed il richiamo di popolazioni con funzione regolatoria. (Fig. 3) Tutti questi meccanismi possono cooperare durante la progressione del tumore allo scopo di limitare la capacità del sistema immune di controllarne la crescita.



“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

Fig. 3 Gabriel A. Rabinovich, Dmitry Gabrilovich, and Eduardo M. Sotomayor. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Ann Rev. Immunol.* 2007. 25: 267-96.

6.2.1 Difetti nella presentazione antigenica

Uno dei meccanismi meglio studiati usati dalle cellule per evitare il riconoscimento da parte dei linfociti T è costituito da difetti nel macchinario di presentazione dell'antigene.

La continua generazione di varianti tumorali, conseguenza dell'elevata frequenza di mutazioni o di delezioni geniche, determina l'evasione di queste cellule dalla distruzione mediata dai CTL. Il meccanismo immunosoppressivo più frequente determina ridotta espressione delle molecole MHC I. La perdita di queste molecole è un difetto frequentemente osservato in molti tipi di cancro. Sebbene non chiari, numerosi studi suggeriscono che diversi meccanismi siano responsabili della downregolazione: l'inattivazione del gene per la β 2-microglobulina, o la downregolazione di LMP-2.

In aggiunta alla perdita basale dell'espressione di MHC I, recenti ricerche hanno dimostrato correlazione tra ridotta espressione di MHC I e IFN- γ . Per esempio, è stato recentemente visto in una linea tumorale la assenza di TAP1 e LMP2 come risultato di un difetto nella via di trasduzione del segnale mediato da IFN.

È stato osservato nel linfoma delle cellule B, associato a ridotta espressione di MHC I e MHC II, la massiccia infiltrazione di cellule T citotossiche; al contrario, solo poche cellule T sono state trovate nelle lesioni che mantengono l'espressione di tali molecole. La perdita di espressione di

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

MHC I, nei tumori umani, viene tuttavia associata con la generazione di tumori con ridotta aggressività. Questi risultati, danno evidenza che il sistema immune adattativo può modificare il fenotipo del tumore e causare l'insorgenza di tumori che sono andati incontro a perdita di molecole riconosciute dal sistema immune.

6.2.2 Difetti nel signaling

Nei pazienti con tumori in stato avanzato nei linfociti infiltranti il tumore si nota una diminuzione marcata nell'espressione di proteine che portano all'attivazione dei linfociti T: la catena ζ del CD3 e le chinasi tirosiniche p56lck e p59fyn.

Recentemente Koneru ha dimostrato che difetti nel signaling del TCR inibiscono le funzioni litiche dei CTL e inattivano la fase effettrice della risposta antitumorale.

6.2.3 Secrezione di fattori immunosoppressivi

Le cellule tumorali stesse o le cellule stromali esibiscono effetti soppressivi sul sistema immune sintetizzando diversi agenti biologicamente attivi (incluse le citochine e i fattori di crescita). In particolare, il TGF- β è una citochina immunosoppressiva pleiotropica che inibisce l'attivazione dei linfociti T, la proliferazione e la differenziazione. I primi studi hanno dimostrato che la transfezione del DNA del TGF- β_1 in tumori altamente immunogenici promuove l'evasione dai meccanismi effettori della risposta immune. Solo recentemente, Thomas e Massague hanno dimostrato il meccanismo di azione di questa citochina che agirebbe in modo specifico

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

sui CTL reprimendo l'espressione di diversi geni, tra cui la perforina, il granzima A e B, il ligando di FAS (FasL) e IFN γ , tutti responsabili della citotossicità tumorale mediata dai CTL.

Oltre al TGF- β , altri agenti sono presenti nel microambiente tumorale ed inibiscono le funzioni immuni. Tra questi, IL-10 e la prostaglandina E₂ (PGE₂).

6.2.4 Vie di regolazione negativa

Uno dei più studiati segnali di regolazione negativa è il CTLA-4 ma attualmente è stato individuato un altro meccanismo di evasione della risposta antitumorale che coinvolge le interazioni tra PD-1 e PD-L1.

PD-1 è un recettore transmembrana di tipo I di 55 kDa che lega il PD-L1 (anche conosciuto come B7-H1) e PD-L2 (anche chiamato B7-DC).

La conseguenza di tale interazione porta all'inibizione dell'attivazione delle cellule T.

PD-L1 è espresso da diversi tipi di tumori e promuove l'apoptosi dei CTL. Inoltre, il blocco dell'interazione tra PD-1- PD-L1 ha effetti negativi anche sull'attività delle DC *in vivo*.

In tal modo, le terapie volte a bloccare le interazioni tra PD-1- e PD-L1 potrebbero rappresentare un'utile strategia per potenziare le risposte immuni antitumorali.

6.2.5 Modulazione del catabolismo del triptofano

Un ulteriore meccanismo che può contribuire alla generazione di tolleranza verso il tumore comporta l'enzima IDO. Questo è un enzima contenente

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

eme che catalizza la degradazione del triptofano ed è espresso da differenti tipi di tumore. Numerosi esperimenti hanno evidenziato che tumori che over esprimono questo enzima sono più aggressivi; questo effetto è correlato con un ridotto numero di linfociti T nel sito del tumore.

Sebbene il preciso meccanismo che regola l'espressione di IDO rimane ancora da essere investigato, Muller ha recentemente mostrato che IDO è sotto il controllo genico del gene *Bin1*, che è attenuato in molti tumori umani. (31)

7. CELLULE T REGOLATORIE E IMMUNITA' TUMORALE

Sebbene le Treg siano state ampiamente studiate in modelli tumorali murini, nell'uomo il ruolo di queste cellule nell'immunità tumorale è poco studiata. Le cellule T regolatorie $CD4^+CD25^+$ hanno un ruolo cruciale nel mantenimento della tolleranza verso gli antigeni *self* e nel controllo dei disordini autoimmuni. (32, 33)

Questa popolazione cellulare è anche coinvolta nella regolazione dell'omeostasi (34, 35) dei linfociti T e nella modulazione delle risposte immuni ad alloantigeni e patogeni. (36)

Queste scoperte hanno aperto nuove prospettive per gli interventi di immunoterapia in numerose malattie. Per esempio, è stato dimostrato che il trasferimento delle Treg può controllare il diabete autoimmune (37, 38) e il rigetto dei trapianti. (39, 40)

È stato suggerito, inoltre, che le cellule Treg possano anche contribuire alla tolleranza verso i tumori (32, 41). Poiché la maggior parte degli antigeni tumorali sono antigeni *self*, è stato proposto che lo stabilirsi della tolleranza immune dovuta alla popolazione di linfociti T ad azione regolatoria possa

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti $CD4^+$ T helper”

representare un potenziale meccanismo attraverso cui le cellule tumorali riescono ad evadere sia il riconoscimento che la loro distruzione da parte delle cellule effettrici.

È stato proposto che una miglior risposta alla immunoterapia tumorale possa derivare proprio dalla deplezione terapeutica di queste cellule e recenti evidenze supportano tale ipotesi. (42, 43)

Nei tumori dell'uomo le Treg si accumulano nei linfonodi drenanti il tumore (DLN_S) e nel circolo sanguigno. Osservazioni simili sono state anche fatte in modelli tumorali sia nel topo che nel ratto. Tuttavia, i meccanismi che portano al loro accumulo negli organi linfoidi rimangono poco chiari.

Laurence Zitvogel nel suo lavoro ha proposto l'esistenza di una correlazione tra la progressione del tumore e la soppressione immune. I suoi esperimenti indicano che l'accumulo delle cellule T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ deriva dalla proliferazione locale di cellule Treg pre-esistenti ed il fattore di costimolazione che ne guida la proliferazione è il TGF-β.

Le cellule tumorali producono dei fattori solubili che stimolano le cellule dendritiche locali con fenotipo immaturo mieloide (IMDCs; CD11c⁺/I-Ab⁺), che si accumulano durante la progressione del tumore nei linfonodi drenanti, a produrre il TGF-β. Questo subset di DC promuove in modo selettivo la proliferazione, dipendente dal TGF-β, delle Treg sia nel topo che nel ratto. (44)

Le cellule Treg sono state ampiamente studiate nei tumori umani dell'ovaio. Sono state messe a punto molte strategie terapeutiche per aumentare l'immunità tumorale che funzionano inibendo il traffico, il differenziamento e la funzione di queste cellule.

Sono stati pubblicati due trials clinici in cui pazienti con tumore ad uno stato avanzato sono stati trattati con anticorpi specifici per il CTLA-4. Anche se il

trattamento con questo anticorpo non è stato mostrato indurre la deplezione delle Treg o delle cellule CTLA-4⁺ periferiche, nei pazienti trattati in tal modo si ha la riduzione drastica del tumore.

Allo stesso modo, il trattamento con anticorpi per il CD25 ha promosso, in vari ceppi di topi, il rigetto di diverse linee tumorali come il melanoma, il fibrosarcoma, la leucemia e il mieloma. Il trattamento dei topi con anticorpi anti-CD25 può non rappresentare comunque la via ottimale per indurre l'immunità contro il tumore.

Infatti il CD25 non è il marcatore delle sole cellule Treg, quindi c'è il rischio di indurre una deplezione non solo delle cellule regolatorie, ma anche di alcune cellule effettrici che possono essere coinvolte nel rigetto dei tumori. **(45)**

Lo sviluppo di strategie antitumorali efficaci si fonda sulla combinazione dell'immunoterapia tradizionale con le odierne terapie, basate sul blocco delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg e sull'individuazione di molecole che partecipano alla soppressione dei linfociti T come ad esempio: B7, CTLA-4, IDO (indoleamina 2,3 dioxigenasi), TGF-β e IL-10. **(45)**

8. CHEMIOTERAPICI

La chemioterapia è una terapia effettuata con farmaci prodotti per sintesi chimica. Il termine chemioterapia è associato all'uso di agenti chimici (naturali e sintetici) impiegati per inibire la crescita di cellule neoplastiche. I chemioterapici vengono classificati in categorie che si differenziano per la modalità di azione. Si distinguono farmaci citotossici i quali si suddividono in agenti alchilanti, che hanno azione diretta sul DNA e agenti antimetaboliti, che interagiscono con la via biosintetica dei precursori del DNA e dell' RNA. Inoltre si hanno ormoni e antiormoni che vengono usati per una terapia endocrina e antimitotici.

8.1 Ciclofosfamide

La ciclofosfamide (CTX) è un tipico agente chemioterapico che ha la capacità di inibire la proliferazione delle cellule tumorali e indurre diversi effetti immunomodulatori. Essa è in uso nella cura di linfomi, di leucemie e in alcune forme di tumori solidi ed in alcune malattie autoimmuni come la SLE (*Systemic lupus erythematosus*).

La principale funzione della CTX e in particolare del metabolita in cui essa viene convertita nel fegato (phosphoramide), è quello di arrestare o ritardare lo sviluppo delle cellule proliferanti intercalandosi nel DNA.

Nonostante il largo uso della CTX come chemioterapico, essa causa numerosi effetti secondari che includono anche la nausea indotta dalla chemioterapia ed il vomito (CINV) e la diminuzione della funzionalità del midollo osseo.

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

Già i primi studi su questo chemioterapico hanno dimostrato che il solo trattamento con la CTX ha un effetto marginale sulla crescita del tumore e che la completa scomparsa della massa neoplastica si assume solo in seguito alla combinazione con l'immunoterapia, ad opera della azione antitumorale di cellule T inoculate. (46)

Il trattamento con CTX e con cellule immunitarie derivate dalla milza ha portato alla cura della maggior parte dei topi portatori di tumori metastatici sub-cutanei o intravenosi.

Il meccanismo attraverso il quale la CTX può sinergicamente agire con l'immunoterapia è ancora oggetto di studio. Finora è stata osservata una efficace risposta antitumorale quando cellule metastatiche sono state inoculate in topi pre-trattati con CTX e linfociti provenienti dalla milza.

Ciò implica che la CTX induce cambiamenti capaci di conferire un'attività anti-tumorale alle cellule immunitarie della milza da topi precedentemente immunizzati con il tumore. Da questo stesso studio è stato osservato che la CTX induce il rilascio di fattori solubili che possono aumentare la proliferazione, la differenziazione e l'attività delle cellule T specifiche contro il tumore. (47)

Da ciò si è dedotto che la CTX facilita l'immunoterapia adottiva.

La CTX è stata usata in molte ricerche come un agente immunomodulatore in modelli murini ed umani di tumore. Molti studi hanno dimostrato che la CTX può aumentare l'efficacia di trattamenti immunoterapici dopo la rimozione di cellule T soppressorie indotte dal tumore.

Recenti studi hanno dimostrato che la CTX porta alla overespressione di alcuni fattori di crescita come GM-CSF, IL-1 β e IL-7, coinvolti nell'ematopoiesi. E' stato dimostrato inoltre che la somministrazione di CTX induce l'espressione di citochine che regolano la proliferazione

cellulare. Infatti, due giorni dopo il trattamento, si osserva una over-espressione delle citochine IL-7, IL-2 e IL-21 nel midollo osseo dei topi trattati e nella milza si è registrato un aumento dell'espressione di IL-7 e IL-15. (48)

Da altri studi infine è stato dimostrato che la CTX può indurre l'espressione di IFN di tipo I il quale rappresenta un importante mediatore degli effetti immunomodulatori del chemioterapico. L'induzione dell' IFN di tipo I da parte della CTX è stato dimostrato non soltanto dalla presenza della citochina biologicamente attiva nel siero dei topi trattati, ma anche da un accumulo progressivo di messaggero di IFN- α e IFN- β nella milza. (49)

9. IMMUNOTERAPIA DEI TUMORI

Sebbene un tumore sia in grado di generare una risposta immunitaria, questa spesso non è sufficiente a prevenire la crescita tumorale.

La terapia dei tumori disseminati che non possono essere operati chirurgicamente si basa attualmente sulla chemioterapia e sulla radioterapia, che hanno spesso effetti collaterali devastanti sui tessuti normali. Dato che la risposta immunitaria è altamente specifica, si è a lungo sperato che l'immunità anti-tumorale potesse essere sfruttata per sradicare selettivamente i tumori senza danneggiare il paziente.

Vari gruppi di ricercatori hanno dimostrato che l'immunità antitumorale può essere potenziata fornendo i segnali costimolatori necessari per l'attivazione dei precursori CTL. Vari studi suggeriscono che cellule tumorali trasfettate con la molecola B7 possano essere utilizzate per indurre una risposta CTL *in vivo*. **(50)**

Un altro possibile approccio, consiste nel potenziare il differenziamento e l'attivazione delle APC, specialmente delle cellule dendritiche.

L'isolamento e la clonazione dei vari geni delle citochine ne hanno facilitato la produzione su larga scala. Questo ha permesso lo sviluppo di numerosi studi clinici e sperimentali basati sull'impiego di citochine ricombinanti per potenziare la risposta immunitaria antitumorale. Tra le citochine studiate per l'immunoterapia dei tumori si possono ricordare IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, GM-CSF e TNF. Sebbene questi studi abbiano dato risultati incoraggianti, rimangono molti ostacoli al loro uso clinico.

Prima di tutto, infatti, alcune citochine hanno un'azione tra loro antagonista. E' possibile quindi che una citochina destinata a potenziare un

compartimento della risposta immunitaria possa in realtà determinare una soppressione. Un'altra grave difficoltà è data dalla necessità di somministrare le citochine in modo loco-regionale; infatti la somministrazione sistemica produce in alcuni casi conseguenze gravi. (51, 52) In molte forme di cancro sono stati sperimentati anticorpi monoclonali rivolti verso vari antigeni tumorali, spesso coniugati a potenti tossine; tali anticorpi si legano al bersaglio cellulare, attivando i meccanismi effettori dell'ospite (quali fagociti o il sistema del complemento), o veicolando le tossine all'interno della cellula neoplastica. Uno di questi anticorpi, diretto contro i prodotti dell'oncogene HER-2/neu (espresso in maniera abnorme in alcune forme di carcinoma mammario), è attualmente utilizzato in queste forme di neoplasia.

Molte strategie innovative di immunoterapia dei tumori si basano sulla stimolazione della risposta immunitaria del paziente nei confronti delle cellule neoplastiche. Ultimamente infatti, grande attenzione è stata dedicata alla possibilità di far crescere cellule dendritiche dal paziente (isolandone i precursori dal sangue periferico ed espandendoli in vitro in presenza di opportuni fattori di crescita), esporle alle cellule tumorali o agli agenti tumorali ed utilizzarle infine come vaccini: la speranza è che le cellule dendritiche possano mimare la normale via di cross-priming, sensibilizzando i CTL nei confronti del tumore. (53, 54, 55)

Un altro approccio si basa sull'utilizzo di plasmidi contenenti cDNA codificanti antigeni tumorali: l'inoculo del plasmide porta all'espressione del cDNA nelle cellule dell'ospite, tra cui le APC che hanno internalizzato il plasmide, che producono così l'antigene tumorale e lo presentano ai linfociti T, inducendo una risposta specifica verso il tumore.

METODI

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

Topi

Topi C57Bl/6 e Balb/c femmine (6-8 settimane) sono stati ottenuti dalla Charles River Breeding Laboratories (Calco, Italia). Topi transgenici per un epitopo di OVA (TCR/EP OVA) DO11.10 (6-8 settimane) sono stati acquistati dalla Jackson Service. Tutti gli animali sono stati allevati presso la stabulario dell'Università di Tor Vergata a Roma e trattati in accordo con le linee guida della Comunità Europea.

Linee cellulari tumorali

La linea cellulare tumorale EL-4 H-2^b e la linea EG7 trasfettata con OVA sono state ottenute da *American Type Culture Collection* (Manassan, VA).

Per ciascun esperimento una aliquota di EG7-OVA è stata scongelata e le cellule, mantenute in presenza di RPMI 1640 medium (*Invitrogen life technologies*), 10% FCS (*Invitrogen life technologies*), glutammina (*Euroclone*), penicillina e streptomina (*BioWhittker*), sono state passate ogni due giorni con aggiunta di 400 µg/ml di neomicina (G418) per mantenere la selezione del transgene.

Le cellule sono state isolate per ogni esperimento durante la fase log di crescita e $2,5 \times 10^6$ sono state inoculate sotto cute (s.c.) nel fianco destro di topi C57Bl/6 riceventi.

I tumori sono diventati visibili già dopo una settimana dall'inoculo delle cellule EG7-OVA.

Misura del tumore

Ogni due giorni veniva determinata la crescita tumorale misurando i due assi perpendicolari della massa tumorale con l'utilizzo di un calibro. La misura della grandezza del tumore è stata calcolata moltiplicando le lunghezze misurate.

I topi con diametro tumorale maggiore di 19 mm venivano sacrificati.

Citofluorimetria

Gli antigeni di superficie cellulare sono stati caratterizzati con un protocollo di staining standard.

Brevemente, le cellule (1×10^6) sono state incubate con gli appropriati mAbs coniugati ai fluorocromi per 20 min a 4°C, lavate in PBS 1X e fissate per 5' a temperatura ambiente con 1% di paraformaldeide.

Gli anticorpi utilizzati, tutti della *BD Pharmingen*, sono stati i seguenti:

anti CD-4, anti CD-8, anti CD-25, anti CD-11c e anti IL-2 ,streptavidina. Per la caratterizzazione delle cellule T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ le sospensioni cellulari sono state lavate e incubate con anticorpi anti CD4 e anti CD25 per 20 min a 4°C prima della permeabilizzazione ed incubazione con 1' anticorpo anti Foxp3 (FJK-16s; *Bioscience*) per 30 min a 4°C, secondo il protocollo del produttore.

Le sospensioni cellulari sono state incubate *ex vivo* per 5h con PMA (50 ng/mL) e ionomicina (500 ng/mL) in presenza di brefeldina A (10 µg/mL;

Sigma-Aldrich). Successivamente sono state lavate e permeabilizzate con saponina 0,5% , BSA 0,5% in PBS prima dello staining intracellulare con mAb α -mouse IL-2 coniugato al fluorocromo alloficocianina (APC).

Per gli esperimenti di immunoterapia, linfociti T CD4⁺ isolati dalla milza di topi DO11.10 TCR/EP OVA sono stati marcati con CFSE 5 μ M (*Molecular Probes*) per 5' a temperatura ambiente.

Per tutti gli esperimenti, le cellule marcate sono state analizzate mediante un FACSCalibur (*BD Bioscience*). L'analisi dei marker è stata effettuata utilizzando il programma *CellQuest* (*BD Bioscience*).

Chemio-immunoterapia

CTX (*Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO) è stata diluita in soluzione fisiologica ed inoculata introperitoneo (i.p.). Se non diversamente specificato, è stata usata una concentrazione di 100 mg/Kg, dose non tossica per gli animali.

4-5 h dopo il trattamento chemioterapico i topi Balb/c o C57Bl/6 *wild type* sono stati inoculati intravena (i.v.) con 200 μ l di linfociti T CD4⁺ DO11.10 TCR/EP OVA CFSE⁺.

Purificazioni cellulari

Tutte le sottopopolazioni cellulari sono state purificate mediante un sistema di biglie immunomagnetiche (*Milteny Biotec*) secondo il protocollo del

produttore. Gli splenociti sono stati lavati in soluzione salina e privati degli eritrociti mediante lisi osmotica.

Le cellule T CD4⁺ sono state purificate usando un MACS MultiSort kit. L'analisi al citofluorimetro della popolazione così ottenuta è risultata essere pura al 95% - 99%.

Saggio di proliferazione

Linfociti T CD4⁺ DO11.10 TCR/EP OVA purificati da linfonodi inguinali e ascellari sono stati messi in coltura per 3 giorni in piastre da 96 well a fondo tondo (*Corning; Costar*) in presenza di concentrazioni crescenti del peptide OVA.

La proliferazione cellulare è stata misurata dopo almeno 4h di coltura in presenza di timidina triziata [³H]TdR utilizzando il Matrix 96 Direct Beta Counter (Packard).

Titolazione delle citochine

Le citochine sono state titolate analizzando i sopranatanti delle colture mediante ELISA (*Endogen minikit e R&D systems*). E' stata aggiunta Avidina perossidasi (*Sigma-Aldrich*) e successivamente il substrato ABTS (*Kirkegaard & Perry Laboratories*). L'assorbanza è stata misurata a 405 nm.

Analisi statistica

Gli esperimenti mostrati sono stati ripetuti almeno tre volte. Ogni valore rappresenta la media di 3 punti sperimentali, per i quali è stata calcolata la deviazione standard dalla media. La deviazione standard del rapporto tra le medie è stata calcolata secondo la formula di Finney (56) ed è risultata $\leq 0.03 \%$.

RISULTATI

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

1. EFFETTO DELLA CICLOFOSFAMIDE SUL MICROAMBIENTE CELLULARE

Il primo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto del farmaco chemioterapico ciclofosfamide (CTX) sul microambiente cellulare dell'organismo.

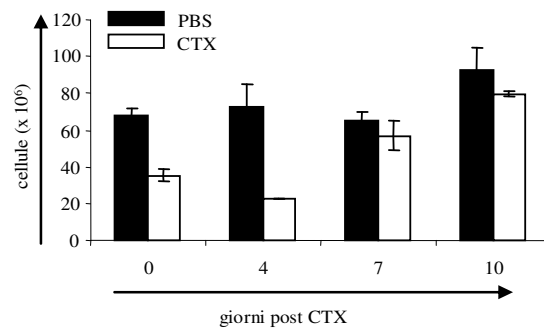
La CTX è un pro-farmaco che *in vivo* deve essere metabolizzato nel fegato in 4-idroperossiciclofosfamide per divenire attivo.

La fig. 4 illustra gli effetti di un singolo inoculo di CTX in topi C57Bl/6 sul numero assoluto di cellule nella milza a differenti intervalli di tempo dopo il trattamento con il farmaco.

È evidente una netta diminuzione, già solo 4-5 h dopo il trattamento, del numero assoluto delle cellule che tende a ritornare a livelli normali 10 giorni dopo il trattamento.

Tale effetto chiamato “fenomeno di *rebound*” è la conseguenza della linfopenia indotta dal farmaco ed è stato ipotizzato che possa essere accompagnato dalla produzione di fattori di crescita per le cellule progenitrici. (47)

A



B

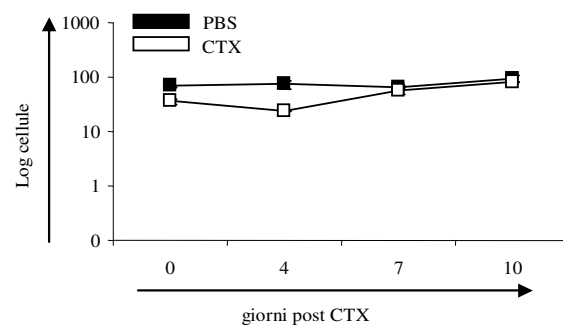


Figura 4. Effetto della ciclofosfamide sul numero assoluto delle cellule.

(A) Topi femmine C57Bl/6 *wild type* di 6-8 settimane hanno ricevuto un singolo inoculo i.p. (100mg/Kg) o PBS (□, ■ rispettivamente). 5h, 4, 7 e 10 giorni dopo è stata prelevata la milza: effettuata la conta cellulare.

(B) Rappresentazione in scala logaritmica della variazione del numero assoluto di cellule. (■ controllo, □ CTX).

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

2. EFFETTO DELLA CICLOFOSFAMIDE SULLE POPOLAZIONI CELLULARI

Il passo successivo è stato quello di valutare se la linfodeplezione indotta dalla CTX potesse essere associata con un effetto di deplezione delle popolazioni cellulari negli organi linfoidi periferici murini.

A questo scopo, topi C57Bl/6 sono stati inoculati con PBS o con CTX (100 mg/Kg) e a tempi diversi dopo il trattamento farmacologico sono stati prelevati milza, linfonodi e timo.

La dose del farmaco chemioterapico è in accordo con precedenti studi di valutazione della tossicità.

Per esaminare quali sotto-popolazioni linfoidi fossero influenzate dal trattamento con CTX, le sospensioni cellulari della milza, dei linfonodi e del timo sono state analizzate usando i marker delle cellule T e B. (Fig. 5, 6)

Le cellule della milza nei topi di controllo sono il 16% dei CD4⁺ e il 10% dei CD8⁺. Nei topi inoculati con CTX, dopo 4 giorni dal trattamento, la percentuale delle cellule T CD4⁺ e CD8⁺ aumenta al 26% e 17% rispettivamente.

La stessa situazione si verifica a livello dei linfonodi in cui la CTX induce, rispetto al controllo, un aumento del 50% sia delle cellule CD4⁺ che delle CD8⁺. (Fig. 5 A, B)

Situazione opposta si osserva invece per la popolazione delle cellule B CD19⁺.

Infatti, si ha una riduzione a 4 giorni dal trattamento della percentuale di questa popolazione di circa il 20% nella milza e del 70% nei linfonodi. (Fig. 5 C)

Anche l'analisi delle popolazioni cellulari nel timo di topi trattati ha evidenziato un aumento della percentuale sia dei CD4⁺CD8⁻ che dei CD4⁻

CD8⁺ (circa 30% e di 6,5 volte, rispettivamente) e una diminuzione dei CD4⁺CD8⁺ di circa il 47%. (Fig. 6)

La fig. 7 mostra i valori assoluti delle popolazioni cellulari T e B negli organi linfoidi periferici. Il numero totale sia delle cellule T CD4⁺ che CD8⁺ subisce una riduzione, ben evidente già solo dopo 2 giorni dal trattamento farmacologico, sia nella milza che nei linfonodi. Tuttavia una più drastica diminuzione si osserva per le cellule B CD19⁺.

Situazione simile si osserva nel timo.

Quindi, la CTX influenza le tre sottopopolazioni linfoidi, suggerendo una deplezione delle cellule T e B indotta dal farmaco dimostrabile 48h dopo un singolo inoculo.

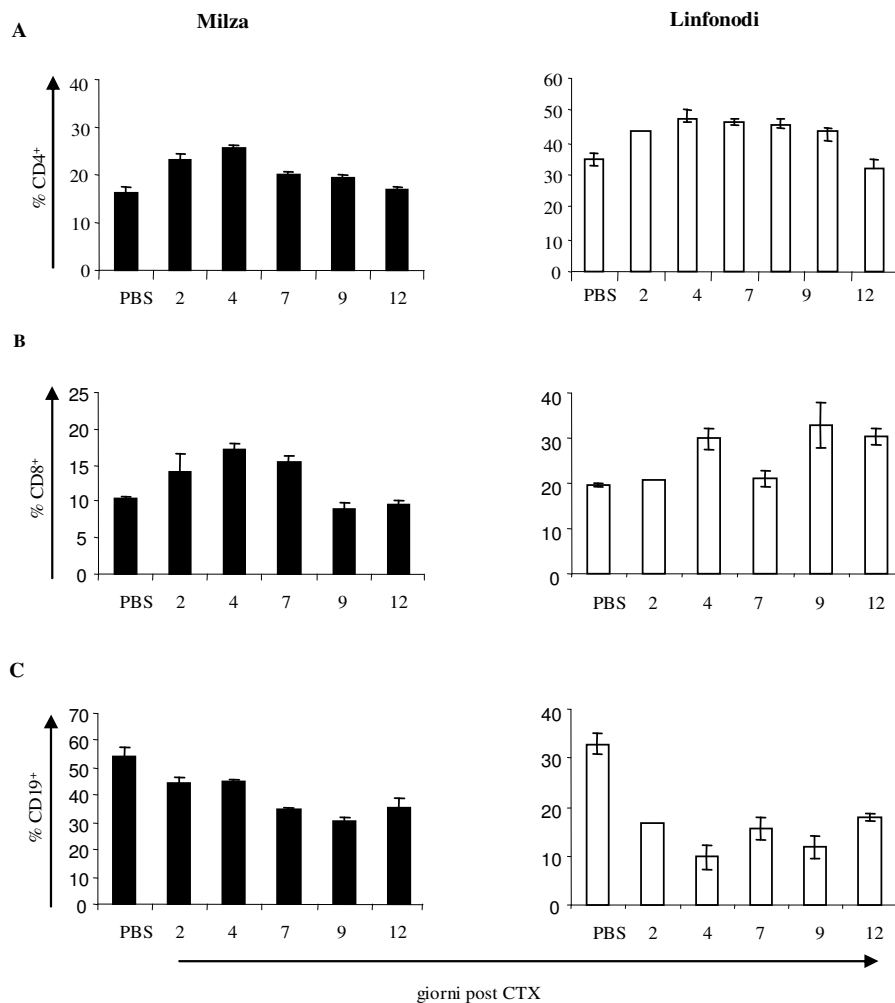


Figura 5. Alterazione della distribuzione cellulare in seguito alla somministrazione della ciclofosfamide.
 Topi femmine C57Bl/6 *wild type* di 6-8 settimane hanno ricevuto un singolo inoculo i.p. di CTX (100mg/Kg) o PBS. 2, 4, 7, 9, e 12 giorni dopo sono stati prelevati milza, linfonodi e la percentuale di cellule T CD4⁺ (A), T CD8⁺ (B), B CD19⁺ (C) è stata identificata mediante analisi citofluorimetrica, come descritto nei materiali e metodi.

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

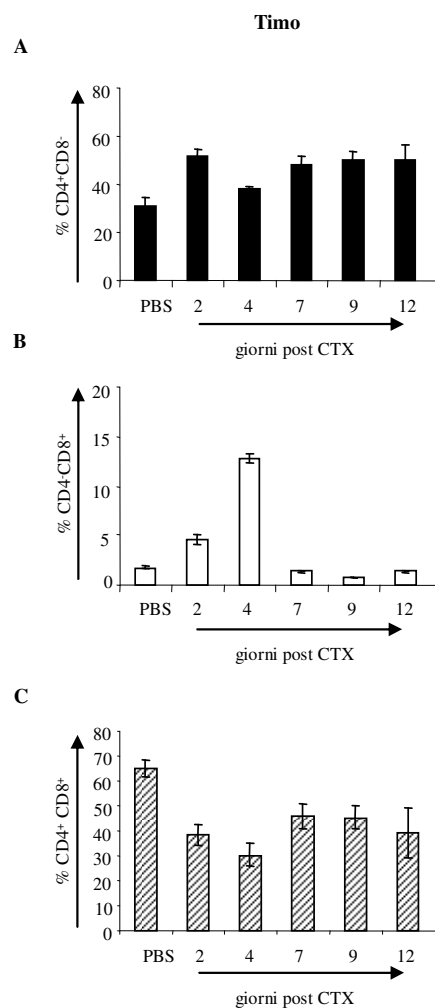


Figura 6. Alterazione della distribuzione cellulare in seguito alla somministrazione della ciclofosfamide.

Topi femmine C57Bl/6 *wild type* di 6-8 settimane hanno ricevuto un singolo inoculo i.p. di CTX (100mg/Kg) o PBS. 2, 4, 7, 9, e 12 giorni dopo è stato prelevato il timo e la percentuale di cellule T CD4⁺ CD8⁺ (A), T CD4⁺CD8⁺ (B), e CD4⁺CD8⁺ (C) è stata identificata mediante analisi citofluorimetrica, come descritto nei materiali e metodi.

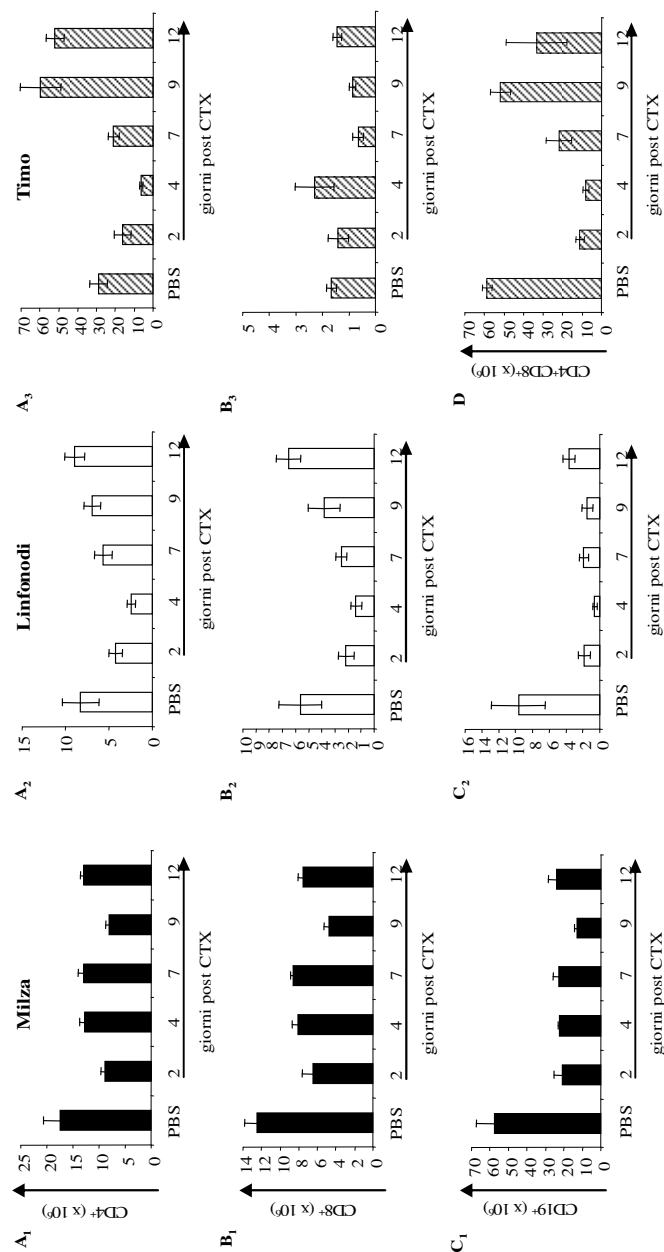


Figura 7. Alterazione della distribuzione cellulare in seguito alla somministrazione della ciclofosfamide. Topi femmine C57Bl/6 *wild type* di 6-8 settimane hanno ricevuto un singolo inoculo i.p. di CTX (100mg/Kg) o PBS. La milza, i linfonodi e il timo sono stati prelevati dopo 2,4,7,9, e 12 giorni l'unico inoculo del farmaco. Sono state contaminate le cellule vitali e le sospensioni di cellule T CD4⁺ (A), T CD8⁺ (B), B CD19⁺ (C) e CD4⁺CD8⁺ (D) sono state marcate con anticorpi anti CD4-FITC, anti CD8-Cy e anti CD19-PE e sono state analizzate mediante citofluorimetria, come descritto nei materiali e metodi.

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

3. EFFETTO DELLA CICLOFOSFAMIDE SULLE CELLULE T REGOLATORIE

La prevalenza delle cellule T linfoidi CD4⁺ che co-esprimono la catena α del recettore per l'interleuchina 2 (CD25) è stata determinata mediante tripla marcatura e analizzata mediante analisi citofluorimetrica.

La percentuale di tali cellule è rispettivamente del 10% e del 9% nella milza e nei linfonodi dei topi di controllo ma diminuisce del 40% nella milza e del 70% nei linfonodi raggiungendo un minimo al 4 giorno dal trattamento farmacologico. (Fig. 8 A, B)

Situazione opposta si osserva nel timo dei topi trattati dove la percentuale delle cellule T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ subisce un incremento di 3 volte rispetto ai topi inoculati solo con soluzione fisiologica. (Fig. 8 C)

La fig. 9 mostra l'effettiva riduzione indotta dalla CTX del numero assoluto delle cellule T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ riguardante gli organi linfatici periferici. Quindi, la ciclofosfamide ha indotto la drastica deplezione delle cellule Treg negli organi periferici. Tuttavia, in risposta a questa diminuzione si osserva l'aumento del loro numero nel timo così da ristabilire l'omeostasi periferica.

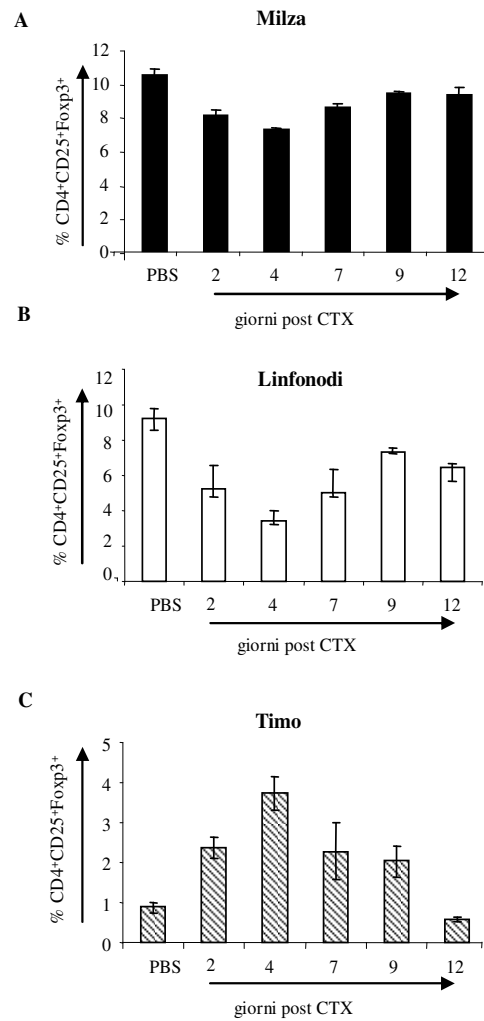


Figura 8. Alterazione della percentuale delle cellule Treg in seguito alla somministrazione della ciclofosfamida.

Topi femmine C57Bl/6 *wild type* di 6-8 settimane hanno ricevuto un singolo inoculo i.p. di CTX (100mg/Kg) o PBS.

La percentuale di cellule T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ è stata determinata mediante analisi citofluorimetrica, come descritto nei materiali e metodi, 2, 4, 7, 9, e 12 giorni dopo. (A) milza, (B) linfonodi, (C) timo.

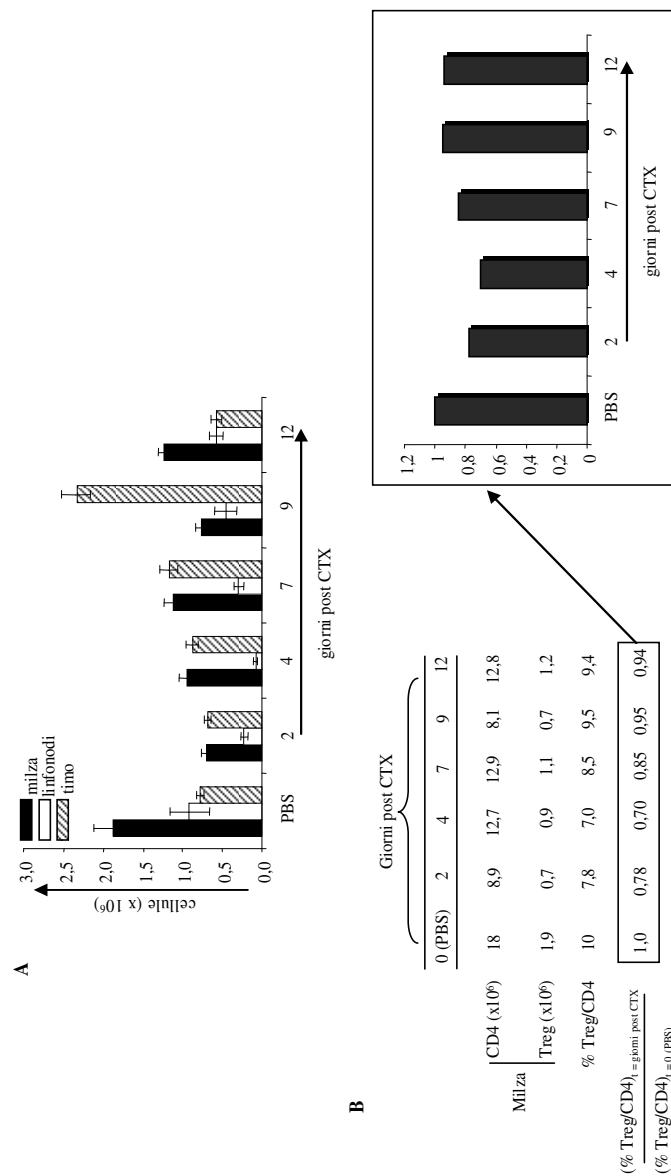


Figura 9. Deplezione indotta dalla ciclofosfamide delle cellule Treg.
 Topi femmine C57Bl/6 *wild type* di 6-8 settimane hanno ricevuto un singolo inoculo i.p. di CTX (100mg/Kg) o PBS.
 (A) Il valore assoluto delle cellule T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ isolate dalla milza (■), dai linfonodi (□) e dal timo (▨) è stato determinato mediante analisi citofluorimetrica, come descritto nei materiali e metodi, 2, 4, 7, 9, e 12 giorni dopo.
 (B) Andamento delle cellule T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nei giorni successivi al trattamento farmacologico rispetto alle cellule T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ di controllo.

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

4. ANALISI DELLE SOTTOPOPOLAZIONI DI CELLULE DENDRITICHE

Le cellule dendritiche murine spleniche sono state classificate in tre subset: $CD8^+CD4^-$, $CD8^-CD4^+$, e $CD8^-CD4^-$. Per il ruolo critico di queste cellule nell'induzione delle risposte immuni, in questo lavoro è stato analizzato l'effetto del trattamento chemioterapico anche su questi subset cellulari.

La sospensione cellulare splenica è stata marcata con gli anticorpi CD11c, CD4 e CD8 e la percentuale delle diverse popolazioni di cellule dendritiche è stata analizzata sul totale delle $CD11c^+$.

La fig. **10** evidenzia che non esiste un sostanziale cambiamento nella percentuale delle cellule $CD4^-CD8^-$ e $CD4^-CD8^+$ nei topi che hanno ricevuto un singolo inoculo del farmaco. (**A, B**)

Solo la percentuale riguardante la popolazione delle cellule $CD4^+CD8^-$ subisce una riduzione, rispetto ai topi non trattati, al 4 giorno dal trattamento. (**C**)

5. RIDUZIONE DI CELLULE IL-2⁺ DOPO TRATTAMENTO FARMACOLOGICO

Recentemente, numerosi studi hanno dimostrato che una fondamentale funzione dell'interleuchina 2 *in vivo* sia quella di mantenere l'omeostasi e le funzioni regolatorie delle cellule T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$.

Ci siamo chiesti, quindi, se la diminuzione delle cellule Treg in topi trattati con CTX (fig. **9**) potesse esser correlata ad una diminuzione dei livelli di IL-2.

A questo scopo, gli splenociti isolati da topi di controllo e da topi trattati con 100mg/Kg di CTX sono stati stimolati *ex vivo* con PMA, IONO e

breferildina A per 5h a 37 °C e marcati per l'analisi in citofluorimetria della produzione di IL-2 da parte delle cellule T CD4⁺. (Fig. **11 A**)

Il grafico in figura **11 B** evidenzia una diminuzione indotta dal farmaco (circa il 60%) della percentuale delle cellule T CD4⁺IL-2⁺ evidente già dopo 48h l'inoculo per raggiungere il valore minimo nei 5 giorni successivi.

Questi risultati possono quindi almeno in parte spiegare l'abbassamento, evidenziato dai precedenti risultati, del numero delle cellule Treg CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺.

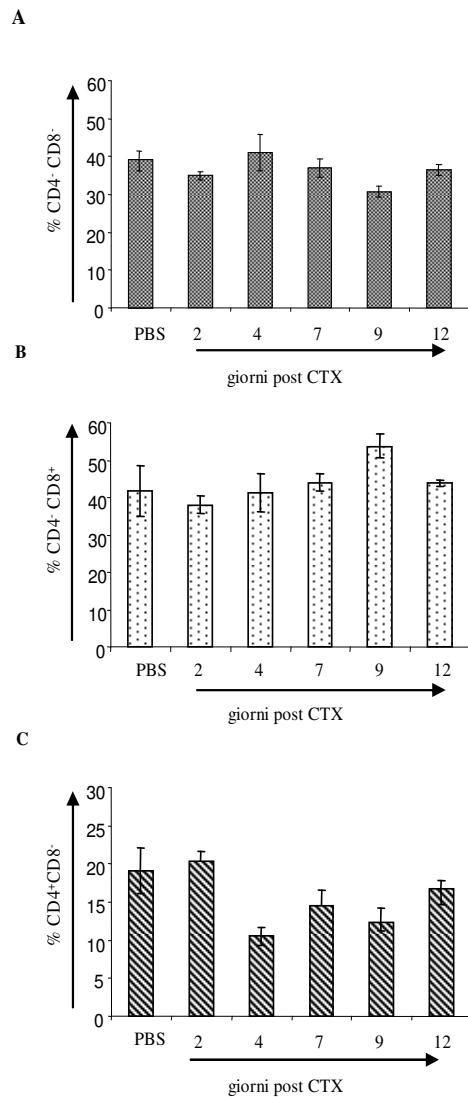
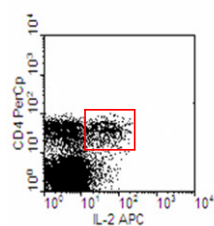


Figura 10. Analisi delle sottopopolazioni di cellule dendritiche in seguito alla somministrazione della ciclofosfamide.

Topi femmine C57Bl/6 *wild type* di 6-8 settimane hanno ricevuto un singolo inoculo i.p. di CTX (100mg/Kg) o PBS. 2, 4, 7, 9 e 12 giorni dopo è stata analizzata la percentuale di cellule spleniche CD4⁺CD8⁻(A), CD4⁺CD8⁺ (B), e CD4⁺CD8⁻ (C) mediante analisi citofluorimetrica (gate su CD11c⁺), come descritto nei materiali e metodi.

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

A



B

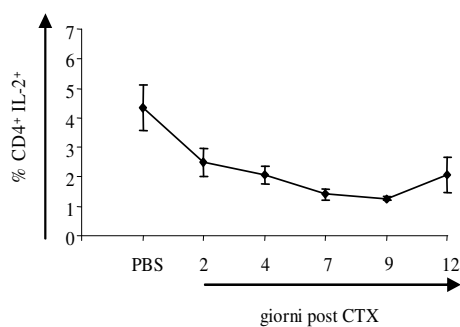


Figura 11. Riduzione della percentuale di cellule IL-2⁺ dopo trattamento farmacologico.

Gli splenociti isolati da topi trattati con 100mg/Kg di CTX o di PBS sono stati stimolati *in vitro* con PMA e ionomicina per 5h ad una temperatura di 37 °C. La produzione di IL-2 secreta dai linfociti T CD4⁺ è stata effettuata mediante analisi al citofluorimetro dopo marcatura con mAb anti CD4-PerCp e IL-2 APC (A).

(B) Riduzione della percentuale di IL-2 prodotta dai linfociti T CD4⁺ dopo 2, 4, 7, 9 e 12 giorni dopo l'inoculo di CTX.

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

6. DESTINO DI CELLULE T ADOTTIVAMENTE TRASFERITE DOPO TRATTAMENTO CON CTX

Numerosi studi hanno mostrato forti effetti sinergici nella combinazione della terapia con CTX e il trasferimento adottivo di cellule T nell'inibizione della crescita tumorale nei topi.

In questo studio, è stato usato il trasferimento adottivo di una popolazione di cellule T CD4⁺, transgenica per un TCR specifico per un epitopo di OVA albumina (T CD4⁺ DO11.10, Tg TCR/EP OVA), dopo trattamento con ciclofosfamide in topi Balb/c *wild type* per far luce sul destino di queste cellule in topi trattati con il farmaco chemioterapico.

Le cellule T CD4⁺ DO11.10 sono state isolate da topi Balb/c Tg TCR/EP OVA mediante separazione immunomagnetica e inoculate in topi Balb/c *wild type* precedentemente trattati con CTX.

La popolazione delle cellule Tg è stata identificata, in tempi diversi dal trattamento, mediante anticorpo monoclonale specifico per un determinante antigenico del TCR. (Fig. 12)

Come illustra la fig. 13 A, la percentuale delle cellule T CD4⁺ DO11.10 è più alta negli organi linfoidi periferici di topi trattati rispetto ai NT (non trattati, cioè topi che non hanno ricevuto l'inoculo della CTX) (milza: 0,4%, 0,1%; linfonodi: 0,7%, 0,2% rispettivamente).

Tale incremento, ben evidente 4 giorni dopo il trattamento, tende poi a diminuire nei tempi successivi.

Se ne deduce quindi, che il trattamento con ciclofosfamide può efficientemente promuovere la sopravvivenza e l'*homing* delle cellule trasferite adottivamente sia nella milza che nei linfonodi. Al contrario, in assenza del trattamento con CTX le cellule Tg sono incapaci di migrare negli organi linfoidi secondari degli animali riceventi.

Questo fenomeno può essere, almeno in parte, spiegato dalla condizione di linfopenia indotta dalla ciclofosfamide.

Interessante è anche il numero totale delle cellule Tg nei topi pre-trattati che risulta maggiore rispetto ai NT. (Fig. **13 B**)

L'aumentato numero dei linfociti T DO11.10 che si osserva nella milza e nei linfonodi dei topi trattati con ciclofosfamide potrebbe esser dovuto alla proliferazione cellulare.

A tal fine, i linfociti Tg sono stati precedentemente marcati con CFSE e successivamente inoculati. La proliferazione è stata analizzata mediante analisi citofluorimetrica.

La fig. **14** mostra che negli animali trattati con il farmaco chemioterapico i linfociti trasferiti adottivamente non presentano nessun ciclo di proliferazione in nessun tempo preso in esame.

In conclusione, i risultati suggeriscono che l'aumento osservato delle cellule T Tg è da attribuirsi esclusivamente al loro *homing* verso gli organi secondari.

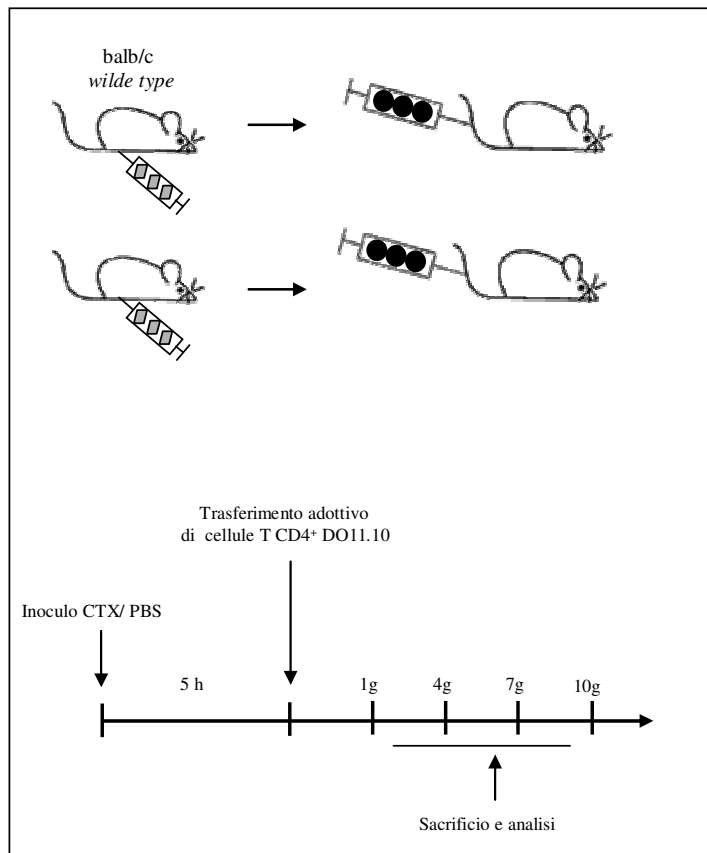


Figura 12. Disegno sperimentale del trasferimento adottivo di linfociti antigene specifici in topi pre-trattati con CTX.

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti $CD4^+$ T helper”

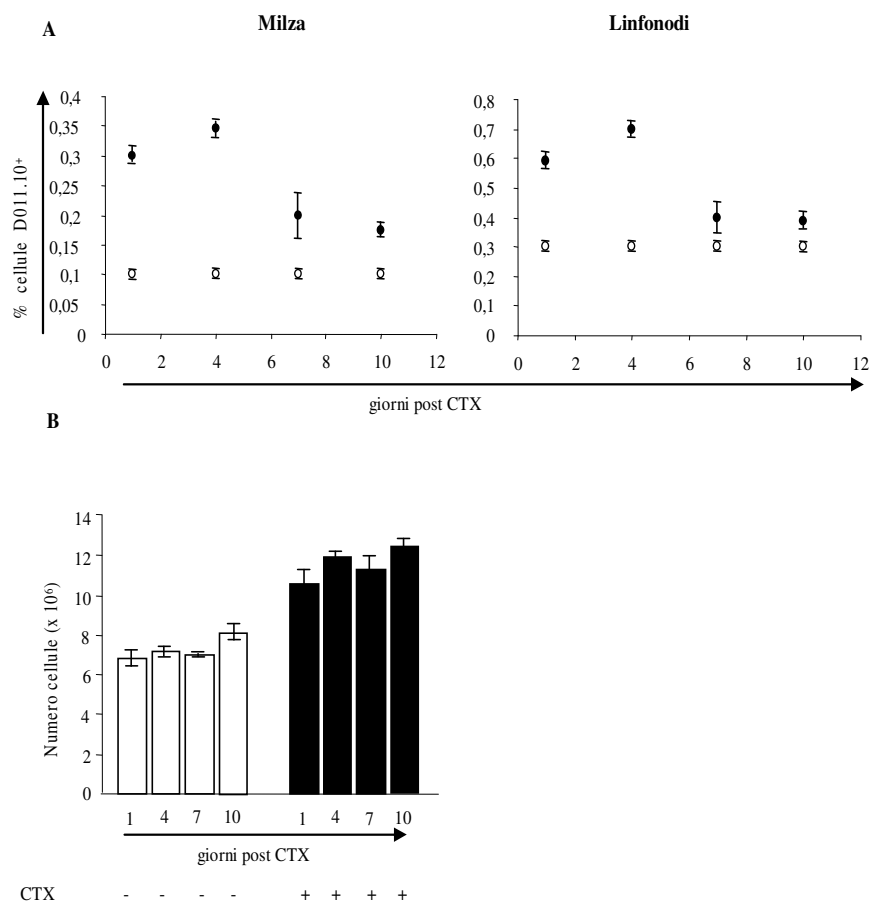


Figura 13. Effetto del trattamento con ciclofosfamide sull'homing di linfociti adottivamente trasferiti verso gli organi linfoidi secondari.

(A) Topi Balb/c *wild type* sono stati trattati con PBS o con CTX e 5h dopo il trattamento sono stati inoculati i.v. con linfociti T antigene specifici (DO11.10). La percentuale di linfociti T DO11.10 è stata analizzata al citofluorimetro in tempi diversi. (O) controllo, (●) inoculo CTX. (B) Analisi del valore assoluto dei linfociti T antigene specifici.

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

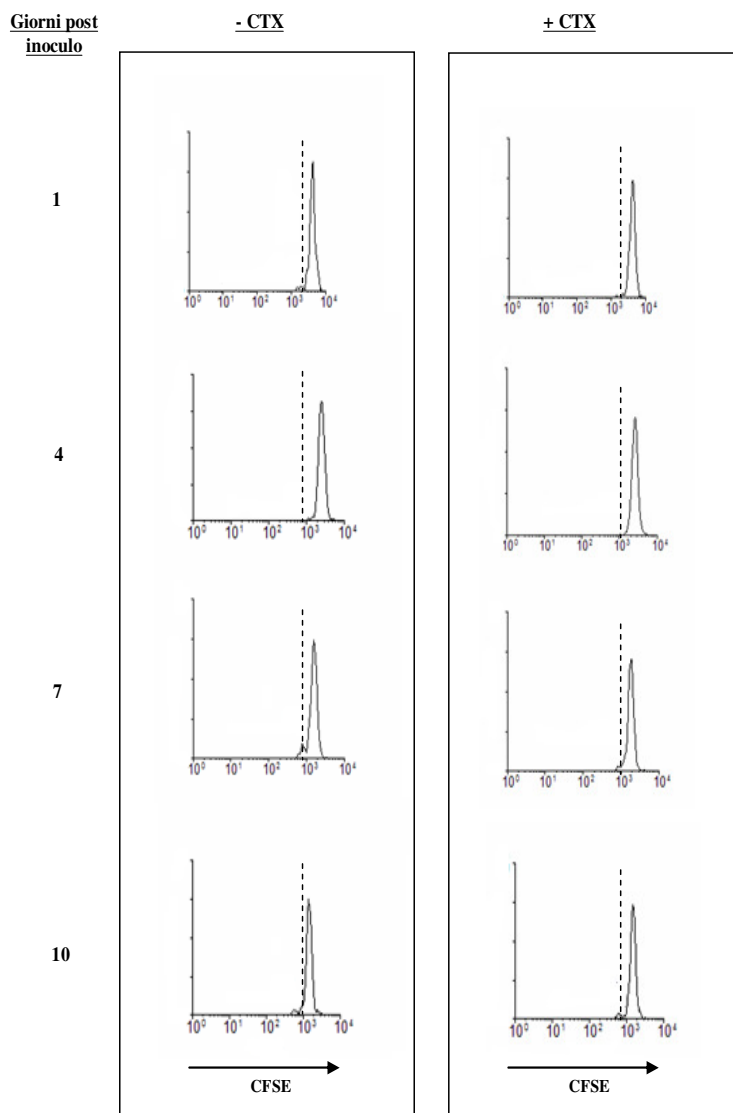


Figura 14. Proliferazione di linfociti T DO11.10.

I linfociti T DO11.10 precedentemente marcati con il CFSE sono stati trasferiti i.v. in topi riceventi Balb/c *wild type* inoculati 5h prima con PBS o CTX.

La proliferazione cellulare dei linfociti antigene specifici è stata valutata dopo 1, 4, 7 e 10 giorni.

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

7. STIMOLAZIONE DELLE CELLULE T ANTIGENE SPECIFICHE IN VITRO

Dopo aver osservato che la CTX promuove l'*homing* verso gli organi linfoidi periferici di cellule adottivamente trasferite, è stata verificata la loro attivazione dopo immunizzazione *in vivo* con l'antigene OVA e successiva stimolazione *in vitro* con il peptide 323-329 di OVA.

Solo le cellule Tg TCR/EP OVA possono riconoscere ed attivarsi in conseguenza dell'incontro con l'antigene verso cui sono specifiche.

Come per l'esperimento precedente, le cellule T CD4⁺ DO11.10 sono state isolate e inoculate in topi riceventi Balb/c *wild type* trattati nelle 5h precedenti con 100mg/Kg di CTX o con soluzione fisiologica.

Dopo 2, 4 o 7 giorni i topi sono stati immunizzati b.t. con l'antigene OVA emulsionato in adiuvante incompleto di Freund (IFA) e 7 giorni successivi all'immunizzazione è stata analizzata mediante marcatura con anticorpi monoclonali e analisi al citofluorimetro la percentuale delle cellule trasferite. (Fig. **15 A**)

Come atteso, si osserva un aumento della percentuale delle cellule Tg, dopo immunizzazione con OVA + IFA, nei linfonodi inguinali rispetto ai linfonodi di controllo (ascellari) e alla milza. Tale popolazione cellulare tende poi a decrescere nel corso del tempo, per meccanismi apoptotici, per l'assenza dell'antigene verso cui sono responsive.

Il recupero dei linfociti T DO11.10 dai linfonodi dei topi trattati farmacologicamente risulta maggiore rispetto ai linfonodi dei topi di controllo. (Fig. **15 B**)

Successivamente è stata valutata *in vitro* l'attivazione delle cellule trasferite. A questo scopo, è stato effettuato un saggio di proliferazione cellulare in cui i linfociti T isolati dai linfonodi inguinali e ascellari di topi trattati o non

sono stati stimolati *in vitro* per 3 giorni con concentrazioni diverse del peptide OVA.

Attraverso incorporazione di timidina triziata è stata valutata la proliferazione delle cellule Tg.

Non si osservano differenze nella proliferazione dei linfociti derivanti dai linfonodi ascellari di entrambi i gruppi sperimentali; al contrario, una maggior proliferazione si evidenzia dopo stimolazione antigenica delle cellule isolate dai linfonodi inguinali di topi trattati con ciclofosfamide. (Fig. 16)

Mediante saggio ELISA è stato poi possibile valutare l'attivazione cellulare, oltre che in termini di proliferazione, anche in termini di secrezione citochinica.

I risultati in fig. 17 e 18 evidenziano un notevole aumento indotto dalla CTX della secrezione sia di IL-2 (ai 2gg; **pannello A**) che di IFN- γ in tutti i tempi successivi all'immunizzazione antigenica.

In conclusione, si può affermare che il pre-trattamento con ciclofosfamide induce un ambiente che può condizionare sia i linfociti dell'animale ricevente che quelli del donatore ma è particolarmente efficiente nel promuovere la proliferazione/espansione dei linfociti antigene specifici.

Inoltre, in un animale trattato con CTX i linfociti trasferiti sono competenti a rispondere alla stimolazione antigenica sia *in vivo* che *ex vivo*.

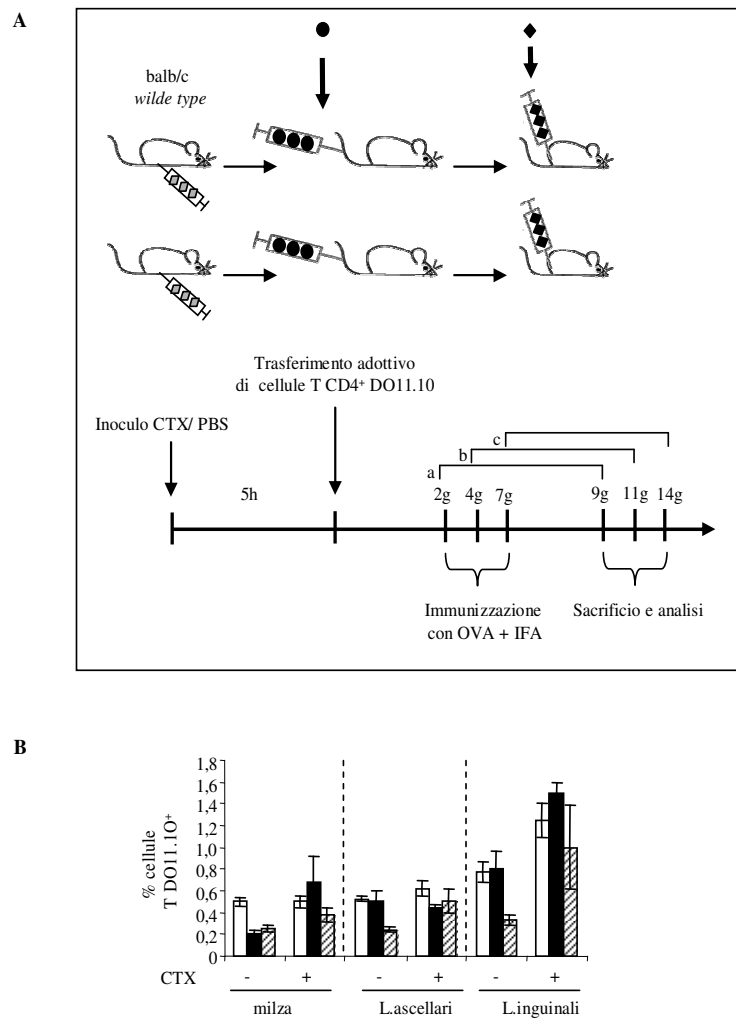


Figura 15. Aumento indotto dalla CTX delle cellule transgeniche trasferite e immunizzazione antigenica.

(A) Disegno sperimentale del trasferimento adottivo e dell'attivazione di linfociti T.

(B) 5h dopo l'inoculo di 100mg/Kg di CTX/PBS è stato effettuato il trasferimento adottivo di linfociti T DO11.10. I topi sono stati suddivisi in diversi gruppi sperimentali e sono stati immunizzati b.t. con l'antigene OVA emulsionato in IFA a 2 (□), 4 (■), 7 (▣) giorni dal trattamento farmacologico.

Dopo 7 giorni dall'immunizzazione, sono stati prelevati gli organi linfoidi periferici, milza e linfonodi (ascellari e inguinali) ed è stata valutata la percentuale dei linfociti trasferiti dopo marcatura con mAb anti DO11.10 PE e analisi al citofluorimetro.

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l'attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

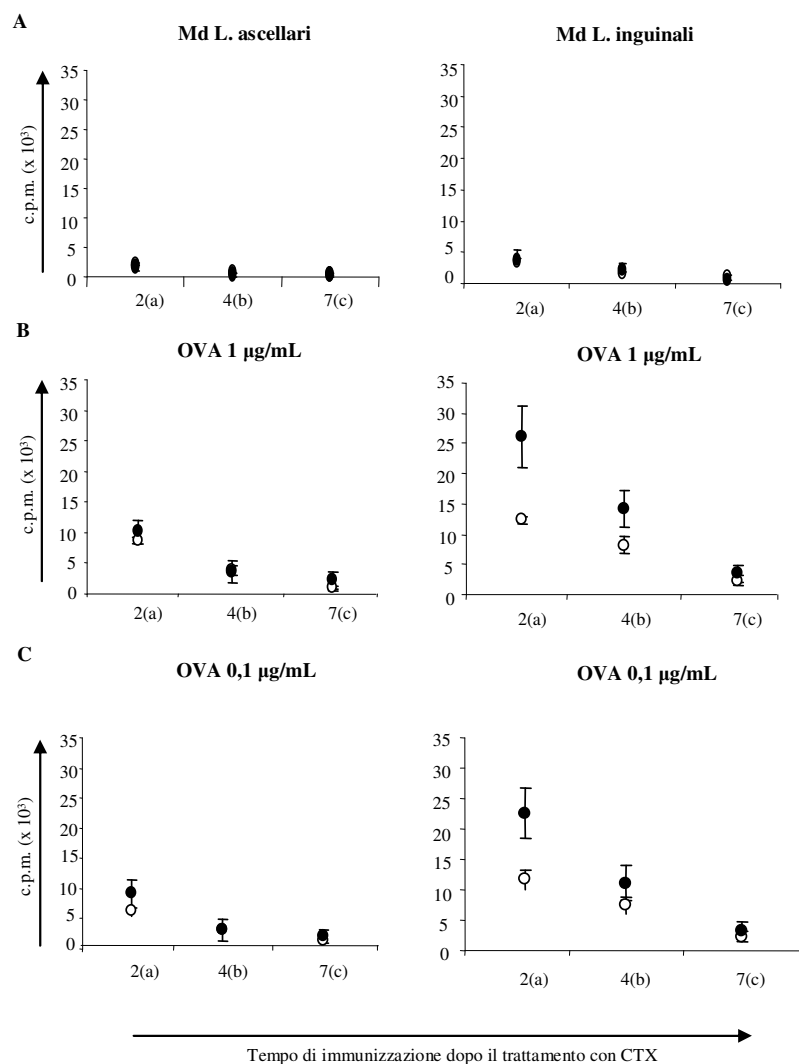


Figura 16. Proliferazione indotta dalla CTX delle cellule trasferite.

Linfociti T DO11.10 isolati dai linfonodi ascellari (B) ed inguinali (C) di topi di controllo (○) e di topi trattati con CTX (●), entrambi precedentemente immunizzati con l'antigene OVA, sono stati messi in coltura in presenza di concentrazioni diverse del peptide OVA (323-329) o in presenza del medium come controllo (Md). Dopo 3 giorni di coltura è stata valutata la proliferazione cellulare mediante incorporazione di timidina triziata [³H] TdR.

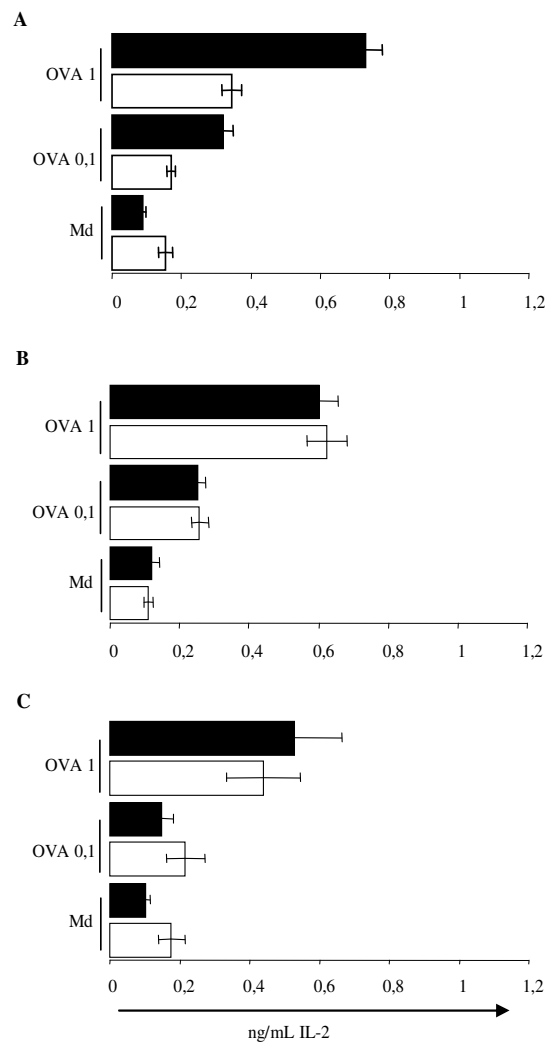


Figura 17. Analisi della secrezione citochinica.

In presenza o in assenza dell'antigene OVA (0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$) i sovrinatanti della coltura, dei linfociti T DO11.10 isolati dai linfonodi inguinali di topi di controllo (barra bianca) o di topi inoculati con CTX (barra nera) sono stati saggati per la secrezione di IL-2 attraverso saggio ELISA dopo 2 (A), 4 (B) e 7 (C) giorni dopo il trattamento con CTX.

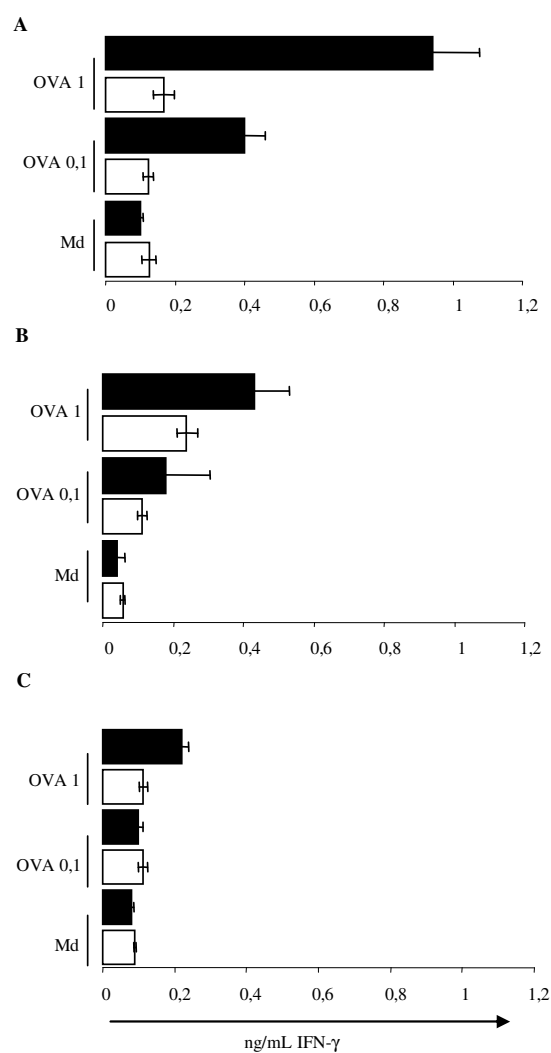


Figura 18. Analisi della secrezione citochinica.

In presenza o in assenza dell'antigene OVA (0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$) i sovranatanti della coltura, dei linfociti T DO11.10 isolati dai linfonodi inguinali di topi di controllo (barra bianca) o di topi inoculati con CTX (barra nera) sono stati saggiati per la secrezione di IFN- γ attraverso saggio ELISA dopo 2 (A), 4 (B) e 7 (C) giorni dopo il trattamento con CTX.

8. EFFETTO DELLA CICLOFOSFAMIDE IN PRESENZA DI CELLULE TUMORALI

La fig. **19 A, B** mostra, dopo inoculo s.c. nel fianco destro di topi C57Bl/6 di $2,5 \times 10^6$ cellule tumorali EG7-OVA, la cinetica della crescita tumorale.

Gli effetti drammatici che risultano ben evidenti già dopo circa una settimana dall'unico inoculo diventano ancora più consistenti nei 13 giorni successivi il trattamento dove la massa tumorale raggiunge circa i 20 mm di diametro.

A conferma di precedenti studi, una singola iniezione i.p. di CTX (80 mg/Kg) riduce significativamente la massa tumorale di circa il 75% (20 mm² e 5 mm² la massa tumorale dei topi non trattati e inoculati con CTX rispettivamente). Tuttavia il tumore continua a progredire. (Fig. **19 C**)

Quindi, CTX da sola induce una notevole inibizione della crescita tumorale in questo modello sperimentale, sebbene tutti i topi trattati muoiono per metastasi.

Interessante è stato valutare successivamente l'effetto della ciclofosfamide sulle popolazioni cellulari in presenza del tumore.

A tale scopo, 6, 12 e 16 giorni dopo l'inoculo di EG7-OVA in assenza o in presenza di CTX (Fig. **20**) i topi sono stati sacrificati e sono stati analizzati: milza, linfonodi inguinali e linfonodo drenante la massa tumorale.

La percentuale delle popolazioni di cellule T CD4⁺ e T CD4⁺Foxp3⁺ è stata valutata, come per gli esperimenti precedenti, mediante marcatura con mAb specifici per la popolazione cellulare in esame ed analisi al citofluorimetro.

In funzione della crescita tumorale si osserva una diminuzione dei linfociti T CD4⁺ nel linfonodo drenante, mentre nessuna o una piccola diminuzione si osserva nella milza e nel linfonodo inguinale opposto. (Fig. **20**)

Dopo trattamento con CTX, la percentuale dei linfociti T CD4⁺ aumenta fino ad arrivare livelli paragonabili al controllo in tutti gli organi presi in esame.

L'analisi della popolazione di cellule ad attività regolatoria non evidenzia nessuna variazione del loro numero nella milza e nei linfonodi (opposto e drenante). (Fig. 20) Tuttavia, in presenza di CTX se ne osserva una modesta riduzione. (Fig. 20)

I dati riguardanti le popolazioni cellulari presenti nella massa tumorale mostrano un consistente aumento della percentuale delle cellule CD4⁺ in funzione della crescita tumorale (fig. 21B), con una percentuale elevata di cellule Treg. (Fig. 21C)

Tuttavia seppure la percentuale di cellule Treg della massa tumorale non diminuisce dopo il trattamento con il chemioterapico, il numero assoluto delle cellule Treg nel tumore subisce una notevole riduzione. (Fig. 21D)

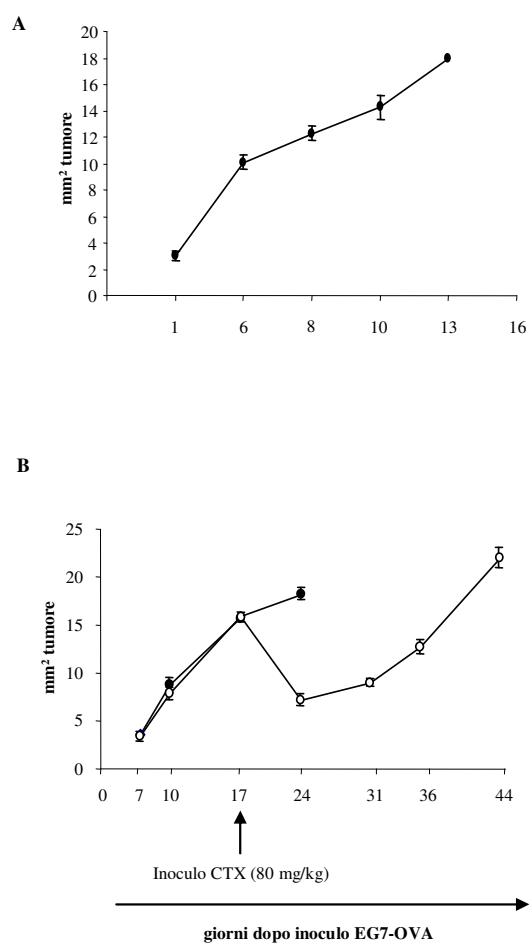


Figura 19. Effetto della ciclofosfamide sulla crescita tumorale.

Topi C57Bl/6 *wild type* di 6-8 settimane sono stati inoculati s.c. con $2,5 \times 10^6$ cellule EG7-OVA.

(A) Media della crescita tumorale di topi inoculati con cellule EG7-OVA.

(B) Crescita della massa tumorale in assenza (●) o dopo iniezione di CTX (○) al 17° giorno (18mm²) dopo l'inoculo del tumore.

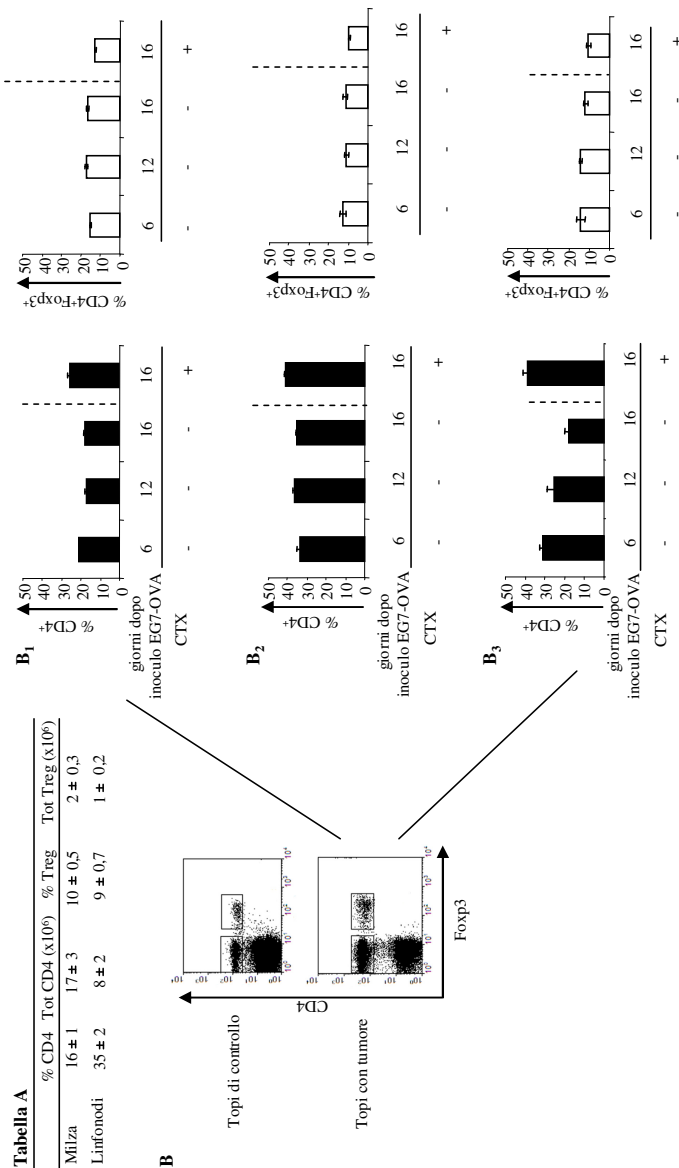


Figura 20. Effetto della CTX sulle cellule T CD4⁺ e sulle Treg in presenza di cellule tumorali.
 La tabella A mostra la percentuale e i numeri assoluti delle cellule T CD4⁺ e delle Treg isolate dalla milza e dai linfonodi di topi di controllo (assenza del tumore e assenza del farmaco chemioterapico).
 Le cellule EG7/OV A (2,5x10⁶/topo) sono state inoculate sottocute in diversi gruppi sperimentali di topi C57Bl/6.
 Al 16° giorno un gruppo sperimentale è stato trattato con CTX (80mg/Kg). La percentuale delle cellule CD4⁺ e CD4⁺Foxp3⁺ è stata valutata al citofluorimetro (B) nella milza (B₁), nei linfonodi (B₂) e nel linfonodo drenante il tumore (B₃).

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

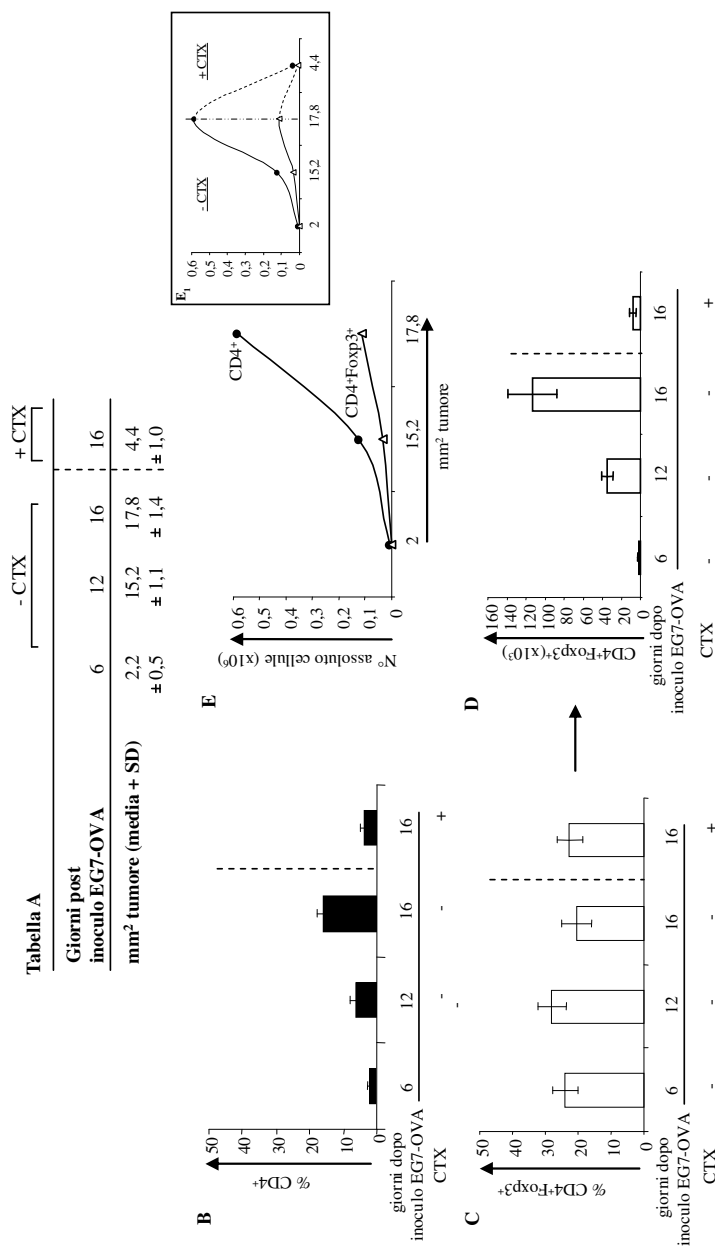


Figura 21. Effetto della CTX sulle cellule presenti nella massa tumorale.
Le cellule EG7/OVA ($2,5 \times 10^6$ /topo) sono state inoculate sottocute in diversi gruppi sperimentali di topi C57Bl/6. Al 16°giorno un gruppo sperimentale è stato trattato con CTX (80mg/Kg). La tabella A mostra la correlazione tra l’aumento progressivo delle dimensioni della massa tumorale e i giorni post inoculo, in assenza e in presenza della CTX. La percentuale delle cellule CD4⁺ Treg (C) della massa tumorale è stata valutata al citofluorimetro. (D) Numero assoluto delle cellule Treg della massa tumorale. (E) Correlazione tra il numero assoluto delle cellule T CD4⁺ e delle cellule CD4⁺Foxp3⁺ nella milza di topi trattati con EG7-OVA e le dimensioni della massa tumorale stessa. (Fig. E, assenza e presenza di CTX).

DISCUSSIONE

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

Negli ultimi anni sono stati fatti numerosi progressi nella comprensione delle basi molecolari e cellulari delle risposte immuni anti-tumorali mediate dalle cellule T. Sia le cellule T CD8⁺ che CD4⁺ sono state identificate come potenti effettori della risposta immune contro il tumore, tuttavia per quest'ultima popolazione cellulare le loro funzioni possono essere molteplici in quanto possono sia ostacolare che aiutare le risposte immuni anti-tumorali. (57, 58)

I recenti progressi della ricerca hanno aperto nuove prospettive per strategie di immunoterapia del cancro innovative e più efficaci. Tuttavia il successo di terapie su base immunologica è ancora limitato dalla bassa percentuale di pazienti in cui si osservano risposte cliniche efficaci e durevoli. (51)

La mancanza di evidenti risposte cliniche contro le cellule tumorali sottolinea sia la necessità di migliorare i vaccini attualmente in uso sia di sviluppare strategie alternative immunoterapeutiche per il trattamento dei tumori metastatici.

Negli ultimi tempi molta attenzione è stata data all'immunoterapia adottiva come possibile strategia per il trattamento dei tumori. L'interesse per questo approccio terapeutico deriva da numerosi studi che descrivono con successo l'immunoterapia adottiva mediata da linfociti T trasferiti adottivamente in modelli tumorali murini.

È stato ampiamente osservato nel topo che la deplezione di cellule del sistema immune prima del trasferimento adottivo migliora l'efficacia anti-tumorale delle cellule trasferite adottivamente determinando la regressione del tumore. Numerosi studi hanno mostrato che vari trattamenti non mieloablativi così come l'irradiazione (59) possano modulare la risposta immune ed incrementare l'attività anti-tumorale dei linfociti adottivamente trasferiti attraverso un processo conosciuto come proliferazione omeostatica.

È ampiamente accettato che gli agenti chemioterapici possono avere molteplici effetti sia sulle cellule immuni che non immuni dell'ospite e questa azione può essere rilevante per l'induzione di una risposta anti-tumorale. (60)

Tra queste è stata ampiamente studiata la ciclofosfamide (CTX), un agente alchilante largamente utilizzato per il trattamento di tumori così come per disordini autoimmuni e linfoproliferativi. Tuttavia, i meccanismi attraverso cui la CTX agisce non sono ben noti.

Da un lato la CTX potrebbe agire come un convenzionale farmaco anti-tumorale influenzando la proliferazione delle cellule tumorali, dall'altro potrebbe presentare effetti immunomodulatori che possono avere un importante ruolo nella risposta contro il tumore. La combinazione della linfo-deplezione dovuta al trattamento chemioterapico seguita dal trasferimento adottivo di linfociti T è stata valutata nelle fasi I/II dei trials clinici e si è dimostrato mediare una consistente regressione del tumore in pazienti con melanoma metastatico. (61, 62)

Le cellule $CD4^+CD25^+$ Treg sono una sottopopolazione di linfociti T la cui funzione è quella di regolare la risposta immunitaria prevenendo i possibili danni secondari dovuti ad un'eccessiva risposta infiammatoria.

La stretta relazione tra autoimmunità e immunità tumorale suggerisce che le cellule Treg possano avere un ruolo cruciale nella tolleranza delle cellule T verso gli antigeni tumorali. (63, 64)

Recenti ricerche hanno dimostrato che l'immunomodulazione mediata dalle cellule Treg è uno dei meccanismi predominanti di evasione del sistema immune da parte del tumore ed il principale ostacolo per l'immunoterapia tumorale. (33, 65) Le cellule $CD4^+CD25^+$ Treg interferendo con la

generazione di una duratura immunità anti-tumorale, rappresentano un bersaglio chiave nelle nuove strategie contro il cancro. (66)

A partire da queste evidenze siamo andati a valutare in primo luogo l'effetto del farmaco chemioterapico ciclofosfamide sulle cellule del sistema immunitario. È stato dimostrato come questo farmaco riduce il numero assoluto delle cellule sia nella milza che nei linfonodi: un singolo inoculo di CTX è sufficiente, già 2 giorni dopo, ad indurre una profonda linfo-deplezione negli organi linfoidei periferici che coinvolge le cellule T CD8⁺, T CD4⁺ e B CD19⁺. È ben noto in letteratura che la chemioterapia, così come l'irradiazione, possa indurre linfo-deplezione che è poi seguita dalla espansione delle cellule restanti in periferia per il ripristino del pool originale. (67)

Sebbene siano stati suggeriti molti meccanismi per spiegare l'attività immunomodulatoria della CTX non si è ancora riusciti a capire in che maniera il farmaco possa influenzare anche la popolazione delle cellule Treg. Dai nostri risultati si evidenzia una netta diminuzione indotta dal farmaco chemioterapico della popolazione di cellule T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nella milza e nei linfonodi.

Dopo 4 giorni, tuttavia, si osserva una reazione compensativa da parte del timo in cui una maggiore percentuale di queste cellule vengono generate in concomitanza della loro diminuzione in periferia.

I dati mostrano quindi che il trattamento con il farmaco CTX determina un diverso effetto citotossico su queste cellule.

Dalla letteratura è noto che uno dei principali ruoli della IL-2 *in vivo* sia quella di contribuire alla produzione, omeostasi e la funzione delle cellule Treg. Si è cercato quindi di capire se la diminuzione del numero di Treg

osservata potesse esser dovuta in qualche modo ad una alterazione nei meccanismi di controllo omeostatici.

I risultati mostrano che una delle possibili cause della diminuzione del numero delle cellule T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ in periferia deriva, dopo trattamento con il farmaco, dalla diminuzione della percentuale di cellule T $CD4^+$ che producono IL-2. Nessun cambiamento significativo si riscontra invece per le popolazioni di cellule dendritiche.

Da ciò si può dedurre che, mentre la ciclofosfamide determina un effetto citotossico diretto per le popolazioni di cellule T e B il suo effetto sulle cellule ad attività regolatoria risulta essere indiretto, per meglio dire dipendente dalla popolazione di cellule T.

Esperimenti di deplezione aventi lo scopo di identificare le popolazioni cellulari responsabili dell'attività antitumorale hanno mostrato che le cellule T $CD4^+$ sono essenziali per il completo rigetto del tumore. Questi esperimenti forniscono la spiegazione del fallimento della maggior parte delle strategie di chemio-immunoterapia inizialmente basate sulla infusione di cellule T $CD8^+$.

(68)

Poco è conosciuto circa il destino delle cellule adottivamente trasferite. Dummer e colleghi **(59)** hanno mostrato che le cellule dei linfonodi trasferite in animali singenici possono migrare negli organi linfoidi secondari e nel tumore solo in topi irradiati.

In questo lavoro abbiamo mostrato che il trattamento con ciclofosfamide può efficientemente promuovere la sopravvivenza delle cellule adottivamente trasferite e il loro *homing* verso la milza e i linfonodi.

I nostri esperimenti mostrano che almeno due meccanismi sono responsabili della sopravvivenza e dell' *homing* cellulare: l'induzione di linfopenia che

produce “spazio” entro il compartimento linfoide e l’indiretta attività citotossica delle cellule Treg. (69)

Una importante questione è se le cellule trasferite adottivamente acquisiscano funzioni effettrici che possano successivamente portare al rigetto del tumore. Ebbene, i nostri esperimenti *in vitro* e *in vivo* mostrano che sia la proliferazione che l’attivazione delle cellule trasferite aumenta rendendo queste cellule competenti a rispondere alla stimolazione antigenica.

Successivamente allo studio degli effetti immunomodulatori della CTX, si è passati a valutare gli effetti del farmaco anche in presenza di cellule tumorali. Come è noto dalla letteratura, il trattamento con la ciclofosfamide riduce notevolmente le dimensioni della massa tumorale aumentando in tal modo la sopravvivenza degli animali.

Inoltre, a conferma dei risultati precedenti, in seguito al trattamento chemioterapico si osserva un aumento della percentuale delle cellule T CD4⁺ in tutti gli organi linfoidi periferici ed in particolar modo nel linfonodo drenante il tumore stesso.

È stato recentemente riportato che le cellule T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ si accumulano nel sangue periferico e nel microambiente tumorale di pazienti affetti da vari tipi di tumore. Il presente studio rafforza tali osservazioni mostrando che l’espansione delle Treg negli organi linfoidi di animali con tumore è correlata con il volume tumorale.

E’ stato poi dimostrato che la CTX induce non solo una diminuzione delle cellule neoplastiche, ma anche una parziale diminuzione delle cellule Treg in particolar modo nel linfonodo drenante il tumore in seguito al richiamo e all’attivazione delle cellule CD4⁺.

Tuttavia nella massa tumorale la ciclofosfamide induce un comportamento diverso.

Infatti la percentuale delle cellule Treg non subisce variazioni rispetto alle cellule T CD4⁺ mentre si osserva un abbassamento della percentuale dei linfociti CD4⁺ totali.

Il numero assoluto delle cellule Treg infiltranti il tumore si riduce drasticamente.

Insieme, questi risultati dimostrano che l'espansione delle cellule Treg durante la progressione del tumore costituisce un ostacolo al rigetto del tumore indotto dalle cellule T e un ostacolo al raggiungimento di una efficace immunoterapia tumorale.

La deplezione delle cellule Treg può esser ottenuta attraverso un singolo inoculo di ciclofosfamide potenziando in tal modo l'efficacia di una attiva immunoterapia specifica per il tumore.

Questi risultati rivelano un nuovo meccanismo attraverso cui la chemioterapia può influenzare la risposta antitumorale di linfociti trasferiti adottivamente e apre nuove prospettive per combinare chemioterapia e immunoterapia in pazienti con tumore allo scopo di raggiungere risposte cliniche ottimali.

Esperimenti successivi saranno volti a valutare il modo per aumentare la risposta immunitaria specifica contro il tumore attraverso immunoterapia combinata e sfruttando vaccini costituiti da cellule dendritiche presentanti antigeni tumorali.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutte le persone che mi sono state vicine e che mi hanno sostenuto nella realizzazione di questo lavoro.

In particolare, ringrazio il Prof. Gino Doria per avermi dato la possibilità di confrontarmi con una tematica a me sconosciuta, le mie colleghe Luigia, Cecilia, Beatrice, Sara, e non per ultima Ilaria per il loro preziosissimo aiuto, la disponibilità e per il supporto morale.

BIBLIOGRAFIA

“La terapia con ciclofosfamide riduce la frequenza delle cellule T regolatorie e promuove l’attivazione dei linfociti CD4⁺ T helper”

1. **Abbas A. K., Lichtman A. H.** 2001. Fondamenti di Immunologia.
2. **Kyewski B, Klein L.** A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:571-606.
3. **Von Boehmer H, Aifantis I, Gounari F, Azogui O, Haughn L, Apostolou I, Jaeckel E, Grassi F, Klein L.** Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev.* 2003;191:62-78.
4. **Rothenberg EV, Taghon T.** Molecular genetics of T cell development. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:601-49.
5. **Aluvihare VR, Betz AG.** The role of regulatory T cells in alloantigen tolerance. *Immunol Rev.* 2006;212:330-43.
6. **Kim JM, Rudensky A.** The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006;212:86-98.
7. **Mills KH.** Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol.* 2004;4:841-55.
8. **Fontenot JD, Rudensky AY.** A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol.* 2005;6:331-7.
9. **Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, Levine SS, Fraenkel E, von Boehmer H, Young RA.** Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature.* 2007;445:931-5.
10. **Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY.** Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature.* 2007;445:936-40.
11. **Wan YY, Flavell RA.** Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature.* 2007;445:766-70.

- 12. Williams LM, Rudensky AY.** Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol.* 2007;8:277-84.
- 13. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY.** Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature.* 2007;445:771-5.
- 14. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ.** Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol.* 2005;174:1783-6.
- 15. Schwartz RH.** Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol.* 2005;6:327-30.
- 16. Pace L., Rizzo S., Palombi C., Brombacher F. and Doria G.** Cutting edge: IL-4 induced protection of CD4⁺CD25⁻ Th cells from CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell-mediated suppression.. *J. Immunol.* 2006;176: 3900-4.
- 17. Kim JM, Rudensky A.** The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006;212:86-98.
- 18. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T.** Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006;212:8-27
- 19. Sakaguchi S.,** Regulatory T cells: meden agan. *Immunological Rev.* 2006;212: 5-7.
- 20. Li N, Workman CJ, Martin SM, Vignali DA.** Biochemical analysis of the regulatory T cell protein lymphocyte activation gene-3 (LAG-3; CD223). *J Immunol.* 2004;173:6806-12.

- 21. Sakaguchi S.** Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531-62
- 22. Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, Richter C, Weingarten P, Warger T, Knop J, Müllner S, Wijdenes J, Schild H, Schmitt E, Jonuleit H.** Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood.* 2007;110:1550-8.
- 23. Pontieri Giuseppe M.** Elementi di patologia generale. 2006
- 24. Douglas Hanahan and Robert A. Weiberg.** The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- 25. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G.** Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:715-27.
- 26. Hayakawa Y, Smyth MJ.** Innate immune recognition and suppression of tumors. *Adv Cancer Res.* 2006;95:293-322
- 27. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD.** Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol.* 2006;90:1-50.
- 28. Yoshirhiro Hayakawa and Mark Smyth.** Innate immune recognition and suppression of timours. *Advances in Cancer research.* 2006;293- 32.
- 29. Shankaran V., Ikeda, H, Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., and Schreiber, R. D.** IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001;410:1107-1111.

- 30 Hua Yu, Marcin Kortylewski and Drew Pardoll.** Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews* 2007;7:41-51.
- 31. Gabriel A. Rabinovich, Dmitry Gabrilovich, and Eduardo M. Sotomayor.** Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Ann Rev. Immunol.* 2007;25: 267-96.
- 32. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T.** Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev.* 2001;182:18-32.
- 33. Shevach EM.** CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:389-400.
- 34. Murakami M, Sakamoto A, Bender J, Kappler J, Marrack P.** CD25⁺CD4⁺ T cells contribute to the control of memory CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:8832-7.
- 35. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Buren-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A.** CD25⁺ CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol.* 2001;166:3008-18.
- 36. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL.** CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature.* 2002;420:502-7.
- 37. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA.** B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 2000;12:431-40.

- 38. Wu AJ, Hua H, Munson SH, McDevitt HO.** Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4⁺CD25⁺ T cell levels in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:12287-92.
- 39. Hara M, Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR, Morris PJ, Powrie F, Wood KJ.** IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol.* 2001;166:3789-96
- 40. Graca L, Thompson S, Lin CY, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H.** Both CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ and CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁻⁾ regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol.* 2002;168:5558-65.
- 41. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S.** Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol.* 1999;163:5211-8.
- 42. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E.** Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1999;59:3128-33
- 43. Golgher D, Jones E, Powrie F, Elliott T, Gallimore A.** Depletion of CD25⁺ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol.* 2002;32:3267-75
- 44. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, Zitvogel L.** Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med.* 2005;202:919-29.
- 45. Weiping Z,** Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nature Immunology* 2006;6:295-307.
- 46. North RJ,** Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *Journal of Experimental Medicine.* 1982;155:1063-1074.

- 47. Proietti E., Greco G., Garrone B., Baccarini S., Mauri C., Venditti M., Carlei D. and Belardelli F.** Importance of cyclophosphamide- induced Bystander Effect on T Cells for a Successful Tumor Eradication in response to Adoptive Immunotherapy in Mice. *J. Clin. Invest.* 1998;101: 429-441.
- 48. Bracci L., Morchella F., Sestili P., La Sorsa V., Valentini M., Canini I., Baccarini S., Maccari S., Ramoni C., Belardelli F. and Proietti E.** Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B-Cell and T-Cell homeostatic proliferation, and specific tumor infiltration. *Clin. Cancer Res.* 2007;13:644-653.
- 49. Schiavoni G., Mattei F., Di Pucchio T., Santini S.M., Bracci L., Belardelli F. and Proietti E.** Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of Cd44^{hi}T lymphocytes in mice:implications foe strategies of chemoimmunotherapy of cancer. *Blood* 2000;95:2024-2030.
- 50. Zheng G, Liu S, Wang P, Xu Y, Chen A.** Arming tumor-reactive T cells with costimulator B7-1 enhances therapeutic efficacy of the T cells. *Cancer Res.* 2006;66:6793-9.
- 51. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP.** Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 2004;10:909-15.
- 52. Waldmann TA.** Effective cancer therapy through immunomodulation. *Annu Rev Med* 2006;57:65-81.
- 53. Song W, Levy R.** Therapeutic vaccination against murine lymphoma by intratumoral injection of naive dendritic cells. *Cancer Res* 2005;.65:5958-64.
- 54. Maksimow M, Miiluniemi M, Marttila-Ichihara F, Jalkanen S, Hänninen A.** Antigen targeting to endosomal pathway in dendritic cell

vaccination activates regulatory T cells and attenuates tumor immunity. *Blood* 2006;108:1298-305.

55. Galea-Lauri J, Wells JW, Darling D, Harrison P, Farzaneh F. Strategies for antigen choice and priming of dendritic cells influence the polarization and efficacy of antitumor T-cell responses in dendritic cell-based cancer vaccination. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53:963-77.

56. Finney, D. J.. Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin and Company Ltd. London, 1964; 22-26

57. Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4⁺ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 1998;10:588-94.

58. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6:345-52.

59. Dummer W, Niethammer AG, Baccala R, Lawson BR, Wagner N, Reisfeld RA, Theofilopoulos AN. T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity. *J Clin Invest.* 2002;110:185-92.

60. Emens LA, Jaffee EM. Leveraging the activity of tumor vaccines with cytotoxic chemotherapy. *Cancer Res* 2005;65:8059-64.

61. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science.* 2002;298:850-4.

62. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-

- Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, Rosenberg SA.** Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2005;23:2346-57.
- 63. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S.** Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol.* 1999;163:5211-8.
- 64. Casares N, Arribillaga L, Sarobe P, Dotor J, Lopez-Diaz de Cerio A, Melero I, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ.** CD4⁺/CD25⁺ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4⁺ T cells with IFN-gamma-dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination. *J Immunol.* 2003;17:5931-9.
- 65. Zou W.** Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005;263-74.
- 66. Chattopadhyay S., Chakraborty N.G., Mukherji B.** Regulatory T cells and tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 2005; 54:1153-1161.
- 67. Jameson SC.** Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2002;547-56.
- 68. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry RM, Marincola FM, Leitman SF, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Nahvi A, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA.** A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Immunother.* 2002;25:243-51.
- 69. Maine GN, Mulé JJ.** Making room for T cells. *J Clin Invest* 2002;110:157-9.

Parole chiave: ciclofosfamide, cellule Treg, immunoterapia adottiva, chemioterapia, tumori.

Abbreviazioni: Ag, antigene; CFSE, carboxyfluorescein diacetate-succinimidyl ester; CTX, ciclofosfamide; DC, cellule dendritiche; LN, linfonodi; mAb, anticorpo monoclonale; NT, animali non trattati; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; T DO11.10 TCR/EP OVA, cellule T transgeniche per un epitopo dell'antigene ovalbumina (OVA); Tg, transgenico; Treg, cellule T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.