



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CLINICHE**

Indirizzo in Medicina Clinica e Sperimentale

CICLO XXVI

COORDINATORE Prof. Giacomo Laffi

***Studio della risposta T immuno-specifica in corso di
tumori dell'apparato digerente***

Settore Scientifico Disciplinare MED/09

Dottorando
Dott. Nicolai Elena

Tutore
Prof. Amedei Amedeo

Coordinatore
Prof. Laffi Giacomo

Anni 2011/2013

INDICE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUZIONE..... | 1 |
| 1. IMMUNOLOGIA DEI TUMORI..... | 1 |
| 1.1 <i>La teoria dell'immuno-editing</i> | 2 |
| 1.2 <i>L'immuno-editing nell'uomo</i> | 7 |
| 1.3 <i>Antigeni tumorali e Immunogenicità dei tumori</i> | 9 |
| 1.4 <i>Immuno-editing e Immunoterapia</i> | 12 |
| 2. LINFOCITI T E TUMORI..... | 14 |
| 2.1 <i>Linfociti T CD4⁺</i> | 15 |
| 2.2 <i>Linfociti T CD8⁺</i> | 21 |
| 3. I TUMORI DELL'APPARATO DIGERENTE..... | 22 |
| 3.1 CARCINOMA GASTRICO..... | 23 |
| 3.1.1 <i>Eziologia</i> | 24 |
| 3.1.2 <i>Manifestazioni cliniche e prognosi</i> | 25 |
| 3.1.3 <i>Terapia</i> | 25 |
| 3.2 CARCINOMA COLORETTALE | 26 |
| 3.2.1 <i>Eziologia</i> | 27 |
| 3.2.2 <i>Manifestazioni cliniche e prognosi</i> | 28 |
| 3.2.3 <i>Terapia</i> | 29 |
| 3.3 CARCINOMA PANCREATICO..... | 29 |
| 3.2.1 <i>Fattori di rischio e predisposizione genetica</i> | 30 |
| 3.2.2 <i>Manifestazioni cliniche e prognosi</i> | 31 |
| 3.2.3 <i>Terapia</i> | 32 |
| SCOPO..... | 34 |
| MATERIALI E METODI..... | 37 |
| <i>Casistica</i> | 37 |
| <i>Reagenti</i> | 40 |
| <i>Tipizzazione HLA</i> | 42 |
| <i>Induzione di linee linfocitarie Tdagli infiltrati tissutali</i> | 42 |

| | |
|--|-----------|
| <i>Preparazione dei cloni T</i> | 42 |
| <i>Analisi citofluorimetrica dei marker superficiali e intracitoplasmatici delle cellule T</i> | 43 |
| <i>Analisi della specificità dei cloni T verso gli Antigeni Tumore Associati (TAA)</i> | 43 |
| <i>Analisi del repertorio delle catene Vβ del TCR dei cloni T-TAA specifici</i> | 43 |
| <i>Caratterizzazione del profilo citochinico dei cloni T TAA-specifici</i> | 44 |
| <i>Preparazione dei linfociti B e loro immortalizzazione con il virus di Epstein-Barr (EBV)</i> | 44 |
| <i>Metodo di misurazione dell'attività citotossica legata al sistema delle perforine</i> | 45 |
| <i>Metodo per la determinazione della capacità dei cloni linfocitari T di indurre apoptosi mediata da Fas-fasl</i> | 45 |
| <i>Ricerca di cellule T TAA-specifiche nel sangue periferico dei pazienti</i> | 46 |
| <i>Induzione di linee cellulari T TAA-specifiche</i> | 46 |
| <i>Analisi citofluorimetrica della produzione citochinica intracitoplasmatica delle linee T TAA-specifiche</i> | 46 |
| <i>Metodo per la valutazione delle capacità soppressive dei cloni Treg TAA-specifici</i> | 47 |
| <i>ELISA</i> | 47 |
| <i>Analisi statistica</i> | 47 |
| RISULTATI E DISCUSSIONE | 49 |
| 1. VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNE T SPECIFICA PER ANTIGENI TUMORALI ASSOCIATI AL CANCRO GASTRICO (GCAA) . | 49 |
| <i>1.1 Linfociti T GCAA-specifici infiltrano il tessuto neoplastico dei pazienti con adenocarcinoma gastrico</i> | 50 |
| <i>1.2 Funzioni effettrici dei cloni T GCAA-specifici</i> | 56 |
| <i>1.3 Valutazione dell'attività citotossica e pro-apoptotica dei cloni T GCAA-specifici</i> | 57 |
| <i>1.4 Presenza di linfociti T GCAA-specifici nel sangue periferico dei pazienti con adenocarcinoma gastrico</i> | 58 |

| | |
|---|-----------|
| 1.5 Prevalenza di un fenotipo Th1/Tc1 in linee T GCAA peptide-specifiche ottenute dalle PBMC di pazienti con adenocarcinoma gastrico | 58 |
| 1.6 DISCUSSIONE | 60 |
| 2. VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNE T ENOA-SPECIFICA IN PAZIENTI CON ADENOCARCINOMA PANCREATICO..... | 63 |
| 2.1 Caratterizzazione dei linfociti T infiltranti il tumore pancreatico | 64 |
| 2.2 Presenza di cellule Treg intratumorali nei pazienti con AP..... | 68 |
| 2.3 Presenza di linfociti T ENOA-specifici in pazienti con AP. | 70 |
| 2.4 Valutazione dell'attività citotossica dei cloni T ENOA-specifici. | 72 |
| 2.5 Presenza di linfociti T ENOA-specifici e di anticorpi anti-ENOA nel sangue periferico dei pazienti con AP. | 74 |
| 2.6 Cellule Treg ENOA-specifiche inibiscono le funzioni delle cellule T effettrici..... | 76 |
| 2.7 DISCUSSIONE. | 77 |
| 3. VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNE T PDIA3-SPECIFICA IN PAZIENTI CON CARCINOMA COLORETTALE | 81 |
| 3.1 Caratterizzazione dei linfociti T infiltranti il tumore coloretale | 82 |
| 3.2 Presenza di cellule Treg intratumorali nei pazienti con CCR..... | 84 |
| 3.3 Presenza di cloni T PDIA3-specifici in pazienti con CCR | 85 |
| 3.4 Valutazione dell'attività citotossica dei cloni T PDIA3-specifici..... | 87 |
| 3.5 DISCUSSIONE | 88 |
| | |
| CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE | 91 |
| | |
| BIBLIOGRAFIA | 93 |

INTRODUZIONE

1. IMMUNOLOGIA DEI TUMORI

L'idea che il sistema immunitario potesse controllare lo sviluppo dei tumori è stata oggetto di dibattito per oltre un secolo. Agli inizi del 1900 Paul Ehrlich fu il primo a sostenere che cellule maligne si formino frequentemente nel corso della vita e che sul loro plasmalemma compaiano continuamente nuove molecole antigeniche contro le quali l'ospite può produrre una risposta anticorpale che, nella maggior parte dei casi, sarebbe sufficiente a eliminare gli elementi neoplastici (Ehrlich, 1909). All'epoca, poco si sapeva sulla composizione e sulle funzioni del sistema immunitario (SI) per stimare la validità di tale affermazione. Cinquant'anni più tardi Thomas sviluppò l'ipotesi che, nel corso dell'evoluzione della specie, lo sviluppo dell'immunità cellulare fosse stimolato dalla necessità di rigettare le cellule maligne insorte per mutazione somatica (Thomas, 1959). Burnet, nel corso degli anni '70, sotto la spinta della scoperta dei meccanismi immunologici del rigetto dei trapianti, da parte dei linfociti T, elaborò l'ipotesi più radicale del controllo del SI sullo sviluppo dei tumori, nota come "Teoria dell'immunosorveglianza". Burnet ipotizzò che i meccanismi di rigetto, estremamente precisi ed efficienti, fossero deputati all'eliminazione delle cellule potenzialmente neoplastiche. Egli coniò il termine "sorveglianza immunologica" per definire la capacità dell'ospite di riconoscere tempestivamente i cloni cellulari maligni non appena emergono, in modo da distruggerli prima che la massa tumorale possa raggiungere dimensioni critiche (Burnet, 1973). Tuttavia, studi successivi di Stutman, fornirono scarso supporto alla sua ipotesi; in particolare, i suoi esperimenti dimostrarono che la suscettibilità ai tumori, sia spontanei sia indotti da carcinogeni chimici, in topi immunocompetenti e in topi nudi (atimici) non differisse affatto (Stutman, 1974; Stutman, 1975). Sulla base di tali dati la teoria dell'immunosorveglianza entrò in crisi. Alcuni ricercatori obiettarono, infatti, che le cellule tumorali non possedessero gli appropriati "segnali di pericolo" necessari all'attivazione del SI in presenza di cellule estranee (Matzinger, 1994) e che, al contempo, le cellule dell'immunità sarebbero tolleranti verso le cellule tumorali perché troppo simili alle cellule normali da cui derivano (Pardoll, 2003). Con il miglioramento delle tecniche d'ingegneria genetica, negli anni '90, furono condotti esperimenti su nuovi modelli murini d'immunodeficienza che permisero di risollevarne la teoria del controllo dell'immunità sui

tumori. In particolare, l'interesse verso l'ipotesi dell'immunosorveglianza del cancro fu alimentato dalla scoperta del ruolo dell'interferon- γ (IFN- γ) nel determinare il rigetto di cellule tumorali trapiantate (Dighe *et al*, 1994) e dalla dimostrazione che topi non responsivi all'IFN- γ (topi transgenici senza recettore per IFN- γ o senza il fattore di trascrizione STAT1, necessario nella trasduzione del segnale da esso mediata) o con immunità adattativa compromessa (topi transgenici RAG2^{-/-} privi di linfociti B, T e di cellule T Natural Killer (NKT)) erano molto più suscettibili alla formazione di tumori spontanei o indotti da carcinogeni (Kaplan *et al*, 1998; Shankaran *et al*, 2001). Altri laboratori iniziarono presto a riportare risultati simili, collezionando i dati necessari a sostenere il ruolo del SI nella soppressione tumorale (Smyth *et al* 2000 a; Smyth *et al* 2000 b; Street *et al*, 2002; Girardi *et al*, 2001).

Ad oggi, riconosciamo al SI almeno tre funzioni con cui può prevenire lo sviluppo dei tumori: (i) protezione dell'ospite da infezioni virali e quindi da tumori virus-indotti; (ii) prevenzione dell'instaurarsi di un microambiente infiammatorio favorente la tumorigenesi eliminando i patogeni e risolvendo rapidamente lo stato infiammatorio; (iii) eliminazione da parte di cellule dell'immunità specifica di cellule trasformate che esprimono antigeni tumorali e molecole accessorie in grado di attivare le cellule dell'immunità innata.

Per quanto il ruolo dell'immunità nel controllo dello sviluppo dei tumori sia stato ampiamente dimostrato, è noto come molte neoplasie si sviluppino comunque in soggetti che non soffrono d'immunodeficienze manifeste. È pertanto evidente che le cellule tumorali sono in grado di sviluppare meccanismi che gli permettono di eludere il SI dell'ospite immunocompetente.

1.1. La teoria dell'immuno-editing

Nel 2001, studi che mostravano come tumori formati in topi carenti di un SI intatto, erano più immunogenici (detti “*unedited*”) rispetto a tumori simili derivati da topi immunocompetenti (detti “*edited*”), ha portato ad una sostanziale revisione della teoria dell'immunosorveglianza, oggi definita immuno-editing dei tumori (Shankaran *et al*, 2001; Dunn *et al*, 2002) (Figura 1). Il concetto che il SI non solo protegga l'ospite dalla formazione del tumore ma che ne plasmi, inoltre, l'immunogenicità è alla base di questa nuova ipotesi, che sottolinea il dualismo del SI nel proteggere l'ospite dallo sviluppo del tumore da un lato e nel promuovere la progressione tumorale dall'altro. Nella sua forma più complessa l'immuno-editing consiste di tre fasi sequenziali: eliminazione, equilibrio, ed evasione o *escape* (Figura 1). In alcuni casi le cellule tumorali possono entrare

direttamente nella fase di equilibrio o in quella di *escape*, saltando la prima fase di eliminazione. Fattori esterni, come stress ambientali, interventi terapeutici o il deterioramento del SI legato all'età, possono influenzare questo percorso.

Eliminazione. La fase di eliminazione corrisponde ad una moderna versione della teoria dell'immunosorveglianza, che prevede che il SI innato e quello adattativo, lavorino assieme per rilevare la presenza di tumori in via di sviluppo e per distruggerli prima che diventino clinicamente evidenti. I meccanismi con cui il SI viene allertato della presenza di tumori non sono del tutto chiari. Tra le possibilità ci sono: (i) i classici segnali di "pericolo" (*danger signals*) come gli interferoni (IFNs) di I tipo, citochine prodotte precocemente in presenza di un tumore in via di sviluppo (Matzinger, 1994), in grado di attivare le cellule dendritiche (*dendritic cells*, DC) che inducono risposte immunitarie di tipo adattativo; (ii) profili molecolari associati al danno o DAMPs (*damage-associated molecular pattern molecules*), molecole rilasciate direttamente dalle cellule tumorali morenti o dai tessuti danneggiati che si formano quando i tumori solidi iniziano ad espandersi invadendo i tessuti circostanti (Sims *et al*, 2010); (iii) ligandi indotti da stress come MICA/B che sono frequentemente espressi sulla superficie delle cellule tumorali e che, legandosi a recettori di attivazione delle cellule dell'immunità innata, determinano il rilascio di citochine proinfiammatorie e immunomodulanti, generando un microambiente che facilita lo sviluppo di risposte adattative tumore-specifiche (Guerra *et al*, 2008). Sebbene in alcuni sistemi sperimentali l'attivazione del sistema innato possa prevenire lo sviluppo di tumori, nella maggior parte dei casi l'eliminazione può avvenire solo con l'intervento di risposte adattative, ed in particolare con l'espressione sulle cellule tumorali di antigeni tumorali in grado di promuovere l'attivazione e l'espansione di cellule T CD4⁺ e CD8⁺ effettrici. Quindi, l'attivazione coordinata delle risposte innate e di quelle specifiche, è fondamentale per proteggere l'ospite dallo sviluppo di neoplasie; se il SI è in grado di distruggere ogni cellula tumorale, la fase di eliminazione rappresenta la fase finale del processo di immuno-editing. Nonostante la fase di eliminazione non sia mai stata osservata *in vivo*, la sua esistenza è stata dimostrata dall'osservazione che topi carenti in cellule dell'immunità, in vie effettrici, citochine, o molecole di riconoscimento, mostrano una rapida insorgenza e una maggiore penetranza delle neoplasie indotte (Vesely *et al*, 2011).

Equilibrio. Se alcune varianti cellulari del tumore riescono ad eludere la fase di eliminazione, si entra nella fase di equilibrio, in cui il SI adattativo lavora per prevenire la

crescita del tumore, determinando però una lenta perdita dell'immunogenicità da parte delle cellule tumorali. La fase di equilibrio può rappresentare la fase più lunga di tutto il processo, potendo durare anche per tutta la vita dell'ospite. In questa fase, il SI impedisce la crescita e l'espansione del tumore, mantenendo le cellule neoplastiche residue in uno stato funzionale di latenza, detta “*dormancy*” (dormienza) (Aguirre-Ghiso, 2007). L'esistenza di questa condizione di equilibrio immunologicamente mediata è stata dimostrata da esperimenti di cancerogenesi, in cui topi immunocompetenti trattati con basse dosi di un carcinogeno chimico (metilcolantrene, MCA), sviluppavano cellule tumorali che rimanevano a lungo occulte, senza che si formasse nessuna massa tumorale evidente (Koebel *et al*, 2007). Quando le risposte immunitarie adattative di questi topi venivano depletate (attraverso somministrazione di anticorpi monoclonali che inattivavano le cellule T e l'IFN- γ), il tumore appariva rapidamente nel punto di inoculo del MCA. Le cellule tumorali isolate da queste lesioni erano altamente immunogeniche come le cellule tumorali di un sarcoma “*unedited*” derivato da topi immunodeficienti RAG2^{-/-} trattati con lo stesso agente carcinogeno. Analisi dettagliate hanno rivelato che è proprio il SI adattativo, ed in particolare l'interleuchina 12 (IL-12), l'IFN- γ e le cellule T CD4⁺ e CD8⁺, e non quello innato, a mantenere le cellule tumorali in uno stato di quiescenza. Durante tutta la fase di equilibrio, però, il SI, mentre lavora per tenere sotto controllo le cellule tumorali, eliminando i sottocloni fortemente immunogeni, esercita una pressione selettiva che favorisce la comparsa di varianti in grado di eludere i meccanismi immunitari.

Escape. Nella fase di evasione le cellule tumorali acquisiscono la capacità di sfuggire al SI, dando origine ad una massa tumorale clinicamente evidenziabile. La progressione dalla fase di equilibrio a quella di *escape* si può verificare perché le cellule tumorali cambiano sotto la pressione selettiva esercitata dal SI, oppure perché le risposte immunitarie dell'ospite si deteriorano sotto la pressione immunosoppressiva esercitata dal tumore. L'*escape* tumorale può verificarsi attraverso differenti meccanismi (Vesely *et al*, 2011; Dunn *et al*, 2002; Dunn *et al*, 2004; Smyth *et al*, 2006; Zitvogel *et al*, 2006; Khong *et al*, 2002):

- Predominanza selettiva di varianti antigene-negative, ovvero di cellule tumorali che non esprimono sulla superficie antigeni in grado di innescare reazioni di rigetto, diventando invisibili per il SI.
- Perdita o ridotta espressione da parte delle cellule cancerose, delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (*major histocompatibility complex*,

MHC) di classe I, necessarie per presentare l'antigene alle cellule T tumore-specifiche, eludendo così l'attacco dei linfociti T citotossici (*Cytotoxic T lymphocytes*, CTL) CD8⁺.

- Perdita della costimolazione; anche in presenza di cellule tumorali in grado di presentare complessi MHC-peptide alle cellule linfocitarie, l'assenza di molecole costimolatorie non solo impedisce ai linfociti di attivarsi ma può renderli anergici o addirittura indurli all'apoptosi.
- Apoptosi delle cellule T citotossiche, dovuta all'espressione da parte delle cellule tumorali del ligando di Fas, che elimina i linfociti T tumore-specifici esprimenti Fas, con cui queste entrano in contatto.
- Generazione di un microambiente tumorale immunosoppressivo. Le cellule tumorali sono in grado di determinare l'insorgenza di uno stato immunosoppressivo attraverso la produzione di citochine, come il vascular endothelial growth factor (VEGF), il transforming growth factor- β (TGF- β), la galectina, l'indolamina 2,3-diossigenasi (IDO), e attraverso il reclutamento di cellule regolatorie dell'immunità che sopprimono le risposte immuni. Le cellule T regolatorie (Treg) e le cellule soppressorie di derivazione mieloide (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) sono i due tipi principali di leucociti immunosoppressivi che giocano un ruolo importante nell'inibire le risposte antitumorali. Le cellule Treg, sono linfociti T CD4⁺, che esprimono costitutivamente il recettore CD25 e il fattore di trascrizione Foxp3. Quando stimolate, queste cellule inibiscono le funzioni di linfociti T tumore-specifici effettori, attraverso: (i) la produzione di citochine immunosoppressive come IL-10 e TGF- β ; (ii) espressione di molecole costimolatorie inibitorie come CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), PD-1 (*Programmed cell death-1*) e PD-L1 (*Programmed cell death 1 ligand 1*); (iii) consumo di IL-2, citochina critica per il mantenimento delle funzioni dei CTL. Le MDSC sono un gruppo eterogeneo di cellule costituite da progenitori mieloidi e da cellule mieloidi immature che inibiscono le funzioni linfocitarie attraverso: (i) l'induzione di cellule Treg; (ii) la produzione di TGF- β ; (iii) la deplezione e il sequestro degli aminoacidi arginina, triptofano e cisteina, necessari per il funzionamento dei linfociti T; (iv) nitrificazione dei recettori per chemochine o dei TCR (*T cell receptor*) espressi dai linfociti T tumore-specifici.

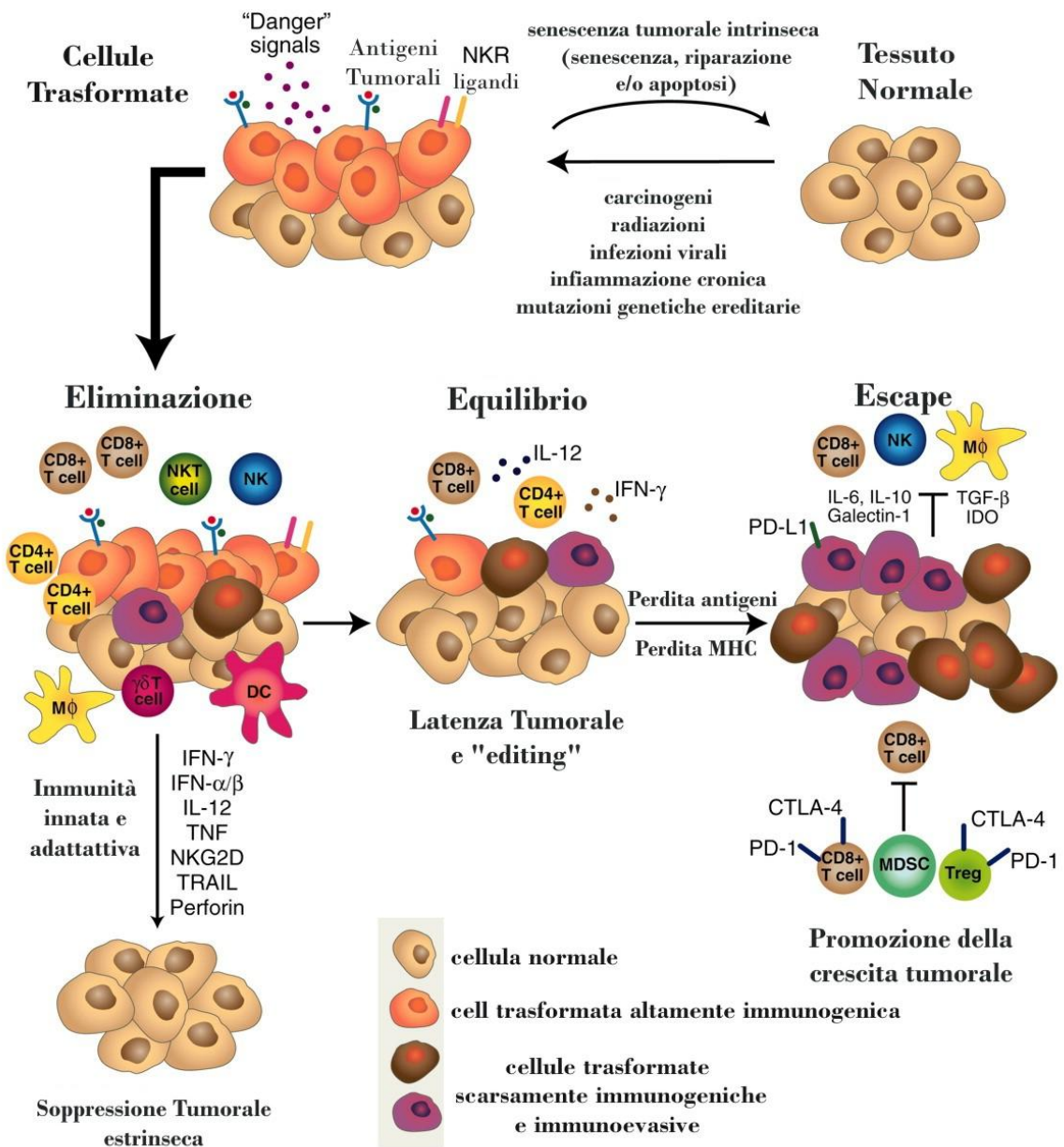


Figura 1. Rappresentazione grafica delle fasi che compongono l'immuno-editing dei tumori.

1.2 L'immuno-editing nell'uomo

Per quanto gli studi condotti sui topi siano stati determinanti per formulare la teoria dell'immuno-editing, alcune osservazioni hanno reso possibile estendere tale ipotesi anche all'uomo, confermando come il SI sia in grado di modificare lo sviluppo dei tumori nei pazienti neoplastici. In particolare, abbiamo tre tipi di prove scientifiche a sostegno di questa ipotesi.

- a. *La risposta immune intratumorale ha valore prognostico nei pazienti.* La prova più forte a sostegno dell'immuno-editing dei tumori nell'uomo è rappresentata da studi che correlano la quantità, la qualità e la distribuzione spaziale dei linfociti infiltranti il tumore (*tumor infiltrating lymphocytes*, TIL) con la sopravvivenza dei pazienti. La presenza nell'infiltrato tumorale di linfociti Th1 (T *helper* 1) CD4⁺ e di cellule T CD8⁺ producenti IFN- γ , e di citochine come TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) e IFN- γ , è stata associata con un miglioramento della prognosi in pazienti affetti da vari tipi di tumore. I primi studi condotti sul melanoma associarono la presenza di TIL ad una prognosi favorevole dei pazienti (Clark *et al*, 1989; Clemente *et al*, 1996). Studi successivi dimostrarono che la presenza e la localizzazione di TIL CD8⁺ avevano particolare importanza nell'influenzare l'andamento clinico dei pazienti affetti da tumori del colon-retto; in particolare, l'accumulo di cellule T CD8⁺ all'interno del tumore correlava con una maggiore sopravvivenza dei pazienti, mentre l'accumulo delle stesse cellule ai margini della lesione tumorale non aveva alcun effetto in tal senso (Naito *et al*, 1998). Studi condotti su cancro ovarico, melanoma e cancro del colon non solo confermarono queste osservazioni ma dimostrarono come, ad essere determinante nella prognosi, fosse la distribuzione e il rapporto tra cellule CD8⁺ e cellule Treg (Sato *et al*, 2005; van Houdt *et al*, 2008; Pagès *et al*, 2005; Galon *et al*, 2006). Lavori recenti condotti su pazienti affetti da tumori del colon e del polmone forniscono, inoltre, dei valori quantitativi delle variabili in gioco, tali per cui il tipo e la quantità dei TIL risulterebbero indicatori prognostici più potenti dei tradizionali criteri patologici di stadiazione tumorale (Pagès *et al*, 2005; Galon *et al*, 2006).
- b. *Esiste una risposta immune "spontanea" nei pazienti neoplastici.* Un'importante passo avanti nel campo dell'immunologia dei tumori fu fatto con la dimostrazione che alcuni pazienti neoplastici sviluppano elevate quantità di anticorpi e di risposte cellulari T mediate nei confronti di antigeni espressi dal tumore (Dougan *et al*, 2009). Queste risposte si osservano generalmente in pazienti con tumori in

progressiva espansione, indicando che il riconoscimento del tumore da parte del SI non sempre comporta una protezione efficace. In ogni caso, non c'è modo di sapere se queste risposte influenzino la velocità e le caratteristiche della crescita tumorale e se rappresentino la prova di ciò che accade in corso di una fase di eliminazione o di equilibrio come ipotizzato nella teoria dell'immuno-editing.

- c. *L'immunodeficienza si associa ad un rischio elevato di cancro.* Un'aumentata incidenza di neoplasie è stata osservata in individui immunodeficienti, come soggetti immunosoppressi per sottoporsi a trapianto o soggetti affetti da AIDS (Dunn *et al*, 2002; Vesely *et al*, 2011). Sebbene i tumori che insorgono in questi pazienti abbiano frequentemente un'eziologia virale, come i linfomi (Epstein-Barr virus), il sarcoma di Kaposi (herpes virus) e il tumore della cervice uterina (Human papilloma virus), ci sono comunque evidenze che questi pazienti abbiano una maggiore probabilità di sviluppare tumori maligni del colon, del polmone, del pancreas, del rene, di testa e collo, e melanoma; ad esempio, l'incidenza di melanoma è da 2 a 10 volte superiore alla media nei pazienti sottoposti a trapianto renale. Una dimostrazione interessante del ruolo del SI nei tumori umani viene dall'osservazione di casi clinici in cui un cancro è stato trasferito da un donatore ad un ricevente immunosoppresso (Kauffman *et al*, 2002; Mackie *et al*, 2003). In particolare, uno studio riporta come due individui sottoposti a trapianto di reni provenienti dallo stesso cadavere siano in seguito deceduti per l'insorgenza di un melanoma; l'analisi del tessuto tumorale mostrò come in entrambi i casi le cellule melanomatose derivassero dal donatore d'organi. L'analisi delle cartelle cliniche rivelò che il donatore, sedici anni prima della morte, aveva sviluppato un melanoma poi trattato con successo. L'interpretazione di quanto osservato è che i suoi reni contenessero cellule di melanoma mantenute dalle cellule immunitarie in una condizione di latenza e che il trasferimento dei reni in soggetti immunosoppressi avrebbe liberato le cellule tumorali dal controllo immunitario esistente nel donatore permettendo a tali cellule di crescere in un microambiente favorevole e permissivo. Queste osservazioni sarebbero la dimostrazione diretta dell'esistenza delle fasi di equilibrio ed *escape*.

1.3 *Antigeni Tumoriali e Immunogenicità dei Tumori*

Il principio cardine dell'immunologia dei tumori si basa sull'espressione da parte delle cellule cancerose di antigeni che le differenziano dalla loro controparte cellulare non trasformata. Sebbene, infatti, i tumori derivino da tessuti autologhi, essi esprimono sulla superficie cellulare molecole riconosciute come estranee dal SI, derivate da mutazioni o dall'espressione deregolata di geni normali. I tumori causati da virus oncògeni, inoltre, possono esprimere proteine virali, per lo più proteine nucleari, che hanno un ruolo nel mantenimento dello stato trasformato (Delves *et al*, 2000). I prodotti di geni mutati, deregolati o virali possono essere riconosciuti come estranei dai linfociti T o B, in quanto essi non erano espressi sui tessuti autologhi precedentemente allo sviluppo del tumore, o erano espressi a livelli sufficientemente bassi da non indurre tolleranza. Queste proteine possono pertanto stimolare risposte immuni specifiche. Alternativamente, i prodotti di geni mutati o deregolati possono determinare la sintesi anormale di molecole non proteiche, quali carboidrati e lipidi, che possono essere riconosciuti come antigeni tumorali dai linfociti B. Inoltre, proteine di membrana espresse sui tumori in mancanza di molecole MHC di classe I possono funzionare come bersaglio per cellule effettrici dell'immunità innata, come le cellule NK (*Natural Killer*).

L'esistenza degli antigeni tumorali fu per la prima volta sostenuta dal riscontro sulla superficie cellulare di tumori sperimentali di antigeni tumore-specifici di trapianto (*Tumor-Specific Transplantation Antigen*, TSTA), in grado di provocare il rigetto di tumori innestati in animali preimmunizzati mediante innesto di tumore seguito da ablazioni chirurgiche, oppure mediante inoculo di cellule tumorali uccise (Old *et al* 1964). La presenza di antigeni tumorali fu da allora dimostrata per un'ampia varietà di tumori, non solo sperimentalmente indotti (da agenti carcinogeni, virus e radiazioni) ma anche di origine spontanea (Old, 1981; van der Bruggen *et al*, 1991; Sahin, 1995). Nel caso dei tumori umani, l'identificazione degli antigeni tumorali ha richiesto lo sviluppo di avanzate tecniche di rilevazione e clonaggio, con l'impiego di anticorpi e di linfociti T citotossici derivati da pazienti neoplastici e specifici per il tumore autologo (Knuth *et al*, 1984). Gli antigeni tumorali possono essere classificati in base al profilo di espressione, in antigeni tumore-specifici (*Tumor Specific Antigen*, TSA) ed antigeni tumore-associati (*Tumor Associated Antigen*, TAA).

I TSA sono antigeni espressi esclusivamente sulle cellule neoplastiche e sono quindi potenzialmente in grado di evocare una risposta immune spontanea nell'ospite in quanto

riconosciuti come antigeni estranei. I tipi principali di antigeni tumorali appartenenti al gruppo dei TSA sono:

- Antigeni prodotti da mutazioni: possono derivare da (i) mutazioni di geni il cui prodotto non è correlato al fenotipo trasformato e la cui funzione è sconosciuta; (ii) mutazioni avvenute a livello delle sequenze nucleotidiche di proto-oncogeni (es. *ras*, *erb-B*, *CDK4*) e di oncosoppressori (es. *p53*, *BRCA-1* e *2*, *Rb*), geni che regolano i processi di crescita e differenziamento cellulare, i cui prodotti alterati determinano la trasformazione e la promozione tumorale. Dato che queste mutazioni sono presenti solo nelle cellule neoplastiche, i linfociti T diretti contro di essi sono altamente tumore-specifici.
- Antigeni virali: antigeni che derivano da virus oncogeni; virus a DNA ed a RNA sono implicati nello sviluppo di tumori sia sperimentali che spontanei. Tali tumori presentano di solito il genoma provirale integrato nel patrimonio genetico delle cellule ospiti. Le cellule neoplastiche esprimono spesso antigeni codificati dal genoma virale; le relative proteine vengono sintetizzate in maniera endogena e processate, e i complessi costituiti dai peptidi virali e dalle molecole MHC di classe I vengono quindi espressi sulla membrana. Di conseguenza le cellule tumorali che esprimono antigeni virali possono stimolare una risposta linfocitaria T specifica e diventare il bersaglio elettivo. Esempi di questi tipi di antigeni tumorali sono peptidi derivati dalla proteina E7 del papilloma umano (HPV-16) nel carcinoma della cervice uterina e i prodotti del virus di Epstein-Barr nel linfoma di Burkitt e nel carcinoma naso-faringeo.
- Antigeni derivanti da geni normalmente silenti: questi antigeni sono codificati da geni che sono virtualmente silenti in tutti i tessuti adulti normali, ma che sono espressi in molti tipi istologici di neoplasie. Prototipi di questi antigeni sono quelli codificati dalla famiglia dei geni *MAGE*. Il testicolo, rappresenta l'unico organo normale in cui sono presenti proteine *MAGE*, ma siccome le cellule germinali maschili non esprimono molecole HLA (*Human Leukocyte Antigen*), esse non possono esporre gli antigeni *MAGE* sulla loro superficie. Pertanto, dal punto di vista pratico, questi antigeni sono da considerare tumore-specifici. A differenza di altri TSA di tumori sperimentalmente indotti da sostanze chimiche, questi antigeni non sono specifici di un singolo tumore ma, al contrario, lo stesso antigene è condiviso da numerosi tipi diversi di neoplasie. L'antigene *MAGE-1*, scoperto inizialmente nei melanomi ed espresso nel 37% di questi tumori, è, infatti, espresso

anche nei carcinomi del polmone, del fegato, dello stomaco, dell'esofago e della vescica urinaria (Roch *et al*, 2010; Ogata *et al*, 2011; Yanagawa *et al*, 2011; Haier *et al*, 2006; Fradet *et al*, 2005).

I TAA, sono antigeni espressi anche sulle cellule normali ma che compaiono sulla superficie delle cellule tumorali in modo abnorme per quantità, sede e tempo; tali antigeni, soltanto raramente, inducono una risposta immune nell'ospite in quanto nei loro confronti esso è generalmente tollerante. Possono essere suddivisi in:

- Antigeni oncofetali: sono proteine di norma espresse durante lo sviluppo tissutale nel feto, ma non nei tessuti differenziati dell'adulto. La presenza di queste proteine sulle cellule tumorali è dovuta ad una de-repressione genica che si verifica attraverso meccanismi ancora non chiariti. L'espressione degli antigeni oncofetali nell'adulto non è rigidamente limitata alle cellule neoplastiche: sono infatti dimostrabili in diversi tessuti in corso di molte condizioni infiammatorie e, seppur in piccole quantità, anche in tessuti normali. Gli antigeni oncofetali non sono immunogenici per l'ospite durante lo sviluppo. Esempi di tali antigeni sono l' α -fetoproteina (AFP), elevata in corso di carcinoma epatocellulare, tumori a cellule genitali, carcinomi dello stomaco e del pancreas (Kew *et al*, 1974), e l'antigene carcino-embrionale (CEA), elevato in corso di carcinoma del colon, del pancreas, dello stomaco, della mammella e del polmone (Fletcher, 1986).
- Antigeni glicolipidici e glicoproteici alterati: alterazioni nell'aggiunta sequenziale di residui glucidici al nucleo lipidico o proteico di molecole di superficie possono determinare modificazioni delle caratteristiche cellulari in grado di condizionare alcuni aspetti del fenotipo maligno dei tumori, quali l'invasione tissutale ed il comportamento metastatico. Appartengono a questa classe di TAA i gangliosidi, gli antigeni dei gruppi ematici e le mucine, di cui gli esempi più comuni sono gli antigeni CA-125, CA 19-9 e MUC-1.
- Antigeni di differenziazione: questi sono antigeni tessuto-specifici espressi transitoriamente sulle cellule normali in alcune fasi differenziative, e presenti stabilmente sulle controparti neoplastiche delle stesse. Queste proteine sono molto importanti sotto il profilo clinico, potendo essere impiegabili come marcatori diagnostici per l'identificazione dell'istotipo di origine della neoplasia o come bersaglio per l'immunoterapia. Un esempio sono gli antigeni

di differenziazione dei linfociti che caratterizzano i linfomi da essi derivati, come il CD10 o CALLA (*common acute lymphoblastic leukemia antigen*) (McCormack *et al* 1986).

- Antigeni iperespressi: questo gruppo comprende proteine codificate da geni che non sono mutati ma che sono iperespressi nelle neoplasie. Appartiene a questa categoria la proteina *c-erbB2* (o *neu*), che è iperespressa nel 30% circa dei carcinomi della mammella e dell'ovaio (Maguire *et al*, 1989). Per quanto questa proteina sia presente anche sulle cellule normali di mammella e ovaio, in tal caso, la sua espressione, è inferiore a quella richiesta per l'attivazione dei linfociti T.

1.4 Immuno-editing e Immunoterapia

L'immunoterapia dei tumori rappresenta un approccio terapeutico che trova il suo fondamento nella teoria dell'immunosorveglianza. Rispetto a molte altre terapie oggi impiegate per la cura del cancro, come la chemioterapia, ha il vantaggio di essere altamente specifica. Esistono approcci classificabili come interventi d'immunoterapia passiva ed altri noti come immunoterapia attiva. Nel primo caso ci si riferisce a strategie basate sull'impiego di effettori prodotti *in vitro* o *ex vivo*, quali anticorpi o linfociti attivati, e trasferiti nell'ospite portatore di tumore; nel secondo caso si fa riferimento ad interventi che hanno lo scopo di indurre *in vivo*, nell'ospite stesso una risposta immunitaria antitumorale specifica. La teoria dell'immuno-editing ha portato, però, alla comprensione del fatto che il SI è sì capace di riconoscere e distruggere il tumore ma anche di modellare l'immunogenicità delle cellule neoplastiche; è quindi necessario tenere conto di questo per poter elaborare delle strategie terapeutiche valide. È oggi noto, infatti, che le neoplasie clinicamente evidenti ed in progressiva crescita, hanno sviluppato le opportune strategie per eludere le naturali difese immunitarie dell'ospite. Perciò, affinché l'immunoterapia sia efficace, essa deve essere in grado di aumentare la qualità e la quantità delle cellule immuni effettrici, di rivelare gli antigeni tumorali protettivi e di eliminare i meccanismi immunosoppressivi indotti dal cancro. Sono molti gli approcci immunoterapeutici in studio che hanno lo scopo di raggiungere questi obiettivi (Amedei *et al*, 2011a), tra cui: (i) vaccini terapeutici volti a stimolare una forte risposta immune specifica verso gli antigeni tumorali; (ii) il trasferimento adottivo di linfociti tumore-specifici espansi *in vitro* (eventualmente modificati geneticamente) con l'aggiunta o meno di citochine

immunomodulanti (Figura 2); (iii) la somministrazione terapeutica di anticorpi monoclonali diretti contro le cellule tumorali; (iv) approcci rivolti all'inibizione o alla distruzione dei mediatori molecolari o cellulari dell'immunosoppressione indotta dal tumore.

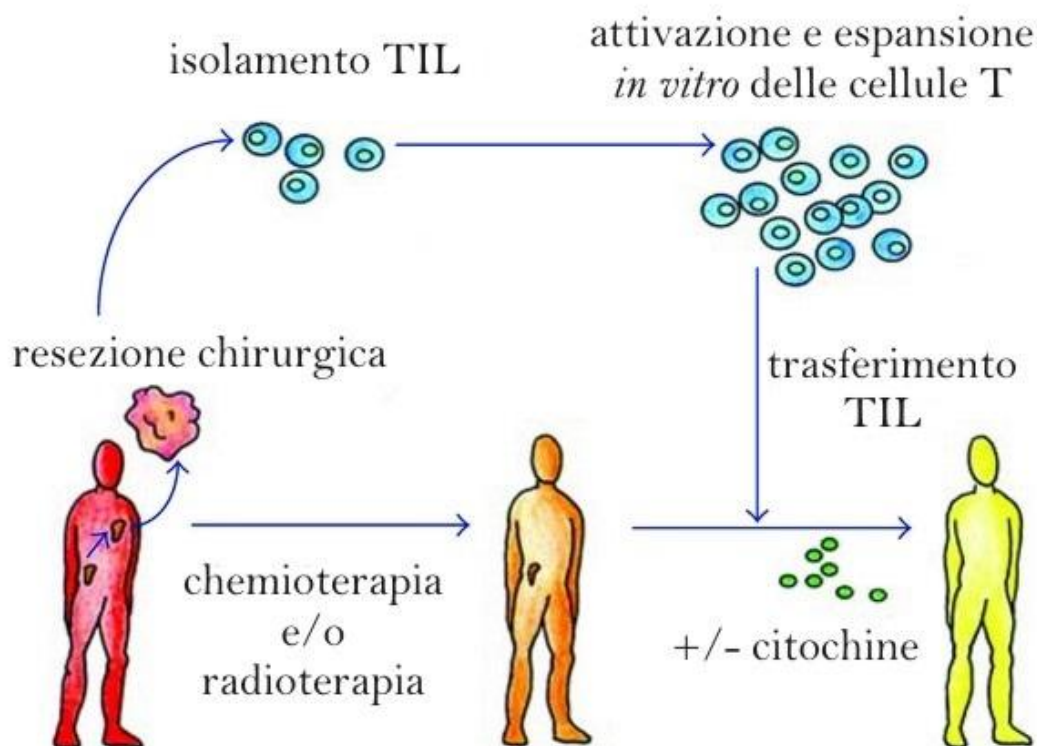


Figura 2. Schema del trasferimento adottivo di cellule T infiltranti il tumore (TIL) autologhe. Le TIL possono essere isolate dal tessuto tumorale asportato chirurgicamente ed espanse *in vitro* per poi essere ritrasferite nel paziente dopo chemioterapia linfoablattiva. Molti approcci terapeutici di questo tipo vengono eseguiti con la contemporanea somministrazione di citochine, quali IL-2, per favorire l'espansione delle cellule T tumore-specifiche.

2. LINFOCITI T E TUMORI

Gli antigeni tumorali evocano *in vivo* sia risposte umorali sia cellulari. Sebbene molte siano le cellule effettrici coinvolte nell'uccisione delle cellule tumorali, come le cellule NK, i macrofagi e i linfociti B (tramite la secrezione di anticorpi), la risposta ai tumori si basa principalmente sulla specifica interazione tra i linfociti T e gli antigeni tumorali espressi dalle cellule neoplastiche.

I linfociti T esprimono un recettore di membrana, detto TCR, in grado di legare un complesso molecolare, formato da un peptide antigenico legato ad una molecola MHC, espressa sulla superficie di cellule presentanti l'antigene (*antigen-presenting cells*, APC). In circa il 95% delle cellule T il TCR è un eterodimero costituito da una catena polipeptidica α ed una β , ognuna delle quali possiede una regione variabile (in cui si lega l'antigene) ed una costante. Una piccola percentuale di linfociti T periferici possiede un altro tipo di TCR, composto dalle catene polipeptidiche γ e δ , in grado di riconoscere l'antigene senza alcuna presentazione da parte di molecole MHC. Sia i TCR $\alpha\beta$ sia i TCR $\gamma\delta$ sono legati non covalentemente ad un gruppo di cinque catene polipeptidiche, denominato complesso molecolare CD3. Le proteine del CD3 non legano l'antigene ma sono coinvolte nella trasduzione del segnale all'interno della cellula T, dopo che è avvenuto il riconoscimento dell'antigene. Oltre alle proteine del CD3 le cellule T esprimono una varietà di altre molecole non polimorfiche come CD4, CD8 e molte cosiddette molecole accessorie come CD2, CD11a, CD28 ed il legando del CD40 (CD40L). Di queste, CD4 e CD8 sono particolarmente importanti; sono espresse in maniera mutualmente esclusiva su due gruppi di cellule T e servono da corecettori nell'attivazione dei linfociti. Durante la presentazione dell'antigene, le molecole CD4 si legano alle regioni non polimorfiche delle molecole MHC di classe II, espresse da cellule professionali APC (DC, cellule B, macrofagi), al contrario, le molecole CD8 si legano a molecole MHC di classe I (espresse in concentrazione differente da tutte le cellule nucleate).

I peptidi antigenici riconosciuti dai linfociti T possono derivare dalla degradazione proteolitica di proteine extracellulari (antigeni di origine esogena) o da proteine cellulari (antigeni di origine endogena); generalmente, le molecole MHC di classe I legano peptidi di origine endocellulare, a livello del reticolo endoplasmatico, mentre le molecole MHC di classe II si complessano a peptidi di origine esogena, a livello di compartimenti endosomiali. È ormai noto, però, che molecole MHC di classe I, espresse da cellule professionali APC, possono presentare anche alcuni antigeni esogeni, inclusi gli antigeni tumorali, in un meccanismo definito "*cross-priming*". Nell'uomo esistono tre geni

codificanti per molecole MHC di classe I, noti come HLA-A, HLA-B e HLA-C, e tre geni codificanti per molecole MHC di classe II, detti HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ. Siccome ognuno di questi geni è altamente polimorfico ed ogni individuo possiede due alleli per ciascuna molecola MHC di classe I e due per ciascuna molecola MHC di classe II, il numero di combinazioni possibili è enorme. Ogni molecola MHC possiede una diversa affinità per l'antigene, ed un peptide può legarsi ad una molecola HLA-A1 ma non ad una molecola HLA-A2. Ne consegue che il set di antigeni che possono essere riconosciuti dal SI di due individui geneticamente diversi è differente.

Per la completa attivazione della cellula T, l'interazione del TCR (e dei suoi corecettori) con il complesso MHC-peptide è necessario ma non sufficiente; è, infatti, richiesta la presenza di segnali costimolatori forniti dall'interazione di molecole espresse sulla cellula T con i rispettivi ligandi presenti sulla cellula APC. Tra le interazioni costimolatorie più note ci sono quelle tra: CD11a/CD18 (LFA-1) e CD54 (ICAM-1), CD2 e CD58 (LFA-3), CD28 e CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2). L'ultima risulta essenziale per la stimolazione di cellule T vergini (*naive*) e non per cellule T attivate. La mancanza di costimolazione può condurre all'induzione della tolleranza o all'anergia. Le cellule tumorali generalmente esprimono molecole MHC di I classe, che servono a presentare l'antigene ai linfociti T CD8⁺, mentre, ad eccezione di alcuni tumori di origine ematopoietica, non esprimono molecole MHC di classe II, non potendo quindi stimolare direttamente linfociti T CD4⁺. Nonostante questo, cellule professionali APC, come macrofagi e DC, possono fagocitare cellule necrotiche o apoptotiche e presentare gli antigeni tumorali su MHC sia di classe I sia di classe II.

2.1 Linfociti T CD4⁺

Il recettore CD4 è espresso approssimativamente dal 60% delle cellule T mature CD3⁺. I linfociti CD4⁺, vengono definiti anche T *helper* (Th), in quanto, regolano la funzione di ogni cellula del SI, comprese le altre cellule T, i linfociti B, i macrofagi e le cellule NK, tramite la secrezione di mediatori solubili o citochine. A seguito del riconoscimento di specifici peptidi antigenici tumorali, presentati da cellule professionali APC attivate, le cellule T CD4⁺ *naive* vanno incontro ad attivazione e differenziamento (fenomeno detto *priming*) assumendo funzioni effettrici; a seconda dei segnali e dei costimoli ricevuti durante il processo di riconoscimento dell'antigene, i linfociti T *helper* possono assumere fenotipi diversi che orchestrano in maniera differente le risposte immuni antitumorali, attraverso la produzione di citochine caratteristiche. La polarizzazione dei linfociti T

helper è influenzata da molti segnali biologici cellulari e solubili presenti nel microambiente tumorale, che regolano l'espressione di specifici fattori trascrizionali (O'Shea *et al*, 2010). Esistono sempre più prove del fatto che i linfociti T CD4⁺, oltre alla loro capacità di regolare le funzioni delle altre cellule effettrici dell'immunità, possano esercitare un ruolo diretto nel controllo dello sviluppo dei tumori; questo avviene principalmente tramite la produzione delle citochine IFN- γ e TNF- α (Pardoll *et al*, 2008; Hung *et al*, 1998) e attraverso una attività citolitica diretta, attraverso la degranolazione di granuli citotossici contenenti molecole tossiche, come perforina e granzima, o tramite il legame Fas/Fas ligando che attiva l'apoptosi della cellula esponente l'antigene (Green *et al*, 2001).

In base al pannello di citochine prodotte, le cellule T *helper* vengono distinte in numerose sottopopolazioni.

T *helper* 1 (Th1). Sono caratterizzate dalla produzione di IFN- γ e dall'espressione del fattore di trascrizione T-bet. Lo sviluppo di cellule T *naive* in cellule Th1 è determinato dall'attivazione da parte dell'interleuchina 12 (IL-12) dei fattori trascrizionali STAT4 e T-bet durante l'incontro con l'antigene (Szabo *et al*, 2003). L'attivazione di T-bet è critica per il differenziamento della cellula verso il fenotipo Th1; essa determina: (i) l'up-regolazione del recettore $\beta 2$ per IL-12 (IL-12 $\beta 2$ R), che conferisce alla cellula responsività all'IL-12 e sostiene l'espressione di T-bet (Lazarevic *et al*, 2011); (ii) la produzione di IFN- γ ; (iii) l'espressione di geni codificanti per il recettore chemochinico CXCR3 e per le chemochine CCL3 e CCL4 (Jenner *et al*, 2009), responsabili della mobilitazione delle cellule Th1 verso il sito tumorale. Sebbene l'IFN- γ sia da considerarsi la citochina distintiva di questa popolazione linfocitaria sia nel topo che nell'uomo, le cellule Th1 umane sono in grado di produrre anche altre citochine, tra cui IL-2 e TNF- α . Le cellule Th1 sono potenti mediatori dell'immunità cellulo-mediata e dell'infiammazione; oltre a regolare la funzione di altre cellule immunitarie, le cellule Th1 possono esercitare funzioni citotossiche dirette principalmente attraverso l'induzione dell'apoptosi della cellula presentante l'antigene, mediante il legame Fas/Fas ligando.

In vari modelli murini le risposte Th1 mediate partecipano all'eliminazione dei tumori e ne riducono lo sviluppo. In pazienti affetti da vari tipi di neoplasie, la presenza di cellule Th1 nell'infiltrato tumorale si associa ad una prognosi migliore (Fridman *et al*, 2011). Le cellule effettrici Th1 controllano lo sviluppo del tumore principalmente attraverso la produzione di IFN- γ , che può avere effetti sia diretti sia indiretti sulla attivazione e la modulazione della risposta immune (Zaidi *et al*, 2011). L'IFN- γ prodotto dai Th1 può

indurre una cascata di eventi che comportano il *priming* e la maturazione dei linfociti T CD8⁺ citotossici, attraverso l'attivazione delle DC nel sito del tumore, e l'eliminazione del tumore da parte di cellule NK e di macrofagi di tipo I (Quezada *et al*, 2010; Palucka *et al*, 2012; Corthay *et al*, 2005). L'IFN- γ svolge molte altre funzioni antitumorali tra cui: sostiene lo sviluppo di cellule Th1, inibendo lo sviluppo di linee Th2 potenzialmente protumorali; promuove l'espressione del recettore chemochinico CXCR3 e dei suoi ligandi CXCL9, CXCL10 e CXCL11 che attraggono le cellule Th1 nel sito tumorale infiammatorio (Rotondi *et al*, 2003); inibisce lo sviluppo e l'attivazione delle cellule T regolatorie (Treg) (Nishikawa *et al*, 2005; Caretto *et al* 2010); up-regola l'espressione di molecole MHC da parte di cellule tumorali facilitandone il riconoscimento e l'eliminazione da parte dei CTL; inibisce la proliferazione delle cellule cancerose (Zaidi *et al*, 2011); promuove l'apoptosi delle cellule tumorali stimolando l'espressione di caspasi, Fas e TRAIL (Takeda *et al*, 2002; Chin *et al*, 1997; Xu *et al*, 1998; Meng *et al*, 2001); inibisce l'angiogenesi nel microambiente tumorale (Beatty *et al*, 2001).

T helper 2 (Th2). Questa popolazione di linfociti T è caratterizzata dalla produzione di IL-4, IL-5 e IL-13, citochine responsabili del coordinamento dell'immunità umorale e delle risposte infiammatorie allergiche. L'IL-4 è l'interleuchina determinante nella differenziazione dei linfociti T *helper* verso il fenotipo Th2, agendo attraverso l'attivazione dei fattori trascrizionali STAT6 e GATA-3 (Zheng *et al* 1997; Kaplan *et al*, 1996). Sebbene il ruolo delle cellule Th2 nelle risposte antitumorali sia ancora poco chiaro, diversi studi suggeriscono come queste cellule abbiano un ruolo nel sostenere la carcinogenesi e la progressione tumorale (Ochi *et al*, 2012; Tatsumi *et al*, 2002). Nonostante ciò, alcuni studi hanno di recente mostrato l'esistenza di cellule Th2 producenti preferenzialmente la citochina IL-24 (citochina appartenente alla famiglia della IL-10, ma che non possiede funzioni immunosoppressive) (Ouyang *et al*, 2011), che avrebbe la capacità di inibire la crescita di cellule ovariche cancerose umane sia *in vivo* che *in vitro* (Dash *et al*, 2010; Emdad *et al*, 2009).

T helper 17 (Th17). L'espressione di IL-17 caratterizza una popolazione di linfociti CD4⁺ *helper*, detta Th17. Le cellule Th17, esprimono il marker di superficie CD161 (Cosmi *et al*, 2008), producono IL-17A, IL-17B, IL-21, IL-22 e IL-26, ed esprimono alti livelli del recettore chemochinico CCR6, utile per il reclutamento di queste cellule nel sito di crescita tumorale e infiammatorio (Annunziato *et al*, 2012; Acosta Rodriguez *et al*, 2007). Sia le cellule Th17 murine che quelle umane esprimono il fattore di trascrizione ROR γ t, che

induce la produzione delle citochine caratteristiche di questo gruppo di cellule T, mentre inibisce la produzione di IFN- γ da parte di cellule T *naive* (Manel *et al*, 2008). Nell'uomo, per la differenziazione delle cellule Th17, sono necessarie le citochine IL-6 e IL-1 β (Acosta Rodriguez *et al*, 2007). L'IL-21 prodotta dai linfociti Th17 amplifica la generazione degli stessi in maniera autocrina e induce l'espressione del recettore per IL-23 rendendoli responsivi a questa citochina. In seguito, l'IL-23 prodotta dalle DC stabilizza il fenotipo Th17 aiutandolo ad acquisire funzioni effettrici. L'induzione di ROR γ t è dipendente da STAT3, che è attivato da IL-6, IL-21 e IL-23.

Il ruolo delle cellule Th17 nell'immunità dei tumori è molto controverso; secondo alcuni studi le cellule secernenti IL-17 avrebbero un ruolo pro-tumorale essendo implicate nella promozione e nello sviluppo dei tumori nel contesto di stati infiammatori cronici (Wu S *et al*, 2009; Wang L *et al*, 2009) e promuovendo la neoangiogenesi tumorale, inducendo il rilascio di mediatori angiogenetici come VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e chemochine quali CXCL1, CXCL5, CXCL6 e CXCL8, da parte delle cellule tumorali, di quelle endoteliali e di quelle stromali (Numasaki *et al*, 2003; Takahashi *et al*, 2005; Lee *et al*, 2008). In contrasto, ci sono prove a sostegno del ruolo protettivo svolto dalle Th17 nel contesto dell'immunità ai tumori. Studi clinici condotti su pazienti con cancro ovarico avanzato mostrano una correlazione positiva tra il numero di linfociti Th17 e la concentrazione di IL-17 a livello intratumorale e la sopravvivenza dei pazienti (Wilke *et al*, 2011; Kryczek *et al*, 2009). Osservazioni simili sono state fatte su pazienti affetti da altre neoplasie maligne, suggerendo il ruolo protettivo dei Th17 nel cancro (Sfanos *et al*, 2008; Ye *et al*, 2010, Chen *et al*, 2001). Inoltre, è stata documentata una correlazione negativa tra i Th17 e le Treg ed una correlazione positiva tra i Th17 e le cellule effettrici dell'immunità, come Th1, CTL e NK, nel contesto del microambiente tumorale (Kryczek *et al*, 2009; Zou *et al*, 2010; Wilke *et al*, 2011). Il meccanismo protettivo mediato dai Th17 potrebbe basarsi sulla loro capacità di secernere molte citochine funzionalmente distinte, come IL-17A, IL17F, IL-22 e IL-21, in grado di sostenere le risposte T CD8 mediate, e chemochine come CCL20 in grado di promuovere il traffico delle DC verso il sito tumorale con un meccanismo CCL20-CCR6 mediato. Il reclutamento di DC può effettivamente determinare il priming dei T CD8⁺, aumentando l'attività citotossica CTL mediata. Questi dati hanno suggerito una stretta correlazione funzionale tra le linee cellulari Th17 e i Th1 (Kryczek I *et al*, 2009), che ha portato alla scoperta di una popolazione di linfociti T *helper* in grado di produrre sia IL-17 sia IFN- γ (Annunziato *et al*, 2007; Hamai *et al*, 2012). Questi linfociti deriverebbero da linfociti Th17, esprimenti entrambi i fattori di trascrizione ROR γ t e T-bet

(Annunziato *et al*, 2007), in cui la stimolazione con IL-12 induce l'espressione di IFN- γ , attraverso up-regolazione di T-bet e down-regola la produzione di IL-17 attraverso l'inibizione di ROR γ t (Annunziato *et al*, 2010; Annunziato *et al*, 2007). Questo *switch* fenotipico sarebbe favorito dalla bassa ma costitutiva espressione di IL-12R β 2 da parte dei Th17 (Annunziato *et al*, 2007; Lee *et al*, 2009). La plasticità delle Th17 e la loro capacità di produrre IFN- γ sarebbe influenzata dal contesto in cui esse si sviluppano, in particolare dal *milieu* di citochine prodotte dalle cellule dell'immunità innata all'interno del microambiente tumorale (Murphy *et al*, 2010; Annunziato *et al*, 2010; Marshall *et al*, 2012; Martin-Orozco *et al*, 2009). La conversione delle cellule Th17 in cellule dalle caratteristiche simili alle Th1 potrebbe avere importanti implicazioni nell'immunità contro i tumori; sebbene il ruolo di queste cellule non sia ancora del tutto chiaro, è stato proposto che le citochine IL-17 e IFN- γ possano agire sinergisticamente o indipendentemente inducendo la produzione di diverse chemochine all'interno del microambiente tumorale in grado di richiamare e promuovere lo sviluppo di differenti tipi di cellule T effettrici o di altre cellule immuni che possono mediare la regressione o la progressione tumorale (Kryczek *et al*, 2009; Martin-Orozco *et al*, 2009). L'effetto pro- o antitumorale dipenderebbe dalla quantità e qualità delle citochine prodotte, dal tipo di tumore, dalle altre cellule presenti nel microambiente tumorale e dalla loro risposta alle citochine tumore-associate. Risulta, quindi, necessario condurre ulteriori indagini per identificare e caratterizzare la funzione e i meccanismi coinvolti nell'induzione di cellule Th17 effettrici tumore-specifiche in pazienti affetti da vari tipi di neoplasie maligne.

T helper 22 (Th22). Rappresentano un gruppo di cellule T *helper* in grado di produrre IL-22, indipendentemente da IL-17, inizialmente identificate in pazienti con disturbi infiammatori della pelle, dell'intestino e delle articolazioni (Sonnenberg *et al*, 2011; Eyerich *et al*, 2009). Di recente queste cellule sono state identificate in versamenti pleurici tumorali e in altre neoplasie, dove sembrano contribuire alle risposte immuni e all'infiammazione (Zhang *et al*, 2008; Miyagaki *et al*, 2011; Jiang *et al*, 2011). Le cellule Th22 esprimono l'antigene linfocitario cutaneo (*cutaneous lymphocyte antigen*, CLA), un ligando della E-selectina coinvolto nel *rolling* dei linfociti e delle cellule endoteliali nelle venule postcapillari cutanee, e altri recettori per chemochine come CCR6, CCR4 e CCR10, che complessivamente facilitano la migrazione di queste cellule nei siti infiammati (Duhon *et al*, 2009). Sebbene il ruolo delle cellule Th22 nell'immunità dei tumori sia poco chiaro, alcuni studi sostengono il loro ruolo nella promozione tumorale; in particolare, l'IL-22 sarebbe in grado di: aumentare la sopravvivenza delle cellule tumorali, inducendo

l'espressione di proteine antiapoptotiche come Bcl-xL (Aggarwall *et al.* 2006; Aggarwall *et al.* 2009); promuovere l'invasività tumorale stimolando l'angiogenesi (Aggarwall *et al.* 2006; Rivat *et al.* 2005; Aggarwall *et al.* 2009), aumentare la produzione di citochine anti-infiammatorie come IL-10 e TNF- β (Rabinovich *et al.* 2007; Kinjyo *et al.* 2006); aumentare la resistenza delle cellule tumorali alla citotossicità NK mediata. Inoltre, in pazienti affetti da cancro gastrico, la presenza di cellule Th22 infiltranti il tumore si correla con una maggiore aggressività tumorale e con una minore sopravvivenza del paziente (Liu *et al.* 2012).

T regolatorie (Treg). Si distinguono in due gruppi principali a seconda della loro origine e della loro attività soppressiva; (i) le cellule T regolatorie naturali effettrici (nTreg), che esprimono costitutivamente il fattore di trascrizione FoxP3 e il marker di attivazione CD25 e che originano nel timo per l'elevata affinità con cui il loro TCR interagisce con antigeni presenti nello stroma timico (Nishikawa *et al.*, 2010; Shevach 2009; Miyara *et al.*, 2011); esse sopprimono la proliferazione di cellule T effettrici in maniera contatto-dipendente e citochino-indipendente; (ii) cellule T regolatorie inducibili (iTreg), che originano a livello periferico da cellule T *naive* CD4⁺ e producono IL-10 (TR1) o TGF- β (Th3) (Grazia-Roncarolo *et al.*, 2006; Nishikawa *et al.*, 2010; O'Garra *et al.*, 2004); la funzione soppressiva di queste cellule CD4⁺CD25⁻ "indotte" è mediata dalla produzione di citochine e non è strettamente associata ad una elevata espressione di FoxP3. Le cellule Treg umane possono essere suddivise in due ulteriori sottopopolazioni in base all'espressione del marker CD45RA (tipico delle cellule T naive che non hanno ancora incontrato l'antigene) o del marker CD45RO (espresso dalle cellule T della memoria che hanno già avuto un contatto con l'antigene), che suggerisce il loro diverso livello di attivazione e/o differenziazione (Miyara *et al.*, 2009; Miyara *et al.*, 2011; Duhon *et al.*, 2012). Recentemente, è stata studiata anche un'altra sottopopolazione di cellule Treg inducibili, in grado di produrre IL-35 e perciò detta iTreg35 (Chaturvedi *et al.*, 2011; Collison *et al.* 2010). Le iTreg35 sono fenotipicamente e funzionalmente distinte dalle altre Treg in quanto non esprimono FoxP3 e mediano le loro funzioni soppressive indipendentemente da IL-10 o TGF- β , ma solo attraverso IL-35.

Nonostante sia ancora da chiarire come le cellule Treg mantengono l'equilibrio tra immunità tumorale protettiva e omeostasi immunologica, prevenendo malattie infiammatorie attraverso il controllo di risposte aberranti ad antigeni self o innocui, sono noti molti meccanismi (sia contatto dipendenti che citochino-mediati) con cui queste cellule mediano funzioni soppressive (Vignali *et al.*, 2008; Shevach 2009; Vignali *et al.*,

2012; Yamaguchi *et al*, 2011; Qureshi, 2011), tra cui: produzione di IL-10; produzione ed espressione superficiale di TGF- β ; produzione di IL-35; rilascio di molecole citolitiche come granzimi e perforina; consumo di IL-2, da cui dipendono i T effettori, attraverso l'elevata espressione superficiale di CD25 (catena α del recettore per IL-2); degradazione di ATP ed espressione di recettori inibitori come CTLA-4, che compete con il recettore CD28 presente sui T effettori, per il legame con le molecole costimolatorie CD80 e CD86 espresse dalle APC.

Nel contesto delle risposte immunitarie ai tumori, l'IL-10 svolge un ruolo principalmente pro-tumorale diminuendo le risposte immunitarie attraverso l'inibizione delle cellule T effettrici (Taga *et al*, 1993), ma anche delle cellule dell'immunità innata. Ad esempio, a livello delle APC, IL-10 inibisce l'espressione di molecole costimolatorie, come quelle appartenenti alla famiglia B7 (Vicari, *et al* 2004; O'Garra *et al*, 2009), regola negativamente la produzione di IL-12 ed inibisce la maturazione e la differenziazione delle DC (Moore *et al*, 2001). Inoltre, è stato dimostrato come le cellule Treg produttrici IL-10 siano responsabili di una tolleranza immunitaria periferica dovuta alla scarsa attivazione e regolazione dei CTL, dei Th1 e di altre cellule T effettrici, che facilita i meccanismi di escape tumorale e la crescita della massa neoplastica (Seo *et al*, 2002).

2.2 Linfociti T CD8⁺

I linfociti T CD8⁺ vengono anche detti T citotossici (Tc o CTL) per la loro capacità, una volta attivati, di lisare la cellula bersaglio. I CTL riconoscono peptidi antigenici presentati da molecole MHC di classe I e non da molecole MHC di classe II e proprio perché la maggior parte delle cellule tumorali esprime molecole MHC di classe I, i CTL rappresentano l'arma principale nell'immunità ai tumori. In ogni caso, per l'attivazione di cellule CD8⁺ naive, è richiesta la presenza di segnali costimolatori che non possono essere offerti da cellule tumorali non ematopoietiche che non esprimono i ligandi del CD28 (CD80 o CD86). Per questo l'attivazione dei linfociti T CD8⁺ avviene solo dopo la presentazione dell'antigene da parte di cellule professionali APC, attraverso il meccanismo di "cross-priming". Una volta attivati, i CTL possono interagire con le cellule bersaglio, indipendentemente dall'espressione di CD80/CD86. La presenza di altre molecole costimolatorie o di adesione, come ICAM e LFA3, è comunque essenziale; la mancanza di espressione di queste molecole sulle cellule neoplastiche rappresenta un noto meccanismo di evasione tumorale (Vesely *et al*, 2011). Una volta attivati, i CTL sono in grado di lisare la cellula bersaglio principalmente attraverso tre meccanismi (Shresta *et al*, 1998): (i)

secrezione di citochine citotossiche come IFN- γ e TNF- α ; (ii) secrezione di granuli citotossici, che liberano sostanze, come perforina o granzima, in grado di danneggiare la membrana della cellula bersaglio, causandone la lisi; (iii) legame della molecola Fas ligando (sintetizzata sulla superficie dei CTL dopo poche ore dalla stimolazione) con il recettore Fas espresso dalla cellula bersaglio, che innesca il processo apoptotico nella cellula presentante l'antigene.

Come per i linfociti T *helper*, i linfociti T CD8⁺ si possono suddividere in varie sottopopolazioni a seconda delle citochine da essi prodotte (Tc1, Tc2, Tc17, Treg) (Shrikant *et al.*, 2010). Ad esempio, i Tc1 sono in grado di produrre IL-2, IFN- γ e TNF- α , mentre i Tc2 secernono IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Tutte le sottopopolazioni Tc hanno la stessa attività citolitica, ma i diversi mediatori solubili prodotti influenzano le risposte immuni nel contesto del microambiente tumorale. Lo sbilanciamento nel rapporto Tc1/Tc2, con espansione della popolazione Tc2, si associa, ad esempio, alla progressione tumorale (Goedegebuure *et al.*, 2002).

3 I TUMORI DELL'APPARATO DIGERENTE

Le neoplasie dell'apparato digerente rappresentano, complessivamente, la seconda classe di tumori, dopo i tumori dell'apparato genitale, a maggior incidenza e la seconda, dopo i tumori del sistema respiratorio, a più alto tasso di mortalità, con 290200 nuovi casi e 144570 morti stimati per il 2013, negli Stati Uniti, dall'American Cancer Society (American Cancer Society 2013). Ne fanno parte i tumori dell'esofago, dello stomaco, del fegato e delle vie biliari, del pancreas, dell'intestino tenue, del colon e del retto. I fattori determinanti l'elevata incidenza risiedono soprattutto nell'aumento nell'aspettativa di vita e nell'invecchiamento generale della popolazione, e benché negli ultimi anni si sia osservato un aumento complessivo della sopravvivenza nei pazienti affetti da questi tumori, il tasso di mortalità è ancora elevato e le possibilità terapeutiche limitate. Tra i tumori dell'apparato digerente, quelli a più elevata incidenza sono rappresentati dal cancro dello stomaco, dai tumori del colon-retto e dal tumore del pancreas. La terapia chirurgica rappresenta nel maggiore dei casi l'unico intervento in grado di garantire una possibilità di sopravvivenza per il paziente, ma rappresenta un intervento radicale che può condizionare la mortalità post-operatoria e che, da solo, è in grado di garantire un tasso di sopravvivenza a 5 anni molto basso, che si aggira attorno al 20-25% (Winter *et al.* 2006; Saka *et al.* 2011; Giuliani *et al.* 2010). L'impiego di strategie terapeutiche combinate, come la chemio-

radioterapia, pre- e postoperatoria, o il trattamento chemioterapico perioperatorio, comportano un lieve aumento del tasso di sopravvivenza a 5 anni, che rimane solamente del 30-35% (Cunningham *et al.* 2006; Catenacci *et al.* 2011; Artinyan *et al.* 2011). In questo contesto risulta chiara la necessità di comprendere meglio i meccanismi genetici e molecolari che sottendono alla biologia delle diverse neoplasie gastrointestinali per mettere appunto nuove strategie terapeutiche che siano in grado di aumentare la probabilità di sopravvivenza dei pazienti. Tra le terapie alternative in studio più promettenti troviamo la terapia genica (Touchefeu *et al.* 2010) e l'immunoterapia specifica (Gaudernack *et al.* 2006; Iovino *et al.* 2011; Amedei *et al.*, 2011a).

3.1 CARCINOMA GASTRICO

Tra i tumori maligni che insorgono nello stomaco, il carcinoma gastrico (CG) è di gran lunga il più importante e il più comune (90-95%). Seguono in ordine di frequenza i linfomi (4%), i carcinoidi (3%) e i tumori maligni a cellule fusate (2%). Il CG rappresenta il quarto tipo di tumore più comune nel mondo, dopo il cancro del polmone, della mammella e del colon retto, con circa un milione di nuovi casi l'anno, e la seconda causa di morte per cancro in entrambi i sessi (International Agency for Research on Cancer, 2008). Nonostante, nelle ultime decadi sia stato osservato un marcato declino sia dell'incidenza sia della mortalità, il numero assoluto di nuovi casi l'anno risulta in aumento a causa dell'invecchiamento della popolazione. L'incidenza di questo tumore mostra ampie variazioni geografiche; le aree a maggior rischio sono l'Asia dell'Est (che raccoglie più del 50% dei casi, in particolare in Cina e Giappone), l'Europa dell'Est e alcune regioni dell'America Latina (Parkin *et al.*, 2005). Sostanziali differenze nell'incidenza del CG si osservano anche all'interno dello stesso paese. Ad esempio, in Italia, il CG presenta un gradiente geografico nord-sud molto spiccato: il rischio è molto basso in tutte le regioni meridionali e insulari ed estremamente elevato in una concentrazione di aree intorno al confine tra Toscana e Romagna; i tassi di incidenza più elevati si registrano nelle province di Forlì e Firenze.

I carcinomi gastrici sono stati suddivisi da Lauren in due forme morfologiche: quella che mostra una morfologia di tipo *intestinale* dovuta a masse neoplastiche formate da strutture ghiandolari e quella di tipo *diffuso* costituita da cellule maligne scarsamente differenziate, poco coese, con modalità di crescita infiltrativa. Mentre il CG di tipo intestinale insorge prevalentemente dopo i 50 anni, con un rapporto maschi/femmine di 2 a 1, quello di tipo

diffuso insorge in età precoce senza predilezione di sesso. Il carcinoma di tipo intestinale è la forma di cancro allo stomaco la cui incidenza è progressivamente diminuita nel mondo.

3.1.1 Eziologia

I principali fattori che incidono nella genesi del CG di tipo intestinale comprendono fattori ambientali, fattori legati all'ospite e fattori genetici. Per quanto riguarda la forma di cancro di tipo diffuso i fattori di rischio restano da chiarire.

Fattori ambientali. L'osservazione di un differente gradiente geografico, unita a quella che gruppi familiari che migrano da aree ad alto rischio ad altre a rischio minore, acquisiscono, nel corso delle generazioni successive, il livello di rischio della popolazione locale, ha fatto ritenere i fattori di tipo ambientale determinanti nella genesi del CG. Si sospetta che i fattori dietetici abbiano primaria importanza e l'abitudine ad alcune pratiche culinarie si associa ad un alto rischio di CG. La presenza di carcinogeni, come i composti nitrosi e il benzopirene, sembra essere particolarmente importante. Infatti, la mancanza di refrigerazione dei cibi, l'uso comune di nitrati come preservanti, la contaminazione dell'acqua da parte di nitrati e la mancanza di verdura e di frutta fresca nella dieta sono caratteristiche comuni nelle zone ad alto rischio. Oggi è noto come verdure fresche a foglie verdi ed agrumi, con il loro potere antiossidante, dovuto alla presenza di Vit. C, Vit. E e beta-carotene, svolgano un ruolo protettivo nella carcinogenesi gastrica, mentre è stato altrettanto chiarito come il sale e i cibi con esso conservati abbiano un'azione protumorale (WCRF and AICR, 2009). Il fumo, correla con un aumento del rischio di 1,5-3 volte, e il rischio aumenta con l'intensità e la durata nel tempo del consumo di sigarette, oltre che al contemporaneo consumo di alcol (Sjodahl *et al*, 2007).

Fattori legati all'ospite. Sono il secondo fattore più importante da considerare. Si ritiene che l'infezione da *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), evocando una gastrite cronica ed una metaplasia intestinale, sia importante, seppur non sufficiente, nella patogenesi del CG, tanto che lo IARC lo ha inserito tra gli agenti oncogeni umani nel 1994. Anche la gastrite autoimmune correla con un aumentato rischio, probabilmente perché anch'essa conduce ad una flogosi cronica e ad un processo di metaplasia intestinale. In entrambe le condizioni tale rischio è circa 3 volte superiore alla media (va tenuto presente che in molte regioni la percentuale di individui infetti da *H. pylori* è attorno al 50% della popolazione adulta, pertanto, la maggior parte dei soggetti con infezione da *H. pylori* non svilupperà mai un cancro gastrico). La gastrite cronica sembra essere il substrato dal quale origina il carcinoma gastrico diffuso. L'ulcera peptica per sé non è correlata con un aumento del

rischio. La displasia della mucosa gastrica rappresenta la via comune finale attraverso la quale si giunge al carcinoma gastrico di tipo intestinale, mentre il carcinoma gastrico di tipo diffuso non sembra originare da una condizione di displasia ma *de novo*. Gli adenomi gastrici vanno spesso incontro a trasformazione maligna e d'altra parte, si tratta di lesioni rilevate con mucosa displastica (Cotran *et al*, 2009).

Fattori genetici. Approssimativamente, il 10-15% dei carcinomi gastrici insorgono in individui con una storia familiare. Il rischio di cancro dello stomaco è aumentato di circa 2.3 volte tra parenti di primo grado (Dhillon *et al*, 2001).

3.1.2 Manifestazioni cliniche e prognosi

Il CG ha carattere insidioso, manifestandosi clinicamente solo quando è in stadio avanzato. I segni e i sintomi comprendono perdita di peso, dolore addominale, anoressia, vomito, alterazioni dell'alvo e, meno frequentemente, disfagia, sintomi anemici ed emorragia. Poiché questi sintomi sono essenzialmente aspecifici, la diagnosi precoce è difficile. La prognosi dipende principalmente dalla profondità dell'invasione e dall'estensione delle metastasi linfonodali e a distanza al momento della diagnosi; il tipo istologico non ha un significato prognostico indipendente. La percentuale di sopravvivenza a 5 anni dei carcinomi precoci trattati chirurgicamente è del 90-95% con solo un piccolo decremento se presenti metastasi linfonodali. Al contrario, la percentuale di sopravvivenza a 5 anni per i tumori gastrici avanzati rimane al di sotto del 10%.

3.1.3 Terapia

Il trattamento del CG dipende da vari fattori tra cui le dimensioni, la localizzazione e l'estensione del tumore, lo stadio della malattia, l'età del paziente e le condizioni generali di salute. Le attuali opzioni terapeutiche comprendono la chirurgia, la chemioterapia, la radioterapia e le cure palliative/terapie di supporto (in particolare nutrizionali). Il trattamento chirurgico rappresenta l'unico intervento terapeutico di tipo curativo, ed è in genere un intervento radicale che si prefigge di eliminare completamente il tumore primitivo. Alla diagnosi però il 15-20% dei carcinomi gastrici risulta avanzato con diffusione agli organi circostanti, per i quali un intervento radicale è realizzabile solo nel 30-50% dei casi; in tali situazioni è stata descritta l'efficacia di trattamenti chemioterapici neoadiuvanti (preoperatori o perioperatori) nell'indurre un "downstaging" della neoplasia con conseguente possibilità di realizzare un numero maggiore di interventi radicali. La chemioterapia neoadiuvante che prevedeva una combinazione di fluoracile (5-Fu) e

derivati del cisplatino, ha mostrato un significativo aumento delle probabilità di sopravvivenza, rispetto alla sola chirurgia, in due studi randomizzati (MAGIC e ACCORD) (Cunningham *et al*, 2006; Ychou *et al*, 2011). Inoltre, studi randomizzati di chemioterapia adiuvante, svolta in fase postoperatoria, per ridurre il rischio di recidive di malattia, hanno mostrato un significativo beneficio ottenuto impiegando regimi monoterapeutici contenenti 5-Fu (Sakuramoto *et al*, 2007), oppure regimi combinati di capecitabina e oxaliplatino (regime XELOX) (Bang *et al*, 2012). I trattamenti chemioterapici sia adiuvanti che perioperatori hanno però mostrato scarsa tollerabilità, dimostrando la fattibilità degli schemi proposti solo in una piccola percentuale di pazienti. Il trattamento postoperatorio combinato con radioterapia e chemioterapia di sensibilizzazione con 5-Fu è stato confrontato con risultati positivi alla sola chemioterapia adiuvante oppure alla sola chirurgia, mostrando un aumento della sopravvivenza globale dell'11% (Smalley *et al*, 2012). Sulla base di queste evidenze, la radio-chemioterapia adiuvante rappresenta attualmente lo standard terapeutico negli Stati Uniti. In tutti i casi, i trattamenti radio-chemioterapici disponibili, seppur abbiano mostrato un lieve incremento della sopravvivenza in pazienti con carcinoma gastrico avanzato, risultano scarsamente tollerabili in gran parte dei pazienti, e rappresentano, inoltre, solo una cura palliativa nei pazienti metastatici, per i quali la sopravvivenza complessiva risulta di soli 8-10 mesi (Enzinger *et al*, 2003). È, quindi, necessario approfondire le conoscenze sui meccanismi molecolari che sottintendono alla biologia del tumore, in modo da realizzare nuove e più efficaci strategie terapeutiche (Amedei *et al*, 2011b).

3.2 CARCINOMA COLORETTALE

Il carcinoma coloretale (CCR) è il terzo tumore più comune negli uomini (10% di tutti i casi di cancro) ed il secondo nelle donne (9,4% del totale di casi) nel mondo (International Agency for Cancer Research, 2008). Con oltre 600000 morti stimate nel mondo, rappresenta la quarta causa di morte per cancro. Circa il 60% dei casi si osserva nei paesi industrializzati; i più alti tassi di incidenza si osservano in Australia/Nuova Zelanda e nell'Europa Occidentale, mentre i più bassi in Africa (ad eccezione del Sud Africa) e nell'Asia del Sud e Centrale, e sono intermedi in America Latina. L'incidenza della malattia è superiore negli uomini piuttosto che nelle donne con un rapporto di 1,4 a 1 (International Agency for Cancer Research, 2008) ed il picco di incidenza si ha tra i 60 e i 70 anni di età; meno del 20% dei casi viene diagnosticato in soggetti di età inferiore ai 50 anni, per i quali va sempre sospettata la presenza di una colite ulcerosa o di una sindrome

poliposa ereditaria. I tassi di incidenza e mortalità sono diminuiti durante l'ultima decade del secolo scorso, ma in contrasto a questi dati si è osservato un notevole incremento dell'incidenza in Giappone, Korea e Singapore probabilmente legato all'acquisizione di uno stile di vita "occidentale".

Circa il 98% di tutte le neoplasie maligne dell'intestino crasso sono adenocarcinomi. Essi rappresentano una delle più importanti sfide alla professione medica perché producono sintomi in fase relativamente precoce e sono potenzialmente guaribili con la resezione chirurgica.

3.2.1 Eziologia

Dieta e stile di vita. Un'alta incidenza di CCR si osserva in popolazioni con un tipo di dieta "occidentale", ovvero altamente calorica e ricca in grassi animali, combinata ad uno stile di vita sedentario. Studi epidemiologici indicano come il consumo di carne, l'abitudine al fumo e il consumo di alcol siano fattori di rischio per lo sviluppo di tumori coloretali (Potter 1999; Winawer 1997). In particolare i fattori dietetici che più predispongono al CCR sono: (i) eccessiva assunzione rispetto al fabbisogno reale; (ii) basso apporto di fibre vegetali non digeribili; (iii) elevato apporto di carboidrati raffinati; (iv) elevato consumo di grassi di origine animale; (v) diminuito apporto di micronutrienti protettivi. Si ipotizza che un basso consumo di fibre vegetali comporti una diminuzione della massa fecale, allungamento del tempo di transito nell'intestino ed alterazione della flora batterica. Questi fenomeni inducono la presenza di alte concentrazioni di prodotti di degradazione degli zuccheri raffinati, potenzialmente tossici, che permangono per lungo tempo a contatto con la mucosa colica. Inoltre, l'elevato consumo di grassi aumenta la sintesi epatica di colesterolo e di acidi biliari, che a loro volta possono essere convertiti dalla flora intestinale in potenti carcinogeni. Le diete raffinate, inoltre, contengono minori quantità di Vit. A, C ed E che possono agire da antiossidanti. Queste ipotesi, per quanto appaiano interessanti, ancora non sono completamente dimostrate.

Infiammazione cronica. Le infiammazioni croniche dell'intestino sono un importante fattore di rischio per lo sviluppo di CCR (Riddell RH *et al*, 1983). La colite ulcerosa, un disordine cronico ad eziologia sconosciuta, è considerata una condizione pre-cancerosa, che si associa con un'elevata incidenza di tumori del colon-retto (Persson *et al*, 1996). Allo stesso modo l'incidenza di questo tumore risulta tre volte superiore in pazienti affetti da malattia di Crohn (Gillen *et al*, 1994).

Fattori genetici. Circa il 20% dei casi di CCR è considerato di tipo familiare o legato a sindromi genetiche, come la poliposi adenomatosa familiare, associata a mutazioni del gene APC (*adenomatous polyposis coli*), ed il carcinoma del colon-retto ereditario non poliposico, caratterizzato da mutazioni germinali dei geni *mismatch repair* (MMR). Queste due sindromi genetiche rappresentano, rispettivamente, circa l'1% ed il 5% di tutti i casi di CCR.

Radiazioni. Un raro, ma ben riconosciuto, fattore eziologico è rappresentato dalla radioterapia terapeutica della pelvi (Tsunoda *et al*, 1997).

3.2.2 Manifestazioni cliniche e prognosi

I carcinomi del colon-retto rimangono asintomatici per anni; i sintomi si sviluppano in modo insidioso e spesso sono presenti da mesi, a volte da anni, prima della diagnosi. I carcinomi del colon destro e del cieco giungono più spesso all'esame clinico per la comparsa di astenia, malessere ed anemia sideropenica. Questi voluminosi tumori sanguinano facilmente e possono essere scoperti in fase precoce se il colon viene esaminato radiograficamente ed endoscopicamente con accuratezza. I carcinomi del colon sinistro richiamano l'attenzione causando sanguinamenti occulti, alterazioni dell'alvo, oppure dolore crampiforme al quadrante addominale inferiore di sinistra. In teoria, la probabilità di una diagnosi precoce e di una tempestiva asportazione, dovrebbe essere maggiore per i tumori del lato sinistro, poiché i pazienti di solito presentano importanti alterazioni delle funzioni intestinali, quali melena, diarrea o stitichezza. Tuttavia, al momento della diagnosi, i tumori del rettosigma tendono ad essere più infiltranti di quelli situati nei tratti più prossimali del colon e quindi hanno in genere una prognosi peggiore. Nelle donne la situazione è più complessa in quanto le perdite mestruali, le gravidanze multiple e i sanguinamenti uterini abnormi possono essere causa di anemizzazione. Le manifestazioni sistemiche quali astenia, malessere e perdita di peso, sono da considerarsi preoccupanti in quanto di solito sono indici di uno stato avanzato di malattia. Tutti i tumori del colon-retto possono diffondere per estensione diretta alle strutture adiacenti e dare metastasi per via linfatica ed ematica. In ordine di frequenza, le sedi favorite della diffusione metastatica sono i linfonodi regionali, il fegato, i polmoni e le ossa, seguite da molte altre sedi, tra cui il rivestimento sieroso della cavità peritoneale, l'encefalo ed altre. In genere l'estensione della malattia è tale da rendere impossibile la resezione chirurgica curativa nel 25-30% dei pazienti. Il singolo fattore prognostico più importante del CCR è costituito dallo stadio della neoplasia al momento della diagnosi. Il sistema di stadiazione

oggi impiegato per i CCR è rappresentato dalla classificazione TNM-UICC 2009. La sopravvivenza a cinque anni, dopo resezione chirurgica, è del 90% per malattia in Stadio I (tumore che invade la sottomucosa o la muscolare propria, senza interessamento linfonodale o metastasi a distanza) 70-80% in Stadio II (tumore che invade organi adiacenti senza interessamento linfonodale o metastasi a distanza), 40-65% in Stadio III (tumore più o meno invasivo con interessamento dei linfonodi e/o metastasi a distanza).

3.2.3 Terapia

Il trattamento elettivo è rappresentato dalla resezione chirurgica e, alla diagnosi, circa l'80% dei pazienti con CCR si presenta con malattia operabile radicalmente. Il 35% di questi sviluppa una ripresa di malattia che nella maggioranza dei casi (80%) si verifica entro i primi 2 o 3 anni dall'intervento chirurgico e, solitamente, entro i primi 5 anni. Le recidive locali sono rare nel cancro del colon, mentre le sedi più frequenti di ripresa di malattia sono fegato, linfonodi addominali, peritoneo e polmone. Tutti i pazienti con CCR allo Stadio III sono candidati al trattamento chemioterapico adiuvante, che non trova, invece, indicazioni per pazienti con tumore allo Stadio I e II (ad eccezione di pazienti con altri fattori prognostici sfavorevoli); in questi pazienti il trattamento adiuvante ha mostrato una riduzione del rischio relativo di morte del 33%, con un beneficio assoluto di sopravvivenza del 10-15% (NIH consensus conference 1990; André *et al*, 2007). Le evidenze disponibili orientano verso l'impiego del trattamento con combinazioni di 5Fu, acido folinico e oxaliplatino (Kuebler *et al*, 2007; André *et al*, 2009) o di Capecitabina e oxaliplatino (Haller *et al*, 2011) come prima scelta. Una percentuale considerevole di pazienti affetti da CCR può presentarsi in forma localmente avanzata o con malattia linfonodale alla diagnosi. In questi casi il trattamento chirurgico tradizionale è associato ad un elevato rischio di ripresa di malattia a livello pelvico e per questo l'evidenza disponibile da indicazioni favorevoli per il trattamento radioterapico preoperatorio. Quando la radioterapia viene eseguita con frazionamento tradizionale in associazione con chemioterapia concomitante e con dosi superiore ai 30 Gy si osserva una riduzione statisticamente significativa dell'incidenza di recidive locali ed un miglioramento della sopravvivenza (Gérard *et al*, 2006).

3.3 CARCINOMA PANCREATICO

Il carcinoma pancreatico (CP) rappresenta una sfida terapeutica ancora irrisolta a causa della prognosi infausta e della scarsa responsività ai trattamenti disponibili esistenti al

momento. Tra i tumori dell'apparato digerente, rappresenta la neoplasia più letale, con una sopravvivenza media di 4-6 mesi dalla diagnosi (Saif, 2011), e la seconda causa di morte per cancro dopo il carcinoma coloretale (International Agency for Cancer Research, 2008). Esistono tre tipi principali di tumori del pancreas: l'adenocarcinoma duttale, i tumori neuroendocrini (rari) e la neoplasia cistica (meno dell'1%) (Saif, 2011). Tra questi, l'adenocarcinoma duttale, oltre ad essere il più comune, rendendo conto del 90% di tutte le neoplasie pancreatiche, rappresenta la quinta causa di morte per cancro nel mondo (International Agency for Cancer Research, 2008). L'incidenza di CP è maggiore negli uomini piuttosto che nelle donne (rapporto maschi/femmine di 1,6), aumenta al di sopra dei 50 anni di età ed è superiore in paesi industrializzati come Nord America, Europa Occidentale e Asia, piuttosto che in paesi in via di sviluppo.

In Italia, il CP rientra tra le prime cinque cause di morte per tumore nel sesso maschile, mentre occupa il quarto posto nelle donne. Anche nel nostro paese è possibile osservare un'incidenza variabile a seconda delle regioni, con un gradiente Nord-Sud spiccato: rispetto all'Italia settentrionale il Centro mostra livelli di incidenza pari a -20% nei maschi e a -28% nelle femmine, il Sud pari a -10% e -18% rispettivamente. Per quanto concerne la mortalità, il CP, con il 7% dei decessi, entra tra le prime 5 cause di morte per tumore soltanto nel sesso femminile, ma nelle età centrali della vita occupa il quarto posto tra i maschi (7%) e le femmine (7%); in queste ultime anche nelle età più avanzate (AIRTUM Working group, 2013).

3.3.1 Fattori di rischio e predisposizione genetica

Non esistono ad oggi possibilità di screening di massa per il CP. Una sorveglianza più stretta potrebbe essere condotta nei soggetti considerati a maggior rischio. Tuttavia, quelli che sono considerati i più comuni fattori di rischio sono del tutto aspecifici e non vi è concordanza tra i diversi studi che sono stati condotti per valutare il loro ruolo.

Fumo. Il fumo di sigaretta è il fattore di rischio più chiaramente associato all'insorgenza del cancro del pancreas (Vrieling *et al*, 2010). I fumatori presentano un rischio di incidenza da doppio a triplo rispetto ai non fumatori; ben documentata, inoltre, è la diminuzione del rischio in rapporto alla cessazione del fumo (Iodice *et al*, 2008). La somministrazione prolungata di nitroderivati presenti nel tabacco, attraverso interazioni con il DNA, può provocare alterazioni genetiche quali la mutazione attivante dell'oncogene *K-ras*. Attualmente si calcola che circa il 30% dei casi di CP possa essere attribuito al fumo di sigaretta.

Dieta. Una diretta correlazione tra assunzione di grassi alimentari, consumo di carne rossa ed insorgenza di CP è stata evidenziata in alcuni studi (Thiébaud *et al*, 2009). Tali dati tuttavia non sono stati confermati (Raimondi *et al* 2009). L'incremento dell'indice di massa corporea si associa ad un rischio maggiore di sviluppo di neoplasia (Li D *et al*, 2009), aumentato anche, secondo numerosi studi, nell'alcolismo (Lucenteforte *et al*, 2012). *Fattori occupazionali.* L'esposizione professionale a sostanze chimiche come la beta-naftilamina e la benzidina rappresenta un rischio concreto di sviluppare il tumore del pancreas, un dato che è ben noto già dalla fine degli anni Sessanta. Altre sostanze ritenute possibili responsabili sono i solventi, i derivati del petrolio, i pesticidi e il DDT.

Patologie correlate. Numerosi studi hanno dimostrato un'associazione tra insorgenza di diabete mellito di tipo 2 e sviluppo di CP (Gupta *et al*, 2006; Bosman *et al*, 2010). Una maggior incidenza della neoplasia è stata osservata in pazienti sottoposti a pregressa gastrectomia o affetti da pancreatite cronica; in questi ultimi, in particolare, è stato dimostrato un incremento del rischio di sviluppo di CP di 7,2 volte (Bracci *et al*, 2009).

Predisposizione genetica. Il 10% dei pazienti con tumori pancreatici presenta una storia familiare, definita come almeno due parenti di primo grado affetti da cancro del pancreas. Uno studio prospettico condotto in Italia conferma la presenza di una aggregazione familiare in circa il 9% dei pazienti, con un rischio complessivo per i familiari di circa tre volte quello della popolazione generale (Del Chiaro *et al*, 2007). Le sindromi familiari associate allo sviluppo di CP sono (AIOM 2013): *carcinoma pancreatico familiare associato a mutazione di BRCA2 o di geni della Anemia di Fanconi*; *sindrome del cancro mammella e ovaio* da mutazioni germinali di BRCA2 o PALB2; *pancreatite ereditaria autosomica dominante* da mutazioni del gene PRSS1; *sindrome di Peutz Jeghers* legata a mutazione germinale del gene SKT11; *sindrome del nervo displastico* o *sindrome del melanoma familiare*; *sindrome da carcinoma coloretale ereditario non poliposico* (HNPCC).

3.3.2 Manifestazioni cliniche e prognosi

Circa il 60% dei cancri del pancreas origina a livello della testa, il 15% a livello del corpo e il 5% della coda; nel 20% dei casi il tumore interessa in modo diffuso il pancreas intero. Nel 95% dei casi si tratta di adenocarcinomi che originano dall'epitelio duttale. La sopravvivenza e la prognosi variano molto in base alla localizzazione iniziale del tumore: l'80% dei tumori del corpo e della coda del pancreas, contro il 33% di quelli della testa, vengono diagnosticati in stadio avanzato (stadio IV) (Anderson *et al*, 2006). In quasi tutti i

casi il CP rimane silente fintanto che non interessa qualche struttura adiacente. Il dolore si presenta quando il tumore, dopo aver eroso la parete posteriore della cavità addominale, infiltra i nervi. Il dolore è in genere il primo sintomo di presentazione, ma, quando esso appare, la lesione è già, quasi sempre, intrattabile. L'ittero ostruttivo è spesso associato ad un carcinoma della testa del pancreas, ma purtroppo, solo raramente si pensa subito al carcinoma infiltrante come ipotesi diagnostica. Perdita di peso, anoressia, malessere generalizzato ed astenia sono segni e sintomi associati allo stadio avanzato della malattia. La tromboflebite migrante, nota come sindrome di Trousseau, si osserva nel 10% dei pazienti ed è attribuibile alla produzione di fattori aggreganti le piastrine e di procoagulanti da parte del tumore o dei suoi residui necrotici, con un processo comune anche ad altre neoplasie. La progressione sintomatologica del carcinoma pancreatico è tipicamente breve ed inarrestabile. Nonostante la tendenza delle lesioni cefaliche a causare precocemente ostruzione biliare, una percentuale molto bassa dei tumori è resecabili al momento della diagnosi.

3.3.3 *Terapia*

La chirurgia rappresenta l'unico trattamento potenzialmente curativo per l'adenocarcinoma pancreatico. Solo il 20% dei pazienti con CP presenta, tuttavia, una malattia potenzialmente suscettibile di resezione chirurgica alla diagnosi e la sopravvivenza globale, dopo 5 anni dalla chirurgia, non supera il 20%. La sopravvivenza mediana dei pazienti operati radicalmente è compresa fra i 15 e i 25 mesi (AIOM 2013). La maggior parte delle recidive dopo intervento chirurgico radicale si verifica a livello epatico e linfonodale. Anche se non esistono al momento attuale linee guida ben standardizzate relative alla terapia adiuvante dopo resezione chirurgica, essa trova il suo razionale nella necessità di ridurre la recidiva locoregionale dopo l'intervento, sulla base dell'effetto sinergico positivo evidenziato dalla combinazione del 5-Fluorouracile (5-FU) o gemcitabina e radioterapia esterna nel trattamento palliativo dei tumori non resecabili (Shinchi *et al*, 2002; Sultana *et al*, 2009). Il trattamento combinato preoperatorio chemio e radioterapico (CRT) della neoplasia pancreatico localmente avanzata, è considerato in molti lavori vantaggioso in termini di sopravvivenza grazie soprattutto al controllo locale del carcinoma (Breslin *et al*, 2001; Brown *et al*, 2008). I vantaggi teorici sono da ricercare nella precocità di somministrazione di una terapia sistemica, in una maggiore efficacia della radioterapia su tessuti meglio ossigenati, sulla possibilità di evitare una laparotomia in pazienti che nel frattempo sviluppano metastasi extrapancreatiche, nella potenzialità di

migliorare la resecabilità di neoplasie estese altrimenti non resecabili e soprattutto in una diminuzione delle recidive loco-regionali dopo chirurgia. Inoltre rispetto alla chemio-radioterapia post-operatoria il trattamento neoadiuvante può essere somministrato precocemente senza attendere l'inevitabile lungo recupero post-operatorio ed è associato ad una minore incidenza di fistole anastomotiche. A tal proposito il range di resecabilità dopo terapia neoadiuvante è piuttosto variabile, tra l'8% ed il 50%, tuttavia la maggior parte degli studi riportano che il tasso di resecabilità dopo chemio-radioterapia neoadiuvante per neoplasie localmente avanzate è del 10-20% (Massucco *et al*, 2006; Patel *et al*, 2011; Stokes *et al*, 2011). In generale le risposte radiologiche sono modeste ed il downstaging si realizza solo in una minoranza di pazienti. Nei pazienti con malattia avanzata il trattamento neoadiuvante chemioradioterapico migliora il dolore, il catabolismo, nonché i sintomi ostruttivi, ma è puramente palliativo.

In generale, le terapie oggi a disposizione per il trattamento del CP risultano scarsamente efficaci ed è, quindi, fondamentale lo studio di nuovi approcci terapeutici mirati, come la terapia genica o l'immunoterapia specifica (Niccolai *et al*, 2013).

SCOPO

Tra i tumori dell'apparato digerente, quelli a più elevata incidenza sono rappresentati dal cancro dello stomaco, dai tumori del colon-retto e dal tumore del pancreas. La terapia chirurgica rappresenta nel maggiore dei casi l'unico intervento in grado di garantire una possibilità di sopravvivenza per il paziente, ma, da solo, è in grado di garantire un tasso di sopravvivenza a 5 anni molto basso, che si aggira attorno al 20-25%. Anche con l'impiego di strategie terapeutiche combinate, come la chemio-radioterapia, adiuvante o neoadiuvante, si osserva solo un lieve aumento del tasso di sopravvivenza a 5 anni, che rimane del 30-35%. Per questo motivo, ad oggi, le ricerche si stanno concentrando sullo sviluppo di terapie alternative, come l'immunoterapia specifica, che fonda le sue radici sulla capacità del sistema immunitario di riconoscere ed eliminare le cellule tumorali. Sappiamo, però, che le neoplasie clinicamente evidenti ed in progressiva crescita, hanno sviluppato le opportune strategie per eludere le naturali difese immunitarie dell'ospite. Perciò, l'immunoterapia, per essere efficace, deve riuscire ad aumentare la qualità e la quantità delle cellule immuni effettrici, essere indirizzata verso antigeni tumorali effettivamente immunogenici e superare i meccanismi immunosoppressivi indotti dal cancro.

Per meglio comprendere la fattibilità di alcuni approcci immunoterapeutici proposti in letteratura, come vaccinazioni basate sull'iniezione di antigeni tumorali in grado di evocare una risposta immune nell'ospite, oppure il trasferimento adottivo di linfociti T effettrici tumore-specifici, abbiamo progettato uno studio volto a caratterizzare le funzioni effettrici delle cellule T specifiche per antigeni tumore associati (TAA) ed isolate sia da pezzi chirurgici del tumore primario che da sangue periferico di pazienti affetti da CG, CCR e CP. Lo scopo è quello di valutare la risposta T tumore-specifica nella malattia neoplastica e di capire quali peptidi antigenici tumore associati siano maggiormente immunogenici o coinvolti nell'arruolamento delle cellule T regolatorie e/o effettrici, e se l'immunogenicità sia legata all'aplotipo del paziente, in modo da aumentare l'efficacia clinica di eventuali approcci immunoterapeutici.

In particolare, nello studio della risposta immunitaria al CG, abbiamo analizzato la specificità dei linfociti T verso singoli peptidi (*gastric cancer antigen-associated peptides*, GCAA) ottenuti a partire da 12 antigeni noti in letteratura per essere associati al CG, quali: SART1 (Shichjo *et al*, 1998), SART2 (Nakao *et al*, 2000), SART3 (Yang *et al*, 1999),

CypB (Gomi *et al*, 1999), Ick (Imai *et al*, 2001), ART1 (Nishizaka *et al*, 2000), ART4 (Kawano *et al*, 2000), EIF-4EBP (Sato *et al* 2007), ppMAPkkk, UBE2V, HNRPL (Ito *et al*, 2001), WHSC2 (Mine *et al*, 2003); da questi sono stati sintetizzati 30 peptidi ristretti per due soli immunotipi di antigeni di istocompatibilità di classe I (HLA-I) e, precisamente, HLA-A2 ed HLA-A24, che sono quelli maggiormente presenti nella popolazione italiana e toscana in particolare. Tutti i peptidi si sono dimostrati capaci di indurre nelle cellule mononucleate del sangue periferico (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) dei pazienti con adenocarcinoma gastrico un'attività citotossica dei linfociti T tumore-specifici, HLA-A02- o HLA-A24-ristretti (Mine *et al*, 2004; Shichijo *et al*, 1998; Yang *et al*, 1999).

Nel caso di adenocarcinoma pancreatico, abbiamo voluto studiare le caratteristiche dei linfociti T specifici per α -enolasi (ENOA). ENOA è un enzima multifunzionale, iperespresso sulla superficie di molte cellule cancerose, fra cui quelle pancreatiche (Cappello *et al*, 2009). Con la sua capacità di legare il plasminogeno sembra essere in grado di promuovere la migrazione delle cellule cancerose e di indurre metastasi (Capello *et al* 2011). In pazienti con CP, ENOA è in grado di suscitare risposte T, e la presenza di autoanticorpi anti-ENOA si associa ad una prognosi migliore (Tomaino *et al*, 2011). Infine, in modelli genetici murini di CP, la vaccinazione con ENOA si è dimostrata capace di ritardare la progressione tumorale e di allungare il tempo di sopravvivenza dei topi (Cappello *et al*, 2013).

Per quanto concerne il CCR, la scelta dell'antigene è legata alla nostra collaborazione con il Prof. Franco Novelli del Dipartimento di Oncologia Umana dell'Università degli Studi di Torino, che da tempo studia la proteina PDIA3 (*protein disulfide isomerase family A member 3*). Questa glicoproteina, appartenente alla famiglia delle proteine disolfuro isomerasi, si localizza soprattutto a livello del reticolo endoplasmatico dove agisce come disolfuro isomerasi, ossido-reduttasi e chaperone, partecipando al folding delle glicoproteine di nuova sintesi, e dove svolge una funzione importante nel processo di caricamento dei peptidi antigenici sul complesso MHC di I classe (Diedrich *et al*, 2001; Eufemi *et al*, 2004; Garbi *et al*, 2007). Il comportamento più interessante di questa proteina, almeno per i nostri studi, consiste nella sua traslocazione sulla superficie delle cellule tumorali in associazione con calreticulina (CRT); l'esposizione del complesso PDIA3/CRT a livello del plasmalemma permette l'apoptosi indotta dalle antracicline. L'esposizione della PDIA3 sulla superficie delle cellule tumorali potrebbe quindi innescare una risposta immune diretta contro di esse (Obeid *et al*, 2007; Obeid, 2008). Nei laboratori

diretti dal Prof. Novelli è stato osservato come alcuni pazienti affetti da CCR presentino una risposta anticorpale alla PDIA3 (che sembra correlarsi positivamente con la sopravvivenza globale dei pazienti) e che la PDIA3 è in grado di attivare una risposta T specifica. Sulla base di queste osservazioni abbiamo deciso di caratterizzare meglio la risposta immune T PDIA3-specifica in pazienti affetti da adenocarcinoma coloretale.

MATERIALI E METODI

Casistica

Per la valutazione della risposta immune T GCAA-specifica sono stati selezionati 20 pazienti affetti da adenocarcinoma gastrico (13 maschi e 7 femmine), di cui 8 con cancro di tipo diffuso e 12 con cancro di tipo intestinale. L'età dei pazienti risultava compresa fra i 62 e i 79 anni (età media 68 anni). Come controllo sono stati presi in esame 15 pazienti affetti da gastrite cronica (9 maschi e 6 femmine, età media 65 anni). Tutti i soggetti arruolati nello studio risultavano positivi per HLA-A24 e/o HLA-A02 (Tabella 1).

Per lo studio della risposta immune T-specifica verso ENO-A sono stati reclutati 15 pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico duttale (8 maschi e 7 femmine) sottoposti a resezione chirurgica della lesione primaria senza prima aver ricevuto trattamenti chemioterapici. L'età dei pazienti variava da 36 a 92 anni, per una media di 63 anni (Tabella 2). Per ciascun paziente sono stati prelevati frammenti di mucosa pancreatica provenienti dalla regione centrale del tumore (CT), dalla regione a margine del tumore (MT) e dalla circostante mucosa sana (HS).

Infine, per l'analisi della risposta T PDIA3-specifica sono stati arruolati dieci pazienti con adenocarcinoma coloretale (6 maschi e 4 femmine), di età compresa fra i 52 e gli 83 anni (età media 70), sottoposti a resezione chirurgica ma non trattati chemioterapicamente (Tabella 3). Anche in questo caso sono stati prelevati frammenti di mucosa intestinale provenienti dalla regione centrale del tumore (CT), dalla regione a margine del tumore (MT) e dalla circostante mucosa sana (HS).

In tutti i casi sono stati esclusi dallo studio pazienti affetti da gravi patologie autoimmuni, malattie infettive o immunodeficienze.

Con l'approvazione del Comitato Etico locale, ciascun paziente ha fornito un consenso informato scritto.

Tabella 1. Caratteristiche dei 20 pazienti e dei 15 controlli, arruolati per lo studio della risposte immune T GCAA-specifica. AG (d)= adenocarcinoma gastrico di tipo diffuso; AG (i)= adenocarcinoma gastrico di tipo intestinale; GC = gastrite cronica.

| Pazienti | Sesso | Età | HLA-A | Diagnosi |
|----------|-------|-----|---------|----------|
| P.F. | M | 63 | A24 | AG (d) |
| C.A. | F | 65 | A24 | AG (d) |
| B.G. | M | 62 | A02 | AG (i) |
| B.B. | M | 72 | A02-A24 | AG (d) |
| B.S. | F | 71 | A24 | AG (i) |
| C.S | M | 68 | A24 | AG (d) |
| B.G. | M | 74 | A02-A24 | AG (i) |
| D.N. | F | 65 | A24 | AG (d) |
| M.S. | F | 64 | A02 | AG (i) |
| C. A. | M | 62 | A02 | AG (i) |
| P.M.C. | F | 64 | A02 | AG (i) |
| C.A. | F | 63 | A02 | AG (d) |
| B.A. | M | 77 | A24 | AG (i) |
| F.M. | M | 66 | A02 | AG (d) |
| B.A. | M | 74 | A02-A24 | AG (i) |
| M.G. | F | 79 | A02 | AG (i) |
| C.C. | M | 66 | A02A24 | AG (d) |
| B.F. | M | 60 | A24 | AG (i) |
| M.M. | F | 65 | A02 | AG (i) |
| B.S. | M | 63 | A02-A24 | AG (i) |
| P.L. | M | 59 | A24 | GC |
| L.L. | F | 61 | A02 | GC |
| A.G. | M | 65 | A02 | GC |
| S.F. | M | 75 | A24 | GC |
| T.S. | F | 65 | A02 | GC |
| G.G. | M | 71 | A02-A24 | GC |
| Z.F. | M | 64 | A24 | GC |
| V.A. | F | 62 | A02 | GC |
| V.V. | M | 64 | A24 | GC |
| T.F. | M | 62 | A02 | GC |
| C.J. | F | 74 | A02-A24 | GC |
| L.S. | M | 63 | A24 | GC |
| B.U. | M | 71 | A02-A24 | GC |
| P.O. | F | 62 | A24 | GC |
| C.Z. | F | 62 | A02 | GC |

Tabella 2. Caratteristiche dei 15 pazienti con adenocarcinoma pancreatico arruolati per lo studio della risposta immune T ENO-A specifica.

| Paziente | Età | Sesso | TNM | Sopravvivenza globale (mesi) |
|-------------|-----|-------|-------------|------------------------------|
| P.P. | 50 | M | pT3, N1, Mx | 11 |
| M.R. | 73 | M | pT4, N1, Mx | 12 |
| P.R. | 56 | M | pT3, N0, Mx | 8 |
| P.T. | 36 | M | pT2, N1, M1 | 7 |
| N.N. | 74 | F | pT3, N1, Mx | 9 |
| M.E. | 61 | F | pT2, N1, Mx | 8 |
| D.A. | 63 | M | pT3, N1, Mx | 12 |
| R.A. | 74 | F | pT3, N0, Mx | 8 |
| M.M. | 54 | F | pT3, N0, Mx | 14 |
| P.L. | 92 | M | pT3, N1, Mx | 9 |
| C.M. | 57 | M | pT2, N1, M1 | 10 |
| R.A. | 51 | F | pT4, N1, Mx | 11 |
| B.B. | 72 | F | pT3, N1, Mx | 8 |
| B.R. | 80 | F | pT2, N1, M1 | 12 |
| R.P. | 58 | M | pT3, N0, Mx | 13 |

Tabella 3. Caratteristiche dei 10 pazienti con CCR arruolati per lo studio della risposta T PDIA3-specifica.

| Pazienti | Sesso | Età | Diagnosi | Stadizione TNM |
|---------------|-------|-----|------------------------|----------------|
| S.M.S | F | 71 | Adenocarcinoma | pT3 NO Mx |
| M.V. | M | 83 | Adenocarcinoma | pT3 NO Mx |
| C.G. | M | 75 | Adenoma tubulo-villoso | pT3 N2a Mx |
| T.B.G. | M | 73 | Adenocarcinoma | pT3 NO Mx |
| C.G. | M | 64 | Adenocarcinoma | pT3 N1B Mx |
| I.M.P. | F | 75 | Adenocarcinoma | pT2 NO Mx |
| C.R. | M | 52 | Adenocarcinoma | pT3 N2a Mx |
| N.V. | M | 72 | Adenocarcinoma | pT2 NO Mx |
| M.I. | F | 63 | Adenocarcinoma | pT3 N2a Mx |
| B.P. | F | 68 | Adenocarcinoma | pT2 NO Mx |

Reagenti

Per il mezzo di coltura dei linfociti T sono stati utilizzati: medium RPMI 1640 2.0 g/L NaHCO_3 senza Glutammina (Biochrome, Leonorenstr, Berlino), supplementato con 2mmol/L di L-Glutammina (Euroclone, Italia), 1% di Sodio Piruvato 100MM (Gibco Laboratories, USA), 1% di Aminoacidi Non Essenziali (NEAA) 100X (Gibco Laboratories, USA), 2×10^{-5} mol/L di 2-Mercaptoetanololo (Sigma-Aldrich, USA), 20% di HB basal medium ricostituito (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA), 10% di siero bovino fetale (FBS) Hyclone (Hyclone Laboratories, South Logan, Utah) ed interleuchina 2 umana ricombinante (rIL-2) (gentilmente donata da Eurocetus, Milano, Italia). La fitoemoagglutinina (PHA, forma M) è stata acquistata dalla Gibco Laboratories (Grand Island, USA); ionomicina e phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) dalla ditta Sigma (St.Louis, USA). Gli anticorpi monoclonali (mAbs) anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD20, anti-IFN- γ , anti-IL-4, anti-CD25, anti-CD28 e anti-CD49d sono stati comprati dalla BD Biosciences (San Jose, USA); gli mAbs anti-HLA-DR e anti-HLA-A-B-C dalla Immunotech (Beckam Coulter, Marseille, France). Gli mAbs anti-IL10, anti-TGF- β (isoforma TGF- β 1) e anti-FoxP3 ed i kit ELISA per il dosaggio di IL-10, IFN- γ , IL-4 e IL-17, sono stati acquistati dalla eBioscience (Bender MedSystems, GmbH, Vienna, Austria). I peptidi antigenici associati a cancro gastrico (GCAA) sono stati preparati dalla Multiple Peptide System (San Diego, USA). Le sequenze aminoacidiche dei singoli peptidi e le restrizioni HLA sono riportate in Tabella 4.

La proteina α -enolasi (ENOA) ricombinante e la proteina PDIA3 ricombinante sono state gentilmente fornite dal Prof. F. Novelli (Università degli Studi di Torino).

Tabella 4. Sequenze aminoacidiche dei 30 peptidi ottenuti a partire da 12 antigeni associati a cancro gastrico, 14 dei quali ristretti per HLA-A24 e 16 ristretti per HLA-A02.

| Antigene Tumore-Associato | Peptidi: Sequenza aminoacidica e Restrizione HLA | |
|---------------------------|--|--------------------------|
| | HLA-A24 | HLA-A02 |
| SART1 | SART1-690 (EYRGFTQDF) | |
| SART2 | SART2-93 (DYSARWNEI) | |
| | SART2-161 (AYDFLYNYL) | |
| | SART2-899 (SYTRLFLIL) | |
| SART3 | SART3-109 (VYDYNCHVDL) | SART3-302 (LLQAEAPRL) |
| | SART3-315 (AYIDFEMKI) | SART3-309 (RLAEYQAYI) |
| Cyp B | CypB-84 (KFHRVIKDF) | CypB-129 (KLKHYGPGWV) |
| | CypB-91 (DFMIQGGDF) | CypB-172 (VLEGMEVV) |
| lck | lck-208 (HYTNASDGL) | lck-246 (KLVERLGAA) |
| | lck-486 (TFDYLRSVL) | lck-422 (DVWSFGILL) |
| | lck-488 (DYLRVLEDF) | |
| ART-1 | ART1-170 (EYCLKFTKL) | |
| ART-4 | ART4-13 (AFLRHAAL) | |
| | ART4-75 (DYPSLSATDI) | |
| EIF-4EBP | | EIF-4EP-51 (RIIYDRKFL) |
| ppMAPkkk | | ppMAPkkk-294 (GLLFLHTRT) |
| | | ppMAPkkk-432 (DLLSHAFFA) |
| WHSC2 | | WHSC2-103 (ASLSDPWV) |
| | | WHSC2-141 (ILGELREKV) |
| UBE2V | | UBE2V-43 (RLQEWCSVI) |
| | | UBE2V-85 (LIADFLSGL) |
| | | UBE2V-208 (ILPRKHHRI) |
| HNRPL | | HNRPL-140 (ALVEFEDVL) |
| | | HNRPL-501 (NVLHFFNAPL) |

SART: Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells; **Cyp:** Peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B); **lck:** lymphocyte-specific protein tyrosine kinase; **ART:** adenocarcinoma antigen; **EIF4BP:** eIF-binding protein; **ppMAPkkk:** partial putative mitogen-activated protein kinase kinase kinase; **WHSC2:** Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2 protein; **UBE2V:** ubiquitin-conjugating enzyme variant Kua; **HNRPL:** heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L.

Tipizzazione HLA

Per la determinazione dell'immunogenotipo dei pazienti affetti da adenocarcinoma gastrico è stata impiegata la tecnica della PCR-SSP (*Sequence Specific Primers*). Tale metodica può essere suddivisa in quattro fasi, la prima delle quali prevede l'estrazione del DNA da sangue periferico, la seconda 96 PCR simultanee in microprovette con primers liofili attaccati sul fondo, la terza la separazione dei frammenti su gel di agarosio, la quarta l'analisi dei risultati tramite apposito software.

Induzione di linee linfocitarie T dagli infiltrati tissutali

Al fine di favorire l'espansione in vitro dei linfociti T attivati *in vivo*, i frammenti di tessuto gastrico, pancreatico e coloretale, sono stati immediatamente posti in coltura con rIL-2 (50 U/ml) in un medium RPMI 1640 addizionato con L-glutamina 2mM, 2-mercaptoetanololo 2×10^{-5} M, sodio piruvato, NEAA, siero umano (HS) al 3%, FBS al 10%, 20% HB basal medium ricostituito (medium completo). Dopo dieci giorni di coltura i linfociti T vitali sono stati contati, risospesi in medium completo addizionato con rIL-2 (30 U/ml) e clonati.

Preparazione dei cloni T

Cellule linfoblastiche T purificate, ottenute dalle linee linfocitarie derivate dagli infiltrati tissutali, sono state clonate secondo la tecnica della diluzione limite (0,3 cellule per pozzetto) in micropiastre con pozzetti a fondo a U contenenti 10^5 PBMC eterologhe con funzione di cellule "feeder", irradiate a 9000 rad, in un volume finale di 0,2 ml di medium completo in presenza di PHA (0,5% vol/vol) e rIL-2 (30 U/ml). Dopo 1 settimana, alle microcolture è stato aggiunto 0,1 ml di medium completo contenente nuove cellule "feeder" irradiate e rIL-2. Tale procedimento è stato ripetuto ad intervalli settimanali. Dopo circa tre settimane i cloni T originati sono stati espantati e posti in espansione fino ad ottenere per ciascun clone un numero di blasti T sufficiente a consentire lo studio fenotipico e funzionale. Il fenotipo dei blasti di cloni T è stato quindi studiato mediante citofluorimetria a flusso. Al fine di valutare l'efficienza di clonazione, venivano contemporaneamente messi in coltura linfociti T a diverso grado di diluzione limite. La frequenza delle cellule proliferanti o efficienza di clonazione è stata valutata mediante

l'analisi della distribuzione Poissoniana, che correla il numero delle cellule poste in coltura alle varie diluizioni limite ed il logaritmo della percentuale delle colture non proliferanti.

Analisi citofluorimetrica dei marker superficiali e intracitoplasmatici delle cellule T

L'analisi dei marcatori sia di superficie sia intracitoplasmatici delle cellule T è stata condotta attraverso citofluorimetria, con l'impiego di anticorpi anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-FoxP3, anti-TGF- β , coniugati a differenti fluorocromi. Le cellule sono state analizzate con il BD FACScan utilizzando il software DIVA, acquisendo un totale di 10^4 eventi per campione.

Analisi della specificità dei cloni T verso gli antigeni tumore associati (TAA).

I cloni linfocitari T ottenuti sono stati analizzati per la loro specificità in un test di proliferazione ai TAA. I blasti (5×10^4) di ciascun clone T sono stati co-coltivati con 10×10^4 PBMC autologhe (irradiate a 9000 rad) in micropiastre con pozzetti a fondo a U in presenza del solo medium, o dei TAA (10 $\mu\text{g/ml}$); ogni condizione di coltura è stata allestita in triplicato. Dopo 48 ore sono stati aggiunti ad ogni singolo pozzetto 0,5 μCi di timidina triziata ($^3\text{H-TdR}$) e trascorse ulteriori 16 ore è stata misurata l'incorporazione di quest'ultima. Un indice mitogenico (rapporto tra la media delle conte per minuto nelle colture antigene-stimolate e di quelle non stimolate) maggiore di 5 è stato considerato come significativo di proliferazione allo specifico TAA.

Analisi del repertorio delle catene V β del TCR dei cloni T-TAA specifici

Come test di effettiva clonalità, per tutti i cloni T antigene-specifici ottenuti, è stato analizzato il repertorio delle catene V β del TCR attraverso un pannello di 24 mABs specifici per 24 diverse famiglie di catene V β umane: V β 1, V β 2, V β 3, V β 4, V β 5.1, V β 5.2, V β 5.3, V β 7.1, V β 7.2, V β 8, V β 9, V β 11, V β 12, V β 13.1, V β 13.2, V β 13.6, V β 14, V β 16, V β 17, V β 18, V β 20, V β 21.3, V β 22 e V β 23 (TCR V β Repertoire Kit, Beckman Coulter, Fullerton, USA). Come isotipo di controllo è stata usata una immunoglobulina (Ig) non specifica. Le cellule sono state analizzate con il BD FACScan utilizzando il software DIVA (Becton Dickinson).

Caratterizzazione del profilo citochinico dei cloni T TAA-specifici

Per dimostrare la produzione di citochine da parte dei cloni T TAA-specifici sono stati messi in coltura per 48 ore in duplicato, 10^6 blasti T di ogni clone in 1ml di medium contenente 5×10^5 cellule mononucleate autologhe da sangue periferico utilizzate come APC insieme ai peptidi (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Per indurre la produzione di citochine in cloni T non specifici per i TAA, i blasti T sono stati stimolati per 36 ore con PMA (10 ng/ml) in micropozzi ricoperti con mAb anti-CD3. I campioni in doppio di ogni supernatante sono stati testati per la presenza di IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-17, IL-10, mediante test ELISA. I cloni i cui surnatanti mostravano livelli di IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-17, IL-10 superiori ai livelli medi più 5 deviazioni standard (DS) rilevati nei surnatanti di controllo provenienti da cellule feeder irradiate, sono stati considerati positivi. I cloni T capaci di produrre IFN- γ ma non IL-4 o IL-5 sono stati classificati come Th1/Tc1; i cloni in grado di produrre IL-4 e/o IL-5 ma non IFN- γ come Th2/Tc2; i cloni produttori sia IFN- γ che IL-4 e IL-5 come Th0/Tc0; i cloni produttori IL-17 come Th17/Tc17; i cloni in grado di produrre IL-10 e Foxp3⁺ come Treg.

Preparazione dei linfociti B e loro immortalizzazione con il virus di Epstein-Barr (EBV)

I campioni di sangue venoso eparinato sono stati raccolti sterilmente da ciascuno dei pazienti reclutati per lo studio. Le cellule mononucleate sono state isolate su gradiente di densità di Ficoll-Hypaque e successivamente lavate con medium/FBS 10%. La separazione dei linfociti T è stata ottenuta mediante tecnica di doppio "rosetting" con emazie di montone previamente sensibilizzate con Neuroaminidasi (Sigma). Prima del procedimento di "rosetting", le cellule mononucleate sono state depletate della componente monocitario-macrofagica mediante aderenza su plastica per 1 ora a 37°C. Le cellule non aderenti sono state recuperate, contate e sottoposte a doppio "rosetting". Le cellule T rosettanti sono state separate dalle cellule non-T mediante gradiente di densità su Ficoll-Hypaque. Le cellule non-T (indicate per semplicità "cellule B") risultavano generalmente costituite da un 60-80% di cellule B (CD20-positive), 1% circa di cellule T (CD3-positive) e dal 10-30% circa di monociti-macrofagi. Per ottenere linee cellulari di linfociti B trasformati da EBV (linfociti B-EBV), i linfociti B sono stati incubati per 48 ore con il surnatante della linea

B95.8 che libera il virus EBV, e successivamente espansi in medium completo arricchito con il 15% di FBS.

Metodo di misurazione dell'attività citotossica legata al sistema delle perforine

Per determinare l'attività citotossica dei cloni linfocitari T mediata da perforine, blasti T dei cloni TAA-specifici sono stati incubati ad un rapporto di 10, 5, 2,5 a 1 con linfociti B autologhi trasformati da Epstein Barr-virus (cellule B-EBV) marcati con ^{51}Cr e preincubati con i TAA o con peptidi. Dopo aver favorito il contatto cellula-cellula mediante centrifugazione, sono stati incubati in micropiastre con fondo a V (Greiner, Labor-Technik) per 8 ore a 37°C e 0,1 ml di surnatante è stato rimosso per stimare il rilascio di ^{51}Cr . Il rilascio massimale (MR) è stato ottenuto trattando le cellule bersaglio con 0,1 mL di HCl 1 M. Il rilascio spontaneo (SR) è stato determinato in microcolture senza cellule T. La lisi specifica è stata calcolata secondo la formula: percentuale di lisi specifica = $100 \times (\text{rilascio sperimentale} - \text{SR}) / (\text{MR} - \text{SR})$. Le colture in cui il rilascio di ^{51}Cr superava la media del rilascio spontaneo di oltre 5 deviazioni standard sono state considerate positive per l'attività citotossica. L'abilità dei cloni T specifici ad esprimere citotossicità mediata da perforine è stata confermata in un test lectino-dipendente utilizzando come bersaglio cellule di mastocitoma murino (P815) marcate con ^{51}Cr al rapporto cellula effettrice/cellula bersaglio di 10, 5 e 2,5 a 1 in presenza di PHA (1% vol/vol). Inoltre, in alcuni casi, per valutare se la citotossicità dei cloni T TAA-specifici verso le cellule bersaglio fosse TAA/HLA dipendente, il test è stato eseguito anche in due differenti condizioni: (a) con cellule B-EBV marcate con ^{51}Cr e preincubate con TAA in presenza di mAbs anti-HLA-DR (10 $\mu\text{g/ml}$) per saggiare i cloni T specifici CD4^+ e (b) in presenza di mAbs anti-HLA-B-C per saggiare i cloni T specifici CD8^+ .

Metodo per la determinazione della capacità dei cloni linfocitari T di indurre apoptosi mediata da Fas-FasL.

La capacità di indurre apoptosi mediata dall'interazione Fas-FasL dei cloni T è stata determinata utilizzando come bersaglio cellule Fas^+ della linea Jurkat per i linfociti T isolati dagli infiltrati gastrici, della linea Panc1 per quelli isolati dagli infiltrati pancreatici e della linea SW620 per quelli isolati dal tumore del colon-retto. In breve, blasti di ciascun clone linfocitario T sono stati lavati tre volte, contati e posti in coltura con cellule della

linea cellulare specifica marcate con ^{51}Cr , ad un rapporto effettore/ bersaglio di 10, 5, 2,5 a 1, per 18 ore in presenza di PMA (10 ng/ml) e ionomicina (1mM/L). La lisi specifica è stata calcolata seguendo la formula riportata sopra. Per bloccare l'interazione Fas-Fas ligando è stato usato il mAb bloccante anti-Fas (M3) (Immunex Corp. Seattle, WA) alla concentrazione finale di 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in un pretrattamento di 30 minuti con cellule della linea specifica ^{51}Cr marcate. Durante il test citolitico sono stati inoltre aggiunti l'anti-Fas o il suo isotipo (IgG1) di controllo alla concentrazione finale di 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Le analisi statistiche dei risultati sono state valutate mediante l'utilizzazione del test χ .

Ricerca di cellule T TAA-specifiche nel sangue periferico dei pazienti.

Per testare la presenza di cellule T TAA-specifiche nel sangue periferico di pazienti, le PBMC ottenute attraverso centrifugazione su gradiente di densità con Ficoll-Hypaque, sono state risospese in terreno arricchito con il 3% di siero umano. Le PBMC (3×10^5) sono state coltivate per 96 ore in presenza o del solo terreno o di terreno arricchito di TAA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 16 ore prima dell'analisi, sono stati aggiunti 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ di [^3H] timidina e l'incorporazione del radionuclide è stata misurata tramite un β -counter. Un Indice Mitogenico (IM) superiore a 5 è stato considerato positivo.

Induzione di linee cellulari T TAA-specifiche

Per ottenere linee di cellule T TAA-specifiche dal sangue periferico dei pazienti, abbiamo messo in coltura 10^6 PBMC di ogni paziente in 2 ml di terreno RPMI 1640 arricchito con 2mM L-glutammina, 2×10^{-5} M 2-ME (mercaptoetanololo) e 5% di siero umano (medium completo), in piastre da 24 pozzetti per 5 giorni, stimolandole con i TAA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Al quinto giorno di coltura è stata aggiunta rIL-2 (30 U/ml). Dopo altri sette giorni, i blasti di cellule T ottenuti sono stati risospesi in terreno completo e si è proceduto all'analisi dell'espressione citochinica intracitoplasmatica.

Analisi citofluorimetrica della produzione citochinica intracitoplasmatica delle linee T TAA-specifiche.

1×10^6 blasti di cellule T sono stati stimolati con i singoli TAA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e con i costimoli anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e anti-CD49d (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) per 6 ore, in presenza di brefeldina A

(5µg/ml). Dopo le sei ore di incubazione le cellule sono state lavate due volte con PBS, pH 7.2, fissate con formaldeide (2% in PBS, pH 7.2), lavate due volte con PBS 0.5% BSA, pH 7.2, permeabilizzate con PBS 0.5% BSA, pH 7.2, contenente 0.5% saponina, e infine incubate con specifici anticorpi monoclonali (anti-IFN γ , anti-IL-4). Le cellule sono state analizzate utilizzando un citofluorimetro FACScan, attraverso il software DIVA. In tutte le analisi citofluorimetriche sono stati acquisiti 10⁴ eventi.

Metodo per la valutazione delle capacità soppressive dei cloni Treg TAA-specifici.

Per saggiare la capacità dei cloni Treg TAA-specifici di sopprimere l'attività proliferativa antigene-indotta di cellule T effettrici TAA-specifiche autologhe, 2x10⁴ Treg antigene-specifiche sono state messe in coltura con 4x10³ DC autologhe caricate con l'antigene o meno ed irradiate (9000 rad), in presenza di 2x10⁴ cellule di cloni Treg antigene-specifici. Le DC sono state ottenute mediante il Blood Dendritic Cell Isolation kit II (Mylteni Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Il quarto giorno, dopo 8 ore di incubazione con 0,5 µCi di ³H-TdR per pozzo, è stata misurata l'incorporazione del radionuclide attraverso un β -counter. Il tossoide tetanico (TT) è stato utilizzato come controllo della specificità dei cloni T.

ELISA

I livelli di anticorpi anti-ENOA nel siero dei pazienti affetti da CP è stato misurato attraverso test ELISA, impiegando l' anticorpo primario rGST-ENOA (2 µg/ml in Na₂CO₃ 0,1 M 50 µl/pozzo) ed un anticorpo secondario anti-IgG umano HRP-coniugato (1:2000 Santa Cruz). Per accertare la presenza di anticorpi anti-ENOA-IgG abbiamo preso come valore soglia il valore OD + 3SD ottenuto dal siero di 45 soggetti sani della stessa età media dei pazienti (0,13). I valori compresi tra 0,13 e 0,622 (valore massimo ottenuto dal siero di un paziente CP) sono stati suddivisi in tre, per assegnare il valore (+) per OD compresi tra 0,13 e 0,294, (++) per OD compreso tra 0,294 e 0,458 e (+++) per OD compreso tra 0,458 e 0,622.

Analisi statistica

I valori sono espressi come media \pm la deviazione standard (SD). La comparazione statistica è stata eseguita usando il *t*-test di Student, il test non parametrico di Mann-

Whitney o il coefficiente di correlazione di Spearman, a seconda del caso. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per un $p < 0,05$.

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNE T SPECIFICA PER ANTIGENI TUMORALI ASSOCIATI AL CANCRO GASTRICO (GCAA)

Questa parte dello studio si è concentrata sull'analisi delle caratteristiche fenotipico-funzionali dei linfociti T specifici per GCAA, isolati sia dal tessuto gastrico sia dal sangue periferico di pazienti con adenocarcinoma gastrico (AG) e sulla comprensione dei GCAA realmente ed efficacemente immunodominanti nella risposta che il singolo paziente monta contro il tumore.

Abbiamo, quindi, provveduto all'arruolamento di 20 pazienti affetti da AG e di 15 controlli di malattia (soggetti affetti da gastrite cronica, GC), tutti positivi per HLA-A02 e/o HLA-A24. Ogni singolo paziente è stato tipizzato da un punto di vista immunogenotipico, tramite la tecnica della PCR-SSP (Sequence Specific Primers) (Tabella 1).

In una prima fase dello studio, campioni di tessuto neoplastico ottenuti dai pazienti e biopsie di mucosa gastrica prelevati dai controlli di malattia sono stati messi in coltura al fine di isolare linfociti T attivati *in vivo* che successivamente sono stati clonati con la tecnica della diluizione limite. La progenie clonale è stata poi caratterizzata dal punto di vista fenotipico, tramite analisi al citofluorimetro, e dal punto di vista della specificità verso i GCAA e del profilo funzionale; dei cloni T peptide-specifici è stata, infatti, valutata la capacità di produrre citochine e di distruggere le cellule neoplastiche tramite meccanismi di citotossicità. In una seconda fase, abbiamo voluto, inoltre, analizzare l'eventuale presenza di cellule T specifiche per i peptidi GCAA nel sangue periferico dei pazienti con adenocarcinoma gastrico, con lo scopo di analizzarne le caratteristiche fenotipico-funzionali e di confrontarle con quelle dei TIL ottenuti dalle lesioni neoplastiche dello stesso paziente.

1.1 Linfociti T GCAA-specifici infiltrano il tessuto neoplastico dei pazienti con adenocarcinoma.

Dai campioni di tessuto neoplastico di 20 pazienti affetti da AG siamo riusciti ad isolare e clonare complessivamente 753 cloni, di cui 437 cloni T *helper* CD4⁺ (58%) e 316 cloni T CD8⁺ (42%). Dalle biopsie gastriche dei 15 controlli di malattia abbiamo ricavato 402 cloni, di cui 282 cloni T CD4⁺ (70%) e 120 T CD8⁺ (30%) (Tabella 5). Per determinare la specificità dei cloni T isolati nei confronti dei GCAA in studio, i cloni T sono stati sottoposti a saggio di proliferazione in risposta a ciascuno dei peptidi. Per i pazienti affetti da AG è stato visto che: dei 437 cloni CD4⁺ ben il 15% (65/437) proliferava in risposta ad uno dei diversi peptidi testati; di questi, 30 erano specifici per peptidi ristretti per HLA-A24 e 35 per peptidi HLA-A02-ristretti (Figura 3A). Tra i cloni CD8⁺, il 18% (59/316) proliferava in risposta ad uno dei GCAA; 29 verso peptidi ristretti per HLA-A24, 30 verso peptidi HLA-A02-ristretti (Figura 3B). Nel 15% dei pazienti, ovvero nei casi B.B., C.S. e M.G., non è stato trovato alcun clone linfocitario T GCAA-specifico.

Per quanto riguarda i soggetti affetti da GC, per nessuno dei 282 cloni CD4⁺ e dei 120 cloni CD8⁺ è stata osservata proliferazione in risposta ai GCAA presentati da cellule APC autologhe.

Tabella 5. Numero di cloni T CD4⁺ e CD8⁺ (di cui reattivi per peptidi GCAA) isolati dal tessuto neoplastico di pazienti con adenocarcinoma gastrico (AG) e dalle biopsie gastriche di pazienti con gastrite cronica (GC).

| Pazienti e sorgente di linfociti T | allele HLA-A | n° di cloni T CD4 ⁺ (n° di cloni GCAA specifici) | n° di cloni T CD8 ⁺ (n° di cloni GCAA specifici) |
|--|--------------|--|--|
| <u>Tessuto neoplastico di pazienti con AG</u> | | | |
| P.F. | A24 | 26 (5) | 15 (4) |
| C.A. | A24 | 20 (2) | 12 (3) |
| B.G. | A02 | 22 (4) | 18 (4) |
| B.B. | A02-A24 | 15 (0) | 10 (0) |
| B.S. | A24 | 21 (4) | 17 (5) |
| C.S | A24 | 18 (0) | 11 (0) |
| G.B. | A02-A24 | 27 (3) | 19 (4) |
| D.N. | A24 | 25 (4) | 15 (4) |
| M.S. | A02 | 18 (3) | 14 (3) |
| C. T. | A02 | 22 (4) | 15 (4) |
| P.M. | A02 | 22 (4) | 20 (3) |
| A.C. | A02 | 23 (4) | 18 (2) |
| B.A. | A24 | 23 (5) | 20 (3) |
| F.M. | A02 | 23 (4) | 19 (3) |
| B.Z. | A02-A24 | 21 (3) | 17 (4) |
| M.G. | A02 | 16 (0) | 11 (0) |
| C.C. | A02A24 | 26 (4) | 18 (4) |
| B.F. | A24 | 22 (4) | 21 (3) |
| M.M. | A02 | 23(4) | 12 (3) |
| B.S. | A02-A24 | 24(4) | 14 (3) |
| <i>tutti i pazienti</i> | | 437 (65) | 316 (59) |
| <u>Biopsie gastriche di controlli di malattia</u> | | | |
| P.L. | A24 | 22 (0) | 11 (0) |
| L.L. | A02 | 25 (0) | 10 (0) |
| A.G. | A02 | 18 (0) | 8 (0) |
| S.F. | A24 | 20 (0) | 9 (0) |
| T.S. | A02 | 22 (0) | 11(0) |
| G.G. | A02-A24 | 17 (0) | 7 (0) |
| Z.F. | A24 | 19 (0) | 7 (0) |
| V.A. | A02 | 14 (0) | 8 (0) |
| V.V. | A24 | 19 (0) | 9 (0) |
| T.F. | A02 | 17 (0) | 8 (0) |
| C.J. | A02-A24 | 15 (0) | 6 (0) |
| L.S. | A24 | 21 (0) | 8 (0) |
| B.U. | A02-A24 | 22 (0) | 8 (0) |
| P.O. | A24 | 16 (0) | 4 (0) |
| C.Z. | A02 | 15 (0) | 6 (0) |
| <i>tutti i controlli</i> | | 282 (0) | 120 (0) |

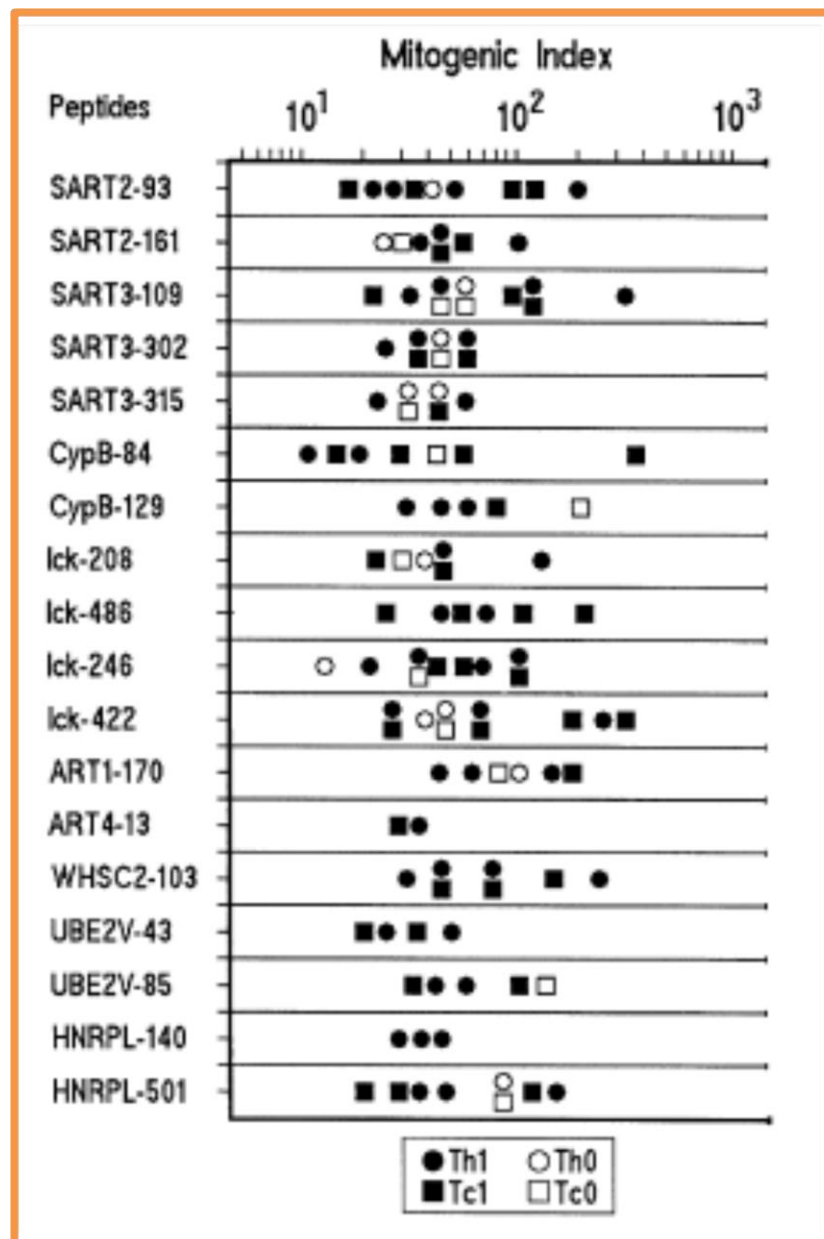


Figura 3. Specificità dei cloni T, derivati dai TIL infiltranti il tessuto neoplastico di pazienti con AG, verso il repertorio di GCAA testato. I cloni Th1 e Th0 CD4⁺ (cerchi neri e bianchi rispettivamente) ed i cloni Tc1 e Tc0 CD8⁺ (quadrati neri e bianchi rispettivamente) sono stati saggiati mediante test di proliferazione verso i peptidi in presenza di APC autologhe irradiate.

Alcuni cloni T GCAA-specifici, sia CD4⁺ sia CD8⁺, si sono mostrati in grado di proliferare in risposta ad uno o più peptidi testati; una maggiore reattività si osserva nei confronti dei peptidi derivanti dagli antigeni SART3 (24 cloni) e lck (32 cloni) (Figura 4).

| Pazienti | N° di cloni reattivi T CD4 ⁺ | N° di cloni reattivi T CD8 ⁺ |
|----------|--|--|
| 02.CC | 2 | SART3-315 |
| | 1 | SART3-309 |
| | 1 | lck-246 |
| 03.CA | 3 | lck-422 |
| | 1 | UBE2V-43 |
| 04.FM | 3 | CypB-172 |
| | 1 | SART3-309 |
| 05.PF | 2 | SART2-93 |
| | 2 | lck-208 |
| | 1 | lck-488 |
| 06.CAn | 2 | CypB-84 |
| | | ART4-13 |
| 08.DN | 2 | lck-208 |
| | 2 | SART3-109 |
| 09.BG | 2 | lck-246 |
| | 1 | ART4-13 |
| 10.BA | 2 | SART2-93 |
| | 1 | HNRPL-140 |
| 11.BS | 2 | SART2-161 |
| | 2 | HNRPL-140 |
| | | CypB-84 |
| 12.BG | 2 | lck-422 |
| | 1 | SART3-302 |
| | 1 | UBE2V-85 |
| 13.MS | 2 | SART3-302 |
| | 1 | WHSC2-103 |
| 14.AC | 2 | HNRPL-501 |
| | 1 | UBE2V-43 |
| | 1 | UBE2V-85 |
| 15.PM | 2 | SART3-302 |
| | 2 | lck-246 |
| 17.MM | 2 | WHSC2-103 |
| | 2 | HNRPL-501 |
| 18.SB | 2 | SART3-315 |
| | 2 | ART4-75 |
| | | lck-208 |
| 19.AB | 2 | SART2-161 |
| | 2 | ART4-75 |
| | 1 | lck-488 |
| 20.BF | 3 | SART3-309 |
| | 1 | SART2-93 |

Figura 4. Specificità dei cloni T CD4⁺ e CD8⁺ ottenuti dai TIL infiltranti il tessuto neoplastico di pazienti con AG per i diversi GCAA testati.

L'effettiva clonalità dei cloni T GCAA-specifici ottenuti è stata dimostrata attraverso l'analisi citofluorimetrica del repertorio di catene V β del TCR; ogni clone è risultato positivo per un solo mAb anti-TCR-V β testato (Figura 5).

Per capire se la risposta dei cloni T CD4⁺ fosse ristretta per molecole HLA di classe I o II, il test di proliferazione ai singoli GCAA è stato condotto in presenza di APC autologhe e di mAbs bloccanti anti-HLA di classe I o anti-HLA di classe II (10 μ g/ml). Il 58% dei cloni T CD4⁺ (38/65) ha mostrato una risposta ai GCAA ristretta per HLA di classe I, mentre per il 42% dei cloni T CD4⁺ (27/65) la risposta era ristretta per molecole HLA di classe II (tabella 6). Il numero di cloni T CD4⁺ GCAA-specifici che proliferavano in una condizione MHC di classe I ristretta è molto esiguo (1 o 2 per paziente). Come atteso, tutti i cloni T CD8⁺ GCAA-specifici mostrano una risposta ristretta per HLA di classe I.

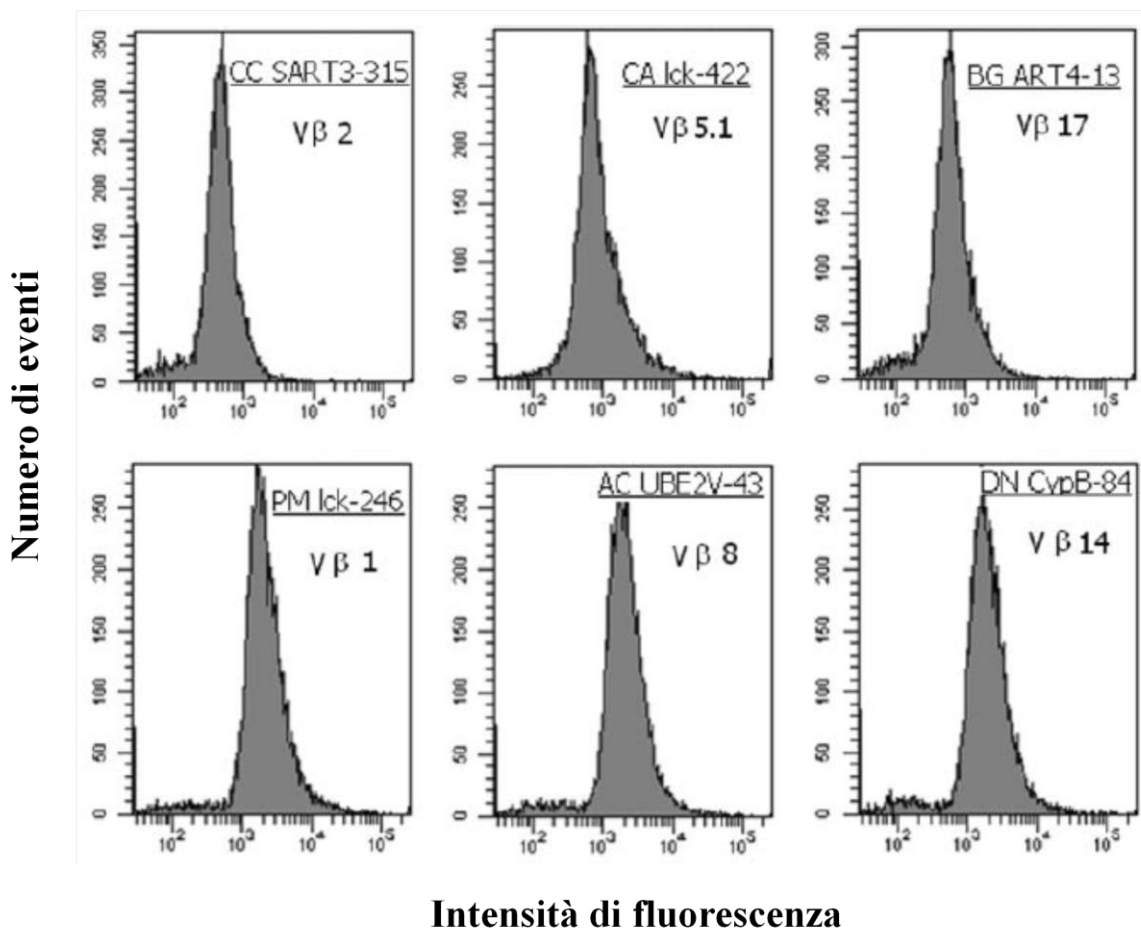


Figura 5. Conferma dell'effettiva clonalità dei cloni T GCAA-specifici (alcuni esempi) tramite TCR V β Repertoire kit.

Tabella 6. Effetto di anticorpi monoclonali anti-HLA classe I e anti-HLA classe II sulla proliferazione dei cloni T indotta dai GCAA. IM = indice mitogenico; SD = deviazione standard.

| Fenotipo del clone/ peptide specifico | Solo peptide (MI \pm SD) | Peptide + anti-HLA classe I (% di inibizione) | Peptide + anti-HLA classe II (% di inibizione) |
|--|-------------------------------|--|---|
| <i>condizioni colturali</i> | | | |
| CD4 ⁺ /SART2-93 | 51.7 \pm 5.2 | 8.2 \pm 1.2 (84) | 42.5 \pm 3.2 (18) |
| CD4 ⁺ /Ick-208 | 63.4 \pm 4.1 | 7.7 \pm 3.1 (88) | 54.3 \pm 5.4 (14) |
| CD4 ⁺ /Ick-488 | 72.6 \pm 3.4 | 56.6 \pm 7.4 (12) | 13.7 \pm 2.2 (81) |
| CD4 ⁺ /ART4-13 | 52.3 \pm 3.7 | 14.2 \pm 2.3 (73) | 41.1 \pm 9.1 (21) |
| CD4 ⁺ /HNRPL-501 | 57.2 \pm 8.5 | 49.7 \pm 5.2 (13) | 11.2 \pm 1.5 (80) |
| CD4 ⁺ /UBE2V-43 | 62.3 \pm 2.5 | 12.4 \pm 4.3 (80) | 47.7 \pm 8.7 (13) |
| CD8 ⁺ /SART2-93 | 35.3 \pm 5.3 | 4.7 \pm 1.2 (87) | 27.1 \pm 6.3 (13) |
| CD8 ⁺ /Ick-208 | 42.5 \pm 6.1 | 5.2 \pm 0.8 (88) | 37.4 \pm 7.2 (12) |
| CD8 ⁺ /Ick-486 | 26.7 \pm 4.3 | 4.5 \pm 3.2 (83) | 21.5 \pm 6.1 (19) |
| CD8 ⁺ /CypB-172 | 33.5 \pm 3.8 | 8.3 \pm 1.2 (75) | 29.5 \pm 4.8 (12) |
| CD8 ⁺ /WHSC2-103 | 56.4 \pm 5.1 | 11.6 \pm 5.2 (79) | 48.7 \pm 5.7 (14) |
| CD8 ⁺ /HNRPL-501 | 47.3 \pm 5.6 | 6.7 \pm 1.1 (76) | 38.9 \pm 3.9 (18) |

1.2 Funzioni effettrici dei cloni T GCAA-specifici.

Il profilo citochinico dei cloni T GCAA-specifici è stato valutato tramite test ELISA eseguito sui surnatanti dei cloni T stimolati con gli appropriati GCAA in presenza di APC autologhe irradiate. Tutti i cloni T CD4⁺ e T CD8⁺, si sono dimostrati in grado di produrre IFN- γ , mostrando, nella maggior parte dei casi, un profilo Th1/Tc1. In particolare, dei cloni T CD4⁺, 50 su 65 erano in grado di produrre solo IFN- γ (profilo Th1) ed i restanti 15 erano in grado di produrre sia IFN- γ sia IL-4 (profilo Th0). Riguardo ai cloni T CD8⁺, 45 dei 59 cloni considerati erano Tc1 ed i restanti 14 Tc0. Nessuno dei cloni T GCAA-specifici ha mostrato un profilo citochinico di tipo Th2 (Figura 6).

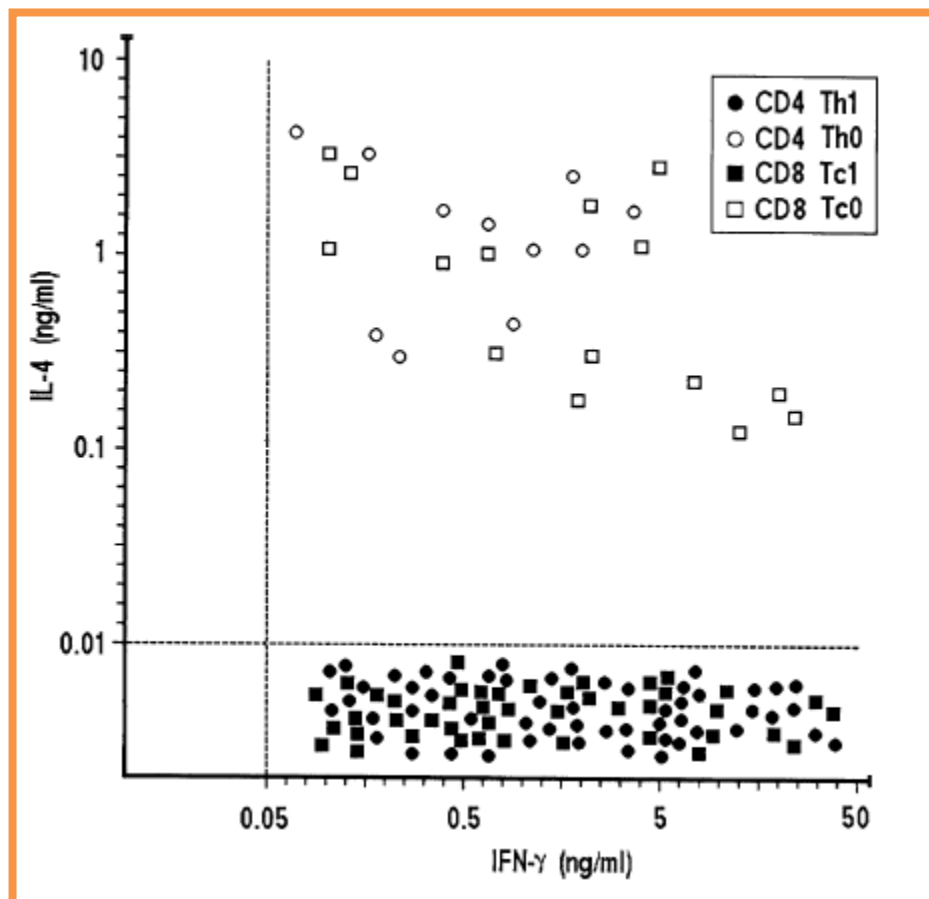


Figura 6. Concentrazione (ng/ml) di IL-4 e IFN- γ misurata nei surnatanti di coltura dei cloni T GCAA-specifici stimolati con l'appropriato peptide, tramite test ELISA. In colture di controllo senza alcuno stimolo, la concentrazione di IL-4 e IFN- γ risulta <0,05 ng/ml.

1.3 Valutazione dell'attività citotossica e pro-apoptotica dei cloni T GCAA-specifici.

Abbiamo voluto saggiare le funzioni effettrici delle cellule T GCAA-specifiche ottenute dagli infiltrati neoplastici, attraverso valutazione dell'attività citotossica perforino-mediata e della capacità di indurre apoptosi nelle cellule presentanti l'antigene. Per determinare il potenziale citolitico dei cloni T GCAA-specifici, abbiamo utilizzato come bersaglio cellule B-EBV autologhe marcate con ^{51}Cr e preincubate con l'appropriato antigene. Come mostrato in figura 7, per un rapporto effetttore/bersaglio di 10:1, il 100% dei cloni T CD8^+ ed il 94% dei cloni T CD4^+ erano in grado di lisare le cellule bersaglio. Tra i cloni T CD4^+ , in particolare, tutti i cloni Th1 ed 11 dei 15 cloni Th0 mostravano capacità citolitiche.

Per valutare la capacità dei cloni T GCAA-specifici di uccidere i loro bersagli mediante interazione Fas-Fas Ligando, abbiamo saggiato la capacità dei cloni T di indurre apoptosi in cellule Jurkat Fas⁺. Sotto stimolazione antigenica, 50 dei 65 cloni CD4^+ (77%) e 50 (85%) dei 59 cloni CD8^+ erano in grado di provocare il rilascio di ^{51}Cr da parte delle cellule bersaglio (Figura 8). Quindi, complessivamente, l'81% dei linfociti T infiltranti il tumore è in grado di indurre apoptosi nelle cellule bersaglio.

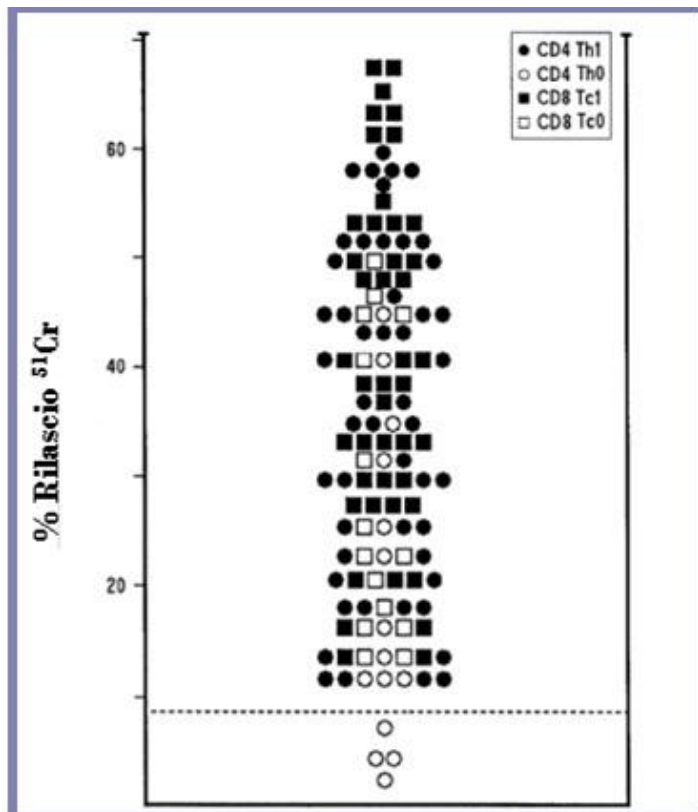


Figura 7. I peptidi GCAA inducono funzione effettrice citotossica perforino-mediata nel 94% dei cloni T GCAA-specifici derivati dai TIL gastrici.

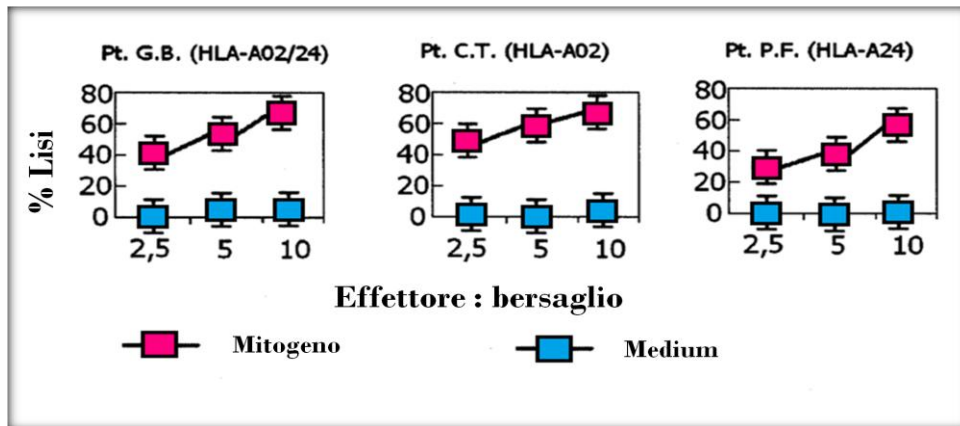


Figura 8. Attività pro-apoptotica dei cloni T GCAA-specifici stimolati con mitogeno (rosa= o solo medium (celeste). Il rilascio di ^{51}Cr dalle cellule Jurkat Fas⁺ è misurato come indice di morte cellulare. In figura i grafici di 3 cloni rappresentativi (media valori \pm SD).

1.4 Presenza di linfociti T GCAA-specifici nel sangue periferico dei pazienti con adenocarcinoma gastrico.

Le PBMC di 14 pazienti su 20 (70%) con AG hanno mostrato proliferazione in presenza di peptidi GCAA. In particolare, in 4 pazienti HLA-A02⁺/HLA-A24⁺ le PBMC proliferavano in risposta a peptidi GCAA ristretti per l'una o per l'altra molecola HLA-A, in 6 pazienti HLA-A02⁺/HLA-A24⁻ la proliferazione si verificava solo dopo stimolazione con peptidi HLA-A02-ristretti, infine, in 6 pazienti HLA-A02⁻/HLA-A24⁺ le PBMC riconoscevano soltanto peptidi GCAA ristretti per HLA-A24. Le PBMC dei 6 pazienti con AG rimanenti e quelle dei 15 controlli di malattia non hanno proliferato in risposta ad alcun peptide GCAA testato.

1.5 Prevalenza di un fenotipo Th1/Tc1 in linee T GCAA peptide-specifiche ottenute dalle PBMC di pazienti con adenocarcinoma gastrico.

Attraverso stimolazione delle PBMC di ogni paziente con i diversi GCAA, abbiamo ottenuto linee T peptide-specifiche in 16 dei 20 pazienti arruolati. Nei rimanenti 4 pazienti non è stato possibile indurre linee T peptide-specifiche; del resto in questi stessi pazienti non si era osservata nemmeno proliferazione delle PBMC in risposta ai GCAA. Dopo stimolazione con l'appropriato peptide ristretto per HLA-A, in presenza di molecole costimolatorie (anti-CD28 e anti-CD49d), l'analisi citofluorimetrica intracitoplasmatica ha

mostrato come tutte le linee T includessero una consistente proporzione di cellule T CD4⁺ e CD8⁺ peptide-specifiche in grado di produrre IFN- γ , con un fenotipo, rispettivamente, Th1 (media 11%) o Tc1 (media 15%); solo poche cellule, invece, producevano sia IFN- γ sia IL-4 (profilo Th0, Tc0) (Tabella 7).

Tabella 7.

IFN- γ e IL-4 intracitoplasmatiche di blasti T appartenenti a line cellulari GCAA-specifiche derivate dal sangue periferico di pazienti con AG.

| Pazienti | Percentuale (%) di blasti T reattivi verso i GCAA esprimenti citochine | | | |
|----------|--|---|-----------------------------------|---|
| | Th1 (IFN- γ ⁺) | Th0 (IFN- γ ⁺ , IL-4 ⁺) | Tc1 (IFN- γ ⁺) | Tc0 (IFN- γ ⁺ , IL-4 ⁺) |
| CC | 11.2 | 0.11 | 15.1 | 0.19 |
| CA | 12.1 | <0.1 | 12.8 | < 0.1 |
| FM | 6.2 | <0.1 | 10.3 | < 0.1 |
| PF | 10.0 | 0.10 | 11.9 | 0.18 |
| Can | 11.9 | <0.1 | 16.3 | 0.20 |
| DN | 10.9 | 0.20 | 13.9 | 0.10 |
| BG | 7.8 | <0.1 | 10.0 | < 0.1 |
| BA | 10.3 | <0.1 | 13.0 | < 0.1 |
| BS | 8.1 | <0.1 | 9.1 | < 0.1 |
| BGi | 8.9 | <0.1 | 10.8 | < 0.1 |
| MS | 11.9 | 0.10 | 12.7 | 0.17 |
| AC | 7.0 | <0.1 | 10.1 | < 0.1 |
| MM | 7.2 | <0.1 | 10.3 | 0.39 |
| SB | 11.8 | 0.19 | 15.0 | < 0.1 |
| AB | 15.1 | 0.18 | 16.2 | < 0.1 |
| BF | 10.1 | <0.1 | 11.4 | < 0.1 |

1.6 DISCUSSIONE

Nella prima parte del nostro progetto abbiamo caratterizzato la risposta immune T-specifica verso antigeni strettamente associati al cancro gastrico in 20 pazienti affetti da adenocarcinoma gastrico. L'impiego di una serie di 30 peptidi ottenuti a partire da antigeni noti in letteratura per essere associati a CG ci ha permesso di dimostrare la presenza, tra i linfociti infiltranti il tumore (TIL), di cellule T specifiche per GCAA ristrette per molecole di istocompatibilità HLA-A02 e/o HLA-A24. Essendo scarso il numero di TIL ricavabili dai frammenti tissutali neoplastici, abbiamo attuato una procedura, la clonazione ad alta efficienza, nota per permettere l'espansione e lo studio di ogni singola cellula T attivata *in vivo* (Moretta *et al*, 1983). L'analisi della progenie clonale ottenuta dai TIL ha mostrato la presenza di cloni T GCAA-specifici, sia di tipo T CD4⁺ (15%) sia di tipo T CD8⁺. La maggior parte di questi cloni presentava un profilo Th1/Tc1, poiché in grado di produrre IFN- γ , mentre solo una piccola parte mostrava un profilo Th0/Tc0, dato dalla produzione contemporanea di IFN- γ ed IL-4. Classicamente le cellule T CD4⁺ riconoscono antigeni presentati da molecole MHC di classe II, mentre i linfociti T CD8⁺ riconoscono antigeni caricati su molecole MHC di classe I. Esistono però eccezioni a questa regola (Nishimura *et al*, 1999; Somasundaram *et al*, 2000; Ge *et al*, 2006), ed in accordo con queste, nel nostro studio abbiamo riscontrato la presenza di un piccolo numero di cloni T CD4⁺ (uno o due per paziente) che si mostravano ristretti per molecole HLA di classe I.

La serie di cloni T peptide-specifici derivati dai TIL include cloni con differente specificità per i vari GCAA HLA-A02 o HLA-A24 ristretti testati. Sebbene il repertorio di peptidi riconosciuti dai cloni T sia ampio, poiché tutti i peptidi sono stati riconosciuti da almeno un clone T, alcuni antigeni, come SART e lck, sono stati riconosciuti da un numero molto ampio di cloni T, rivelandosi particolarmente immunogenici.

Nel 15% dei pazienti non è stato possibile isolare e clonare alcun linfocita T GCAA-specifico; è ipotizzabile che, in questi casi, la risposta immunitaria T-specifica al tumore *in vivo*, risulti assai scarsa, se non addirittura assente, a causa dei meccanismi soppressivi messi in atto dal tumore.

Con l'impiego di cellule B-EBV autologhe caricate con i GCAA e marcate con ⁵¹Cr, abbiamo dimostrato come il 100% dei cloni T CD8⁺ GCAA-specifici e il 94% dei cloni T CD4⁺ derivati dai TIL possedesse attività citotossica e fosse in grado di lisare le cellule presentanti l'antigene. Inoltre, l'81% dei cloni T GCAA-specifici riusciva anche ad uccidere le cellule bersaglio tramite induzione dell'apoptosi. Questo significa che i linfociti

T infiltranti il tumore e specifici per i GCAA possiedono attività citotossica, il che rappresenta un requisito molto importante per valutare l'efficacia di eventuali approcci immunoterapeutici.

Abbiamo, inoltre, analizzato la presenza di linfociti T GCAA specifici nel sangue periferico dei pazienti AG per capire se avessero caratteristiche simili a quelli ottenuti dalle lesioni neoplastiche. La presenza di T GCAA-specifici circolanti è stata riscontrata nel 70% dei pazienti; nel sangue periferico di 6 pazienti non è stato possibile trovare alcuna cellula T GCAA-specifica; è ipotizzabile che il loro numero fosse troppo piccolo o inferiore alla sensibilità della tecnica usata per essere rilevato, o che, in quei casi, tutte le cellule T GCAA peptide-specifiche si localizzino a livello del tessuto neoplastico, senza una consistente ricircolazione a livello periferico. In 3 di questi 6 pazienti però non era stato possibile isolare ed espandere cloni T GCAA-specifici nemmeno dal tessuto neoplastico, suggerendo come in questi pazienti la risposta T tumore-specifica possa addirittura mancare completamente.

Per definire il profilo citochinico delle cellule T GCAA-specifiche presenti nel sangue periferico dei pazienti con AG, abbiamo indotto delle linee T peptide-specifiche di cui abbiamo valutato la produzione intracitoplasmatica di citochine tramite citofluorimetria. Nella maggior parte dei pazienti (16 su 20) le linee T GCAA-specifiche contenevano un numero discretamente alto di linfociti T in grado di produrre IFN- γ , mentre i linfociti capaci di produrre IL-4 erano pochi se non addirittura assenti, in accordo con quanto accadeva per i linfociti isolati dal tessuto neoplastico. Inoltre, i peptidi in grado di evocare la produzione di citochine da parte dei linfociti T circolanti erano gli stessi che inducevano una risposta specifica a livello intratumorale. Visto che in nessuno dei tre pazienti (B.B., C.S., M.G.) apparentemente mancanti di una risposta T GCAA-specifica intratumorale, è stato possibile indurre delle linee T GCAA-specifiche *in vitro*, possiamo pensare che essi non fossero al momento in grado di montare una risposta T efficace contro il cancro gastrico. D'altra parte, uno screening pre-vaccinale proposto in alcuni studi (Sato *et al*, 2003) da fare prima della scelta dei peptidi da usare nella vaccinazione antitumorale, potrebbe fallire, non tanto per la completa mancanza di una risposta immune al cancro, ma per un numero troppo piccolo di cellule T specifiche circolanti nell'organismo.

I nostri esperimenti *in vitro* hanno dimostrato la notevole capacità citotossica dei linfociti T tumore-specifici isolati dalla lesione neoplastica, che, evidentemente, non sono però in grado di arrestare *in vivo* la progressione tumorale. Una possibile spiegazione risiede nella differenza delle condizioni con cui i linfociti T vengono attivati *in vitro*, piuttosto che *in*

vivo, dove mancano i meccanismi immunosoppressivi mediati da alcune citochine, dalle cellule Treg, dalle cellule stromali o dalle cellule tumorali. Quindi, sebbene il nostro studio abbia dimostrato la presenza di linfociti effettori T tumore-specifici, potenzialmente in grado di uccidere le cellule tumorali, supportando la fattibilità di una vaccinazione basata su specifici GCAA o sull'inoculo di linfociti T GCAA-specifici espansi *in vitro*, è chiaro come i meccanismi di *escape* tumorale potrebbero far fallire tali approcci immunoterapeutici, ed è quindi prima necessario elaborare delle strategie che ci permettano di aggirali.

2. VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNE T ENOA-SPECIFICA IN PAZIENTI CON ADENOCARCINOMA PANCREATICO

Scopo di questa parte dello studio è stato quello di caratterizzare la risposta immune T verso un nuovo antigene associato al cancro pancreatico, l' α -enolasi (ENOA). Negli ultimi anni sono stati identificati molti TAA associati al tumore del pancreas, come MUC1, Kras, la proteina "coactosin-like" (Ramanathan *et al*, 2005; Jung *et al*, 1991; Nakatsura *et al*, 2002), ma, finora, il loro uso in terapia si è dimostrato inefficace. La selezione dell'appropriato TAA è essenziale per indurre risposte immunitarie forti e complete (sia umorali sia cellulari) in grado di arrestare la progressione del cancro nei pazienti. La recente scoperta dell' α -enolasi, antigene overespresso a livello del cancro del pancreas ed in grado di innescare risposte immuni nei pazienti (Cappello *et al*, 2009), ci ha suggerito lo studio della risposta immune T ENOA-specifica in pazienti con adenocarcinoma pancreatico per capire se l'ENOA possa rappresentare un TAA idoneo all'impiego in immunoterapia.

Abbiamo, quindi, provveduto all'arruolamento di 15 pazienti con adenocarcinoma pancreatico (AP) di tipo duttale, sottoposti a resezione chirurgica del tumore primario. Per ogni paziente sono stati raccolti frammenti di mucosa pancreatica prelevati dalla regione tumorale. I campioni di tessuto sono stati messi in coltura al fine di isolare linfociti T attivati *in vivo*, successivamente clonati con la tecnica della diluizione limite. La progenie clonale è stata poi caratterizzata da un punto di vista fenotipico tramite analisi al citofluorimetro dei marker di superficie e ne è stata testata la specificità per ENOA mediante test di proliferazione. I cloni T ENOA-specifici sono stati caratterizzati altresì da un punto di vista funzionale mediante analisi del profilo citochinico e delle caratteristiche effettrici.

2.1 Caratterizzazione dei linfociti T infiltranti il tumore (TIL) pancreatico.

Per valutare la risposta immune intratumorale nei pazienti con AP, abbiamo espanso e clonato i TIL attivati *in vivo*, isolati a partire da campioni di mucosa pancreatica prelevata da 3 diverse zone del pezzo asportato: dalla regione centrale del tumore (CT), dalla regione marginale del tumore (MT) e dalla circostante mucosa sana (MS).

Siamo riusciti ad espandere cloni linfocitari T a partire dai TIL isolati dal tessuto neoplastico di ogni paziente (Tabella 8) per un numero complessivo di 505 cloni.

Tabella 8. Cloni linfocitari T ottenuti dai TIL infiltranti il tumore in 15 pazienti con adenocarcinoma duttale pancreatico.

| Paziente | Età | Sesso | TNM | Cloni linfocitari T ottenuti |
|-------------------------|-----------|--------------|---|------------------------------|
| PP | 50 | M | pT3, N1, Mx | 84 |
| MR | 73 | M | pT4, N1, Mx | 26 |
| PR | 56 | M | pT3, N0, Mx | 6 |
| PT | 36 | M | pT2, N1, M1 | 16 |
| NN | 74 | F | pT3, N1, Mx | 91 |
| ME | 61 | F | pT2, N1, Mx | 20 |
| DA | 63 | M | pT3, N1, Mx | 37 |
| RA | 74 | F | pT3, N0, Mx | 74 |
| MM | 54 | F | pT3, N0, Mx | 5 |
| PL | 92 | M | pT3, N1, Mx | 3 |
| CM | 57 | M | pT2, N1, M1 | 22 |
| RA | 51 | F | pT4, N1, Mx | 13 |
| BB | 72 | F | pT3, N1, Mx | 22 |
| BR | 80 | F | pT2, N1, M1 | 58 |
| RP | 58 | M | pT3, N0, Mx | 28 |
| Tutti i pazienti | 63 | 8M/7F | Adenocarcinoma duttale pancreatico | 505 |

Raggruppando insieme tutti i pazienti, il numero di cloni T ottenuto dai campioni prelevati in siti diversi è risultato alquanto simile, ma è possibile osservare un leggero incremento per quanto riguarda quello ottenuto dai campioni prelevati in CT: 149 da MS, 135 da MT e 221 da CT.

Dall'analisi citofluorimetrica è emerso che l'87% (441/505) dei cloni T era CD4⁺, indicante un fenotipo T *helper*, mentre il 13% (64/505) era CD8⁺, con fenotipo citotossico Tc (Figura 9). È interessante notare come il numero di cloni T CD8⁺ ottenuti mostri un incremento percentuale passando dalla regione MS (8%) alla regione CT (15%). In base alla produzione di citochine, la maggior parte dei cloni T CD4⁺ (166/441, 38%) mostrava un profilo Th1 con una distribuzione percentuale simile nei differenti siti: 38% (MS), 40% (MT) e 36% (CT). Una quota considerevole (20%) di cloni T CD4⁺ era in grado di produrre IL-4, da sola (Th2, 8%) o in combinazione con IFN- γ (Th0, 12%). Da notare come la percentuale dei cloni T secernenti IL-4 tenda ad aumentare nel tessuto neoplastico (CT + MT) (25%) rispetto alla mucosa sana (15%) (Figura 10 A, B). Il 23% dei cloni T CD4⁺ era capace di produrre IL-17, e la distribuzione dei Th17 mostrava una distribuzione differente nelle varie regioni: la più alta percentuale di cloni Th17 si riscontrava a livello della MS (31%), contro una percentuale pari al 20% in CT e MT (Figura 7 A, B). Il 78% dei cloni Th17 producevano anche IFN- γ ; in particolare: 70% (MS), 80% (MT) and 84% (CT).

Per quanto riguarda i cloni T CD8⁺, abbiamo osservato come il 48% (31/64) dei cloni T CD8⁺ fossero in grado di produrre IFN- γ (Tc1) e la percentuale dei cloni Tc1 era in aumento dalla MS (40%) alla CT (55%); diversamente la percentuale di cloni Tc17 (14%) era maggiore in MS (15%) rispetto a CT (9%), seppur di poco. Abbiamo, inoltre, isolato un'alta percentuale di Tc17 (27%, 3/11) da MT (Figura 10 C, D). Anche in questo caso il 33% dei cloni Tc17 era in grado di produrre contemporaneamente IFN- γ . Soltanto il 5% dei cloni CD8⁺ secerneva IL-4 (Tc0 + Tc2).

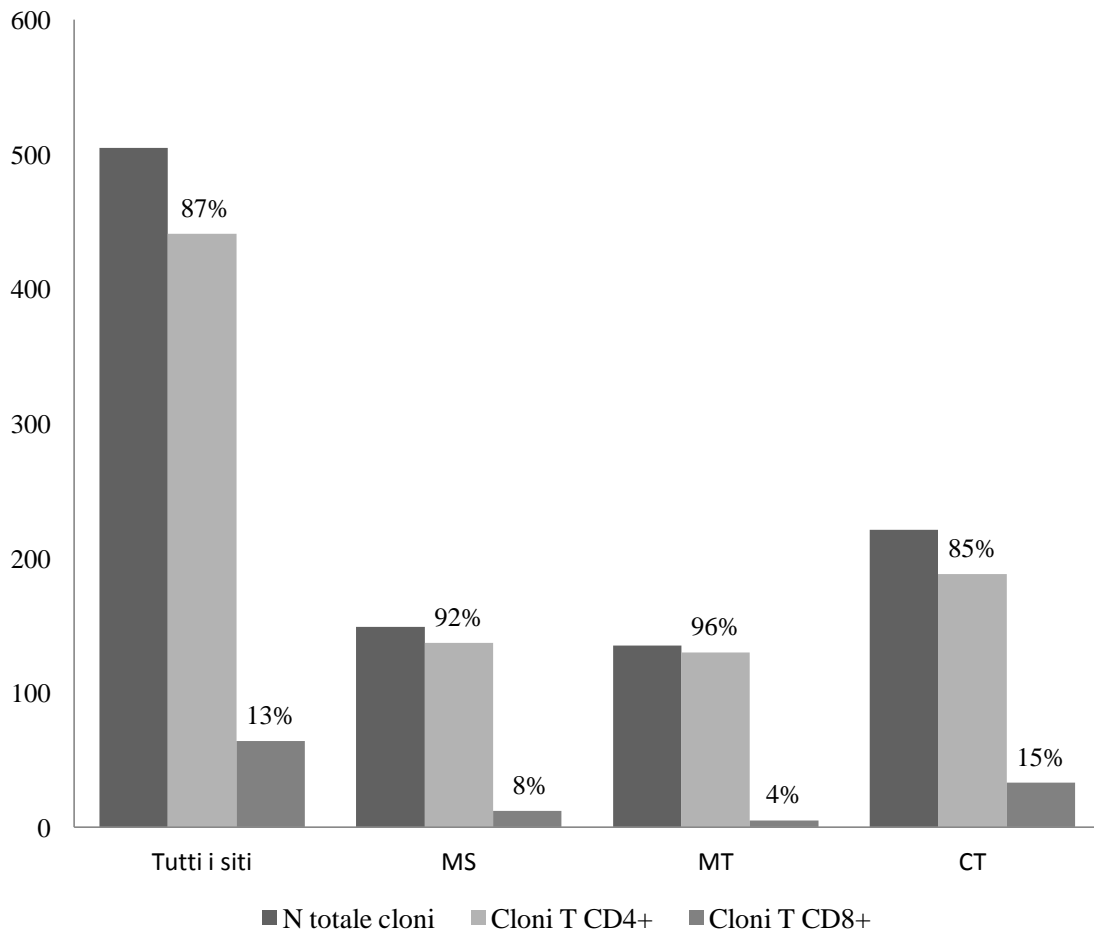


Figura 9. Gli istogrammi rappresentano il numero totale di cloni T isolati dalle diverse regioni tumorali e il rapporto fra le popolazioni T CD4⁺ e CD8⁺.

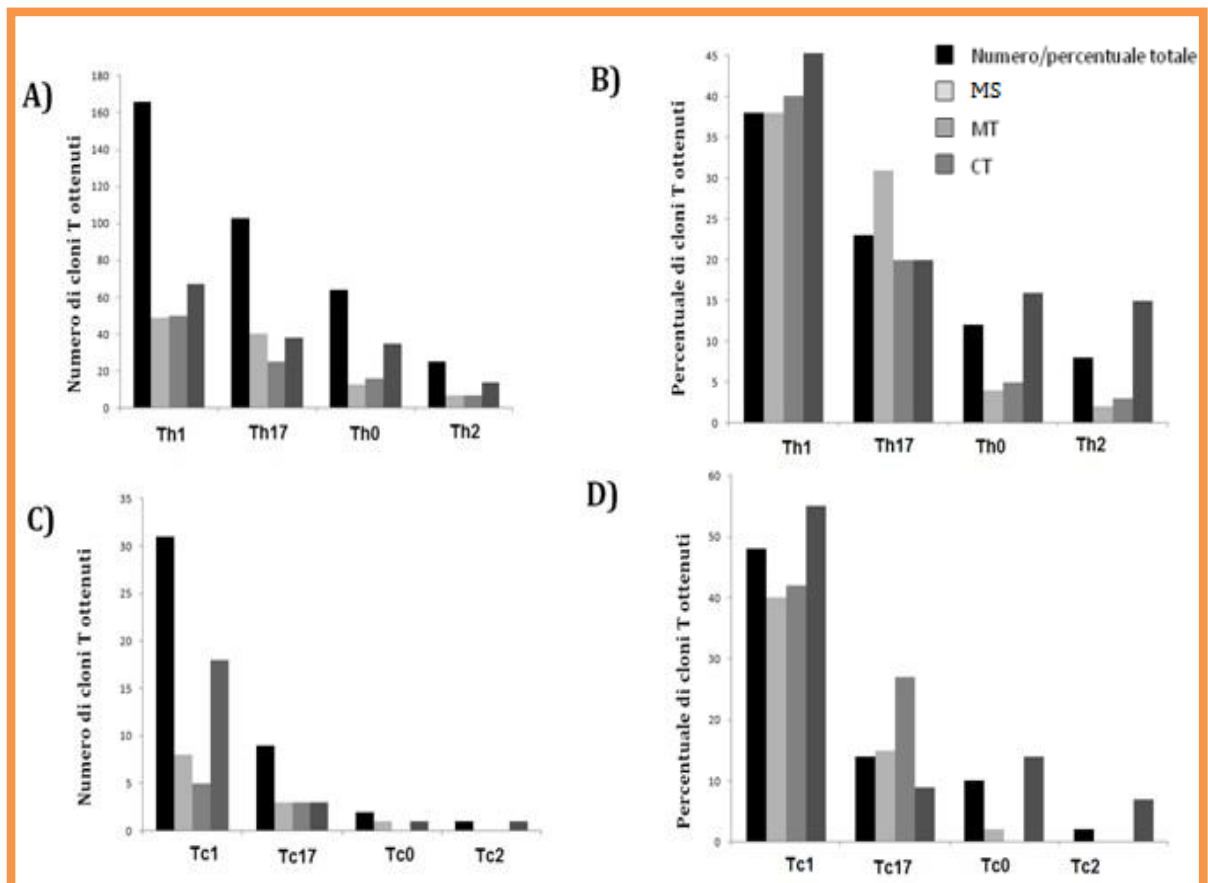


Figura 10. Repertorio e produzione citochinica dei cloni T derivati dai TIL ottenuti da pazienti con adenocarcinoma pancreatico. La produzione di IFN- γ , IL-4 e IL-17 è stata misurata tramite test ELISA. **A e B)** Numero assoluto e distribuzione percentuale delle diverse popolazioni linfocitarie T CD4⁺ (Th1, Th0, Th2, Th17) nelle varie regioni del tumore (MS, MT, CT). **C e D)** Numero assoluto e distribuzione percentuale delle diverse popolazioni linfocitarie T CD8⁺ (Tc1, Tc0, Tc2, Tc17) nelle varie regioni del tumore (MS, MT, CT).

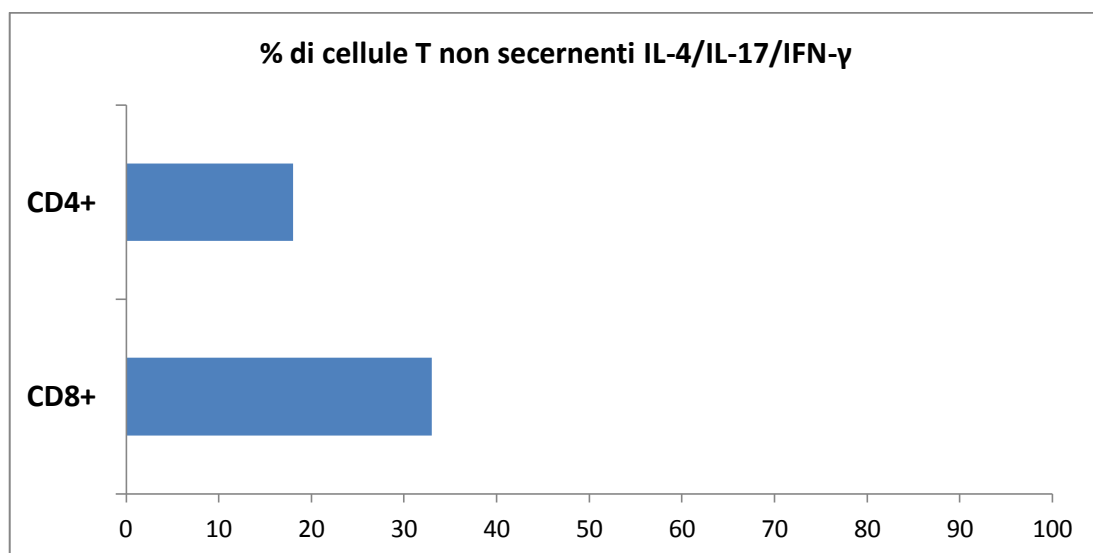
2.2 Presenza di cellule Treg intratumorali nei pazienti con AP.

Nell'analizzare la produzione citochinica dei cloni T ottenuti dall'infiltrato pancreatico, abbiamo riscontrato un'alta percentuale di cloni CD4⁺ (18%) e CD8⁺ (33%) che non erano in grado di produrre IFN- γ , IL-17, e IL-4 (Figura 11).

Per chiarire la natura di questi cloni T abbiamo analizzato l'espressione di FoxP3 e la produzione di TGF- β tramite citofluorimetria e la produzione di IL-10 mediante test ELISA. Il 16% (20/129) dei cloni T CD4⁺ isolati dalla MS non produceva IL-10 e TGF- β ed erano FoxP3⁻, mentre il 6% era FoxP3⁺ e produceva IL-10. Abbiamo perciò definito i primi Tnull ed i secondi Treg. Per quanto riguarda le altre regioni, abbiamo ottenuto: 16% di Tnull e 4% di Treg da MT, 5% di Tnull e 16% di Treg da CT. Riassumendo, abbiamo isolato cloni Tnull e Treg da tutte e tre le regioni, ma è da notare come la percentuale dei Treg fosse statisticamente superiore in CT (16%) piuttosto che in MS (6%). ($p = 0.02$) (Figura 12). Per quello che riguarda i cloni T CD8⁺, la percentuale di cellule Tnull si è dimostrata minore in CT (12%) rispetto a MS (30%) e MT (27%). Al contrario la percentuale di Treg in CT (19%) era doppia rispetto a MS (10%) (Figura 12).

Figura 11.

Percentuale di cloni T CD4⁺ e CD8⁺ ottenuti a partire dai TIL di pazienti con CP non produttori IFN- γ , IL-17, IL-4.



2.3 Presenza di linfociti T ENOA-specifici in pazienti con AP.

Tutti i cloni T ottenuti dai pazienti con AP sono stati testati per la loro capacità di proliferare in presenza dell'antigene ENOA. Dei complessivi 505 cloni T testati, 90 (18%) proliferavano in risposta a ENOA: 14/149 (9%) provenienti da MS, 20/135 (15%) da MT e 56/221 (25%) da CT (Tabella 9, Figura 13A).

L'effettiva clonalità dei cloni T ENOA-specifici è stata dimostrata attraverso l'analisi citofluorimetrica del repertorio di catene V β del TCR; ogni clone risultava positivo per un solo mAb anti-TCR-V β testato (Figura 13B).

Dei 90 cloni T ENOA-specifici, 3 erano CD8⁺; uno, secernente IL-17, IFN- γ e IL-4 proveniente dalla MS, mentre gli altri due (Tc0 e Tc null) da CT.

La maggior parte dei rimanenti cloni T ENOA-specifici CD4⁺, mostrava un profilo Th1 (52%), con una distribuzione percentuale simile nelle tre aree: 54% (MS), 60% (MT) e 49% (CT) (Figura 14).

Il 13% dei cloni T ENOA-specifici CD4⁺ produceva IL-17 (Th17) e il 73% secerneva anche IFN- γ ; la percentuale di cloni Th17 ENOA-specifica è risultata circa il doppio in MS (23%) rispetto a CT (13%). Il 9% dei cloni T ENOA-specifici CD4⁺ secerneva IFN- γ e IL-4 (Th0); l'88% di tutti i Th0 sono stati isolati da CT. Il 5% dei cloni T CD4⁺ ENOA-specifici era Tnull e il 14% Treg, con una percentuale in aumento da MS (8%) a CT (17%). Il restante 6% dei cloni T ENOA-specifici CD4⁺ produceva IL-4 (Th2); tali cloni T sono stati isolati solamente da MT e CT (Figura 14).

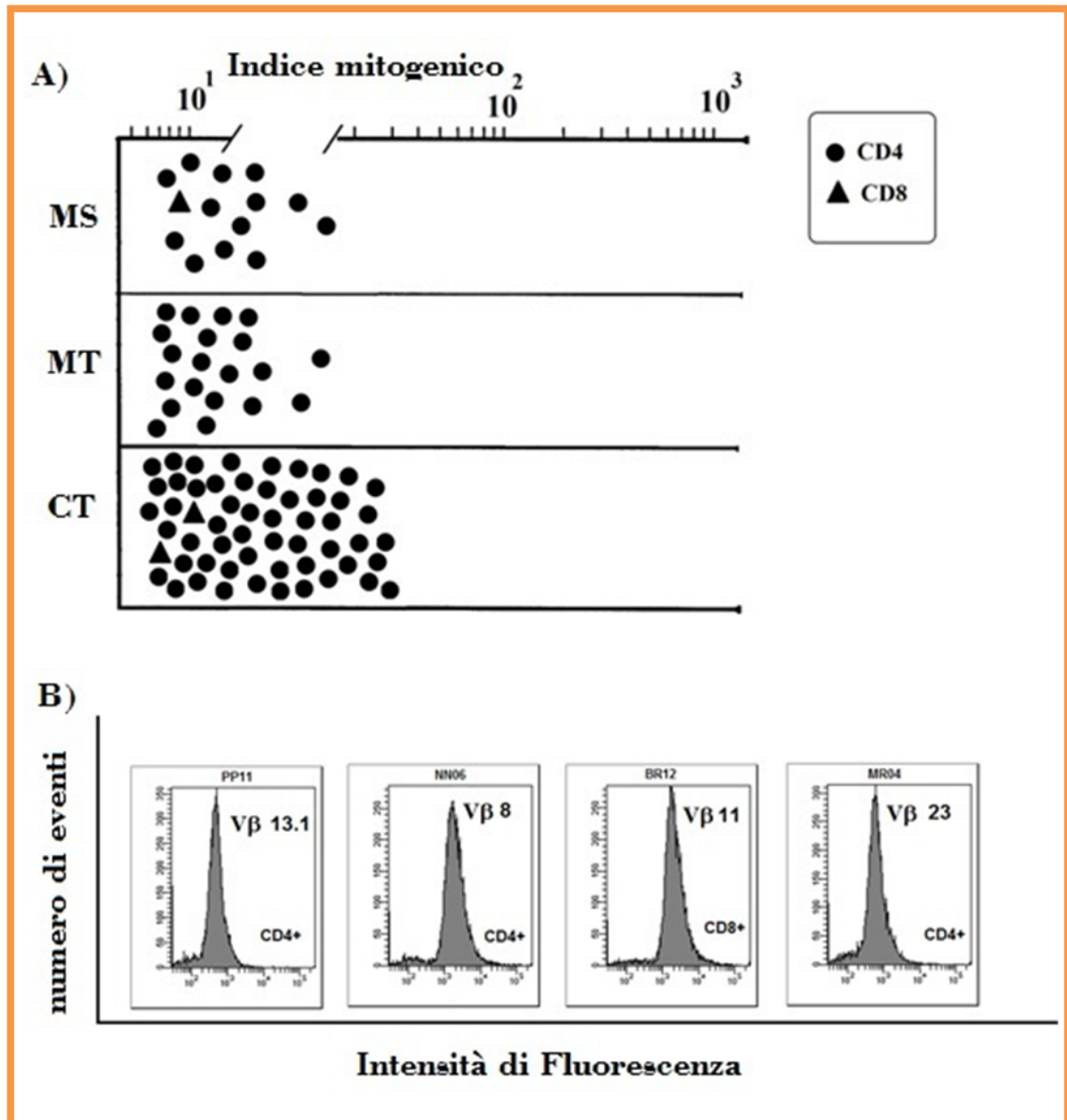


Figura 13. Clonalità e specificità verso ENOA dei cloni T derivati dai TIL di pazienti con AP. A) i cloni T sono stati testati per la capacità di proliferare in risposta a ENOA, in presenza di APC autologhe irradiate. I risultati sono espressi come valore medio di Indice Mitogenico ottenuto da un triplicato di colture condotte nelle stesse condizioni sperimentali. B) Repertorio delle catene Vβ del TCR dei cloni T GCAA-specifici. Ogni clone T (in figura sono riportati 4 esempi) risultava positivo per un solo mAbs dei 24 testati (TCR repertoire kit).

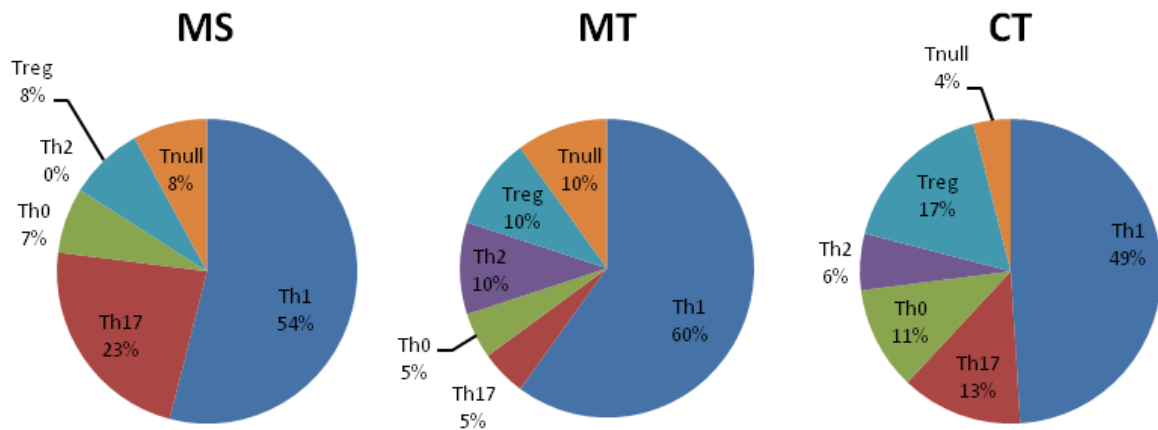


Figura 14. Distribuzione delle popolazioni di linfociti T CD4⁺ ENOA-specifici nei tre diversi siti del tumore pancreatico.

2.4 Valutazione dell'attività citotossica dei cloni T ENOA-specifici.

Stando alla letteratura, la maggior parte dei cloni T attivati dall'antigene producenti IFN- γ esprimono citotossicità perforino-mediata contro le cellule autologhe presentanti l'antigene; abbiamo, quindi, voluto saggiare il potenziale citotossico dei cloni T ENOA-specifici, utilizzando come bersaglio cellule B-EBV marcate con ⁵¹Cr e pre-incubate con ENOA. Con un rapporto effettore-bersaglio di 10:1, tutti i 45 cloni Th1 e 4 degli 8 cloni Th0 lisavano la cellula bersaglio (Figura 15A). Per quanto concerne i linfociti Th17, solo quelli in grado di produrre sia IL-17 che IFN- γ (73%) erano in grado di uccidere la cellula bersaglio. Nessuno dei Th2, dei Tnull o dei Treg era capace di lisare le cellule B-EBV. Similmente, 2 dei 3 cloni T ENOA-specifici CD8⁺ distruggevano le cellule bersaglio, mentre il clone CD8⁺ Tnull non ne era capace.

Abbiamo, inoltre, comparato la capacità citotossica dei cloni T ottenuti da MS con quelli ottenuti da CT, riscontrando che il rilascio specifico di ⁵¹Cr era molto più elevato da parte dei cloni Th17 e Th1 isolati da MS piuttosto che da quelli isolati da CT. (Figura 15B).

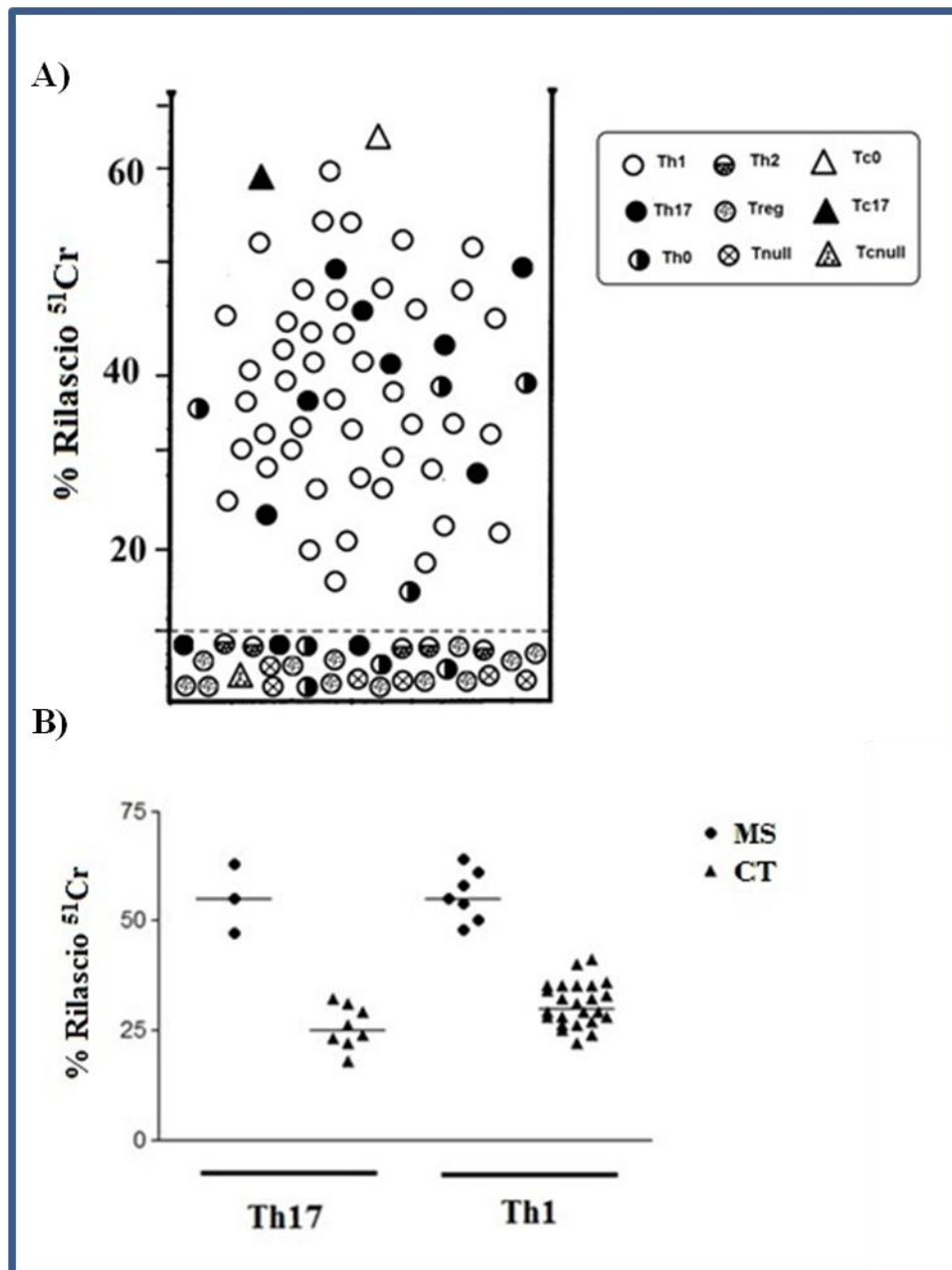


Figura 15. Attività citotossica dei cloni T ENOA-specifici. **A)** citotossicità indotta dai ENOA sui cloni T ENOA-specifici CD4^+ e CD8^+ . Per determinare la citotossicità perforino-mediata, i cloni T sono stati coltivati con cellule B-EBV autologhe marcate con ^{51}Cr e caricate con ENOA per 8 ore. I risultati rappresentano il valore medio di tre colture, della percentuale di rilascio di ^{51}Cr , per un rapporto effettore/bersaglio di 10:1. La linea tratteggiata rappresenta 3 SD oltre il valore medio del rilascio di ^{51}Cr ottenuto con colture di cellule B-EBV non caricate con l'antigene. **B)** Comparazione dell'attività citotossica dei cloni T ottenuti da MS e da CT; abbiamo confrontato lo specifico rilascio di ^{51}Cr da parte di Th17 e Th1 isolati dalla mucosa sana e dalla regione centrale del tumore.

Dal momento che le cellule T effettrici attivate possono uccidere i loro bersagli anche mediante apoptosi, tramite l'interazione Fas-Fas Ligando, è stata valutata anche la capacità dei cloni T ENOA-specifici di provocare il rilascio del ^{51}Cr dalle cellule Fas⁺ Panc1 tramite induzione di apoptosi. Sotto stimolazione antigenica, 45 degli 87 cloni CD4⁺ (51%) e 1 (Tc0) dei 3 cloni CD8⁺ erano in grado di indurre apoptosi nelle cellule bersaglio (Figura 14). Tra i 45 cloni T CD4⁺ capaci di indurre apoptosi nelle cellule Panc1, 37 erano Th1, 6 Th17, 2 Th0, ma nessuno era Th2, Treg o Tnull (Figura 16).

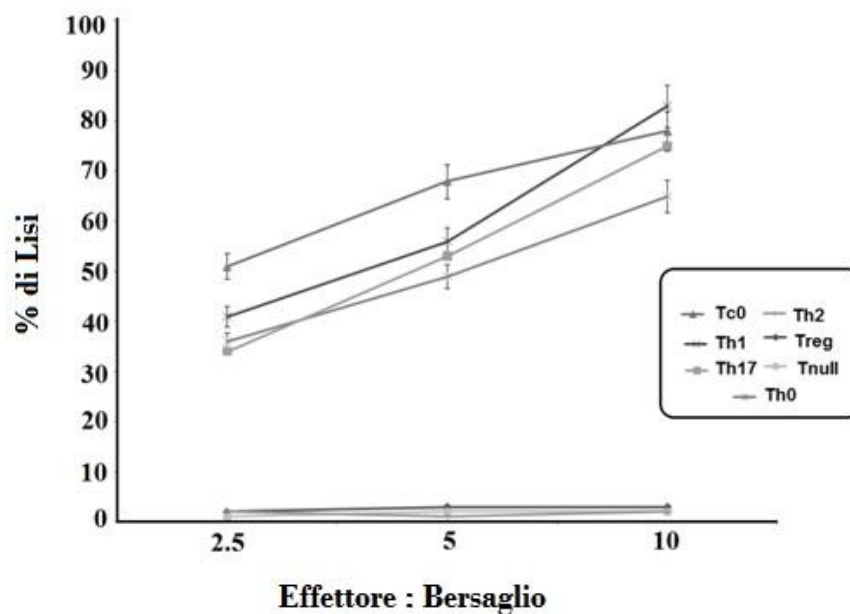


Figura 16. Attività pro-apoptotica dei cloni T ENOA-specifici. Il rilascio di ^{51}Cr dalle cellule Panc1 Fas⁺ è misurata come indice di morte cellulare.

2.5 Presenza di linfociti T ENOA-specifici e di anticorpi anti-ENOA nel sangue periferico dei pazienti con AP.

Il 93% dei pazienti (14/15) mostravano valori rilevabili di anticorpi IgG anti-ENOA nel siero (Tabella 9). È interessante notare come titoli più elevati di anti-ENOA IgG correlino con una percentuale maggiore di cloni T ENOA-specifici ottenuti dal tessuto neoplastico dei pazienti (coefficiente di Spearman = 0,3).

Le PBMC di 10 pazienti su 15 (67%) con CP hanno mostrato proliferazione in presenza di ENOA (Tabella 9). Eseguendo il test di proliferazione sulle PBMC di 15 controlli sani si è riscontrata una risposta a ENOA soltanto in 3 soggetti (20%).

Tabella 9. Per ognuno dei pazienti con AP sono riportati: i cloni T ENOA-specifici ottenuti; la proliferazione delle PBMC del sangue periferico in presenza di ENOA (S = sì, N = no); la presenza di anticorpi anti-ENOA nel siero. Per accertare la presenza di anticorpi anti-ENOA-IgG abbiamo preso come valore soglia il valore OD + 3SD ottenuto dal siero di 45 soggetti sani della stessa età media dei pazienti (0,13). I valori compresi tra 0,13 e 0,622 (valore massimo ottenuto dal siero di un paziente CP) sono stati suddivisi in tre, per assegnare il valore (+) per OD compresi tra 0,13 e 0,294, (++) per OD compreso tra 0,294 e 0,458 e (+++) per OD compreso tra 0,458 e 0,622.

| Paziente | Cloni linfocitari T ottenuti | Cloni T ENOA-specifici (%) | Proliferazione delle PBMC in presenza di ENOA | Anti-ENOA IgG |
|-------------------------|------------------------------|----------------------------|---|--------------------|
| PP | 84 | 17 (20) | S | ++ |
| MR | 26 | 8 (31) | S | ++ |
| PR | 6 | 1 (17) | N | + |
| PT | 16 | 5 (31) | N | + |
| NN | 91 | 13 (14) | S | + |
| ME | 20 | 0 (0) | N | + |
| DA | 37 | 2 (5) | S | ++ |
| RA | 74 | 4 (14) | S | + |
| MM | 5 | 3 (60) | S | +++ |
| PL | 3 | 1 (33) | N | - |
| CM | 22 | 6 (27) | S | ++ |
| RA | 13 | 3 (23) | S | ++ |
| BB | 22 | 4 (18) | N | + |
| BR | 58 | 14 (24) | S | ++ |
| RP | 28 | 9 (32) | S | +++ |
| Tutti i pazienti | 505 | 90 (18) | 10/15 (67%) | 14/15 (93%) |

2.6 Cellule Treg ENOA-specifiche inibiscono le funzioni delle cellule T effettrici.

Abbiamo visto come il 14% dei cloni T ENOA-specifici mostrasse un fenotipo T regolatorio. Per ogni clone Treg abbiamo voluto saggiarne la capacità di inibire la proliferazione di cloni T ENOA-specifici effettori in presenza di cellule presentanti l'antigene (DC) autologhe.

Il 75% (9/12) dei cloni Treg ENOA-specifici erano in grado di inibire la proliferazione di cloni T effettori ENOA-specifici. Nel dettaglio, il 42% dei cloni Treg ENOA-specifici esercitava un'azione soppressiva superiore al 50% mentre un 25% di essi mostrava un'attività soppressiva tra il 20 e il 50%. Sotto stimolazione con il tossoide tetanico (TT), usato come antigene di controllo, nessuno dei cloni Treg ENOA-specifici era capace di inibire la proliferazione dei cloni T effettori (Figura 17).

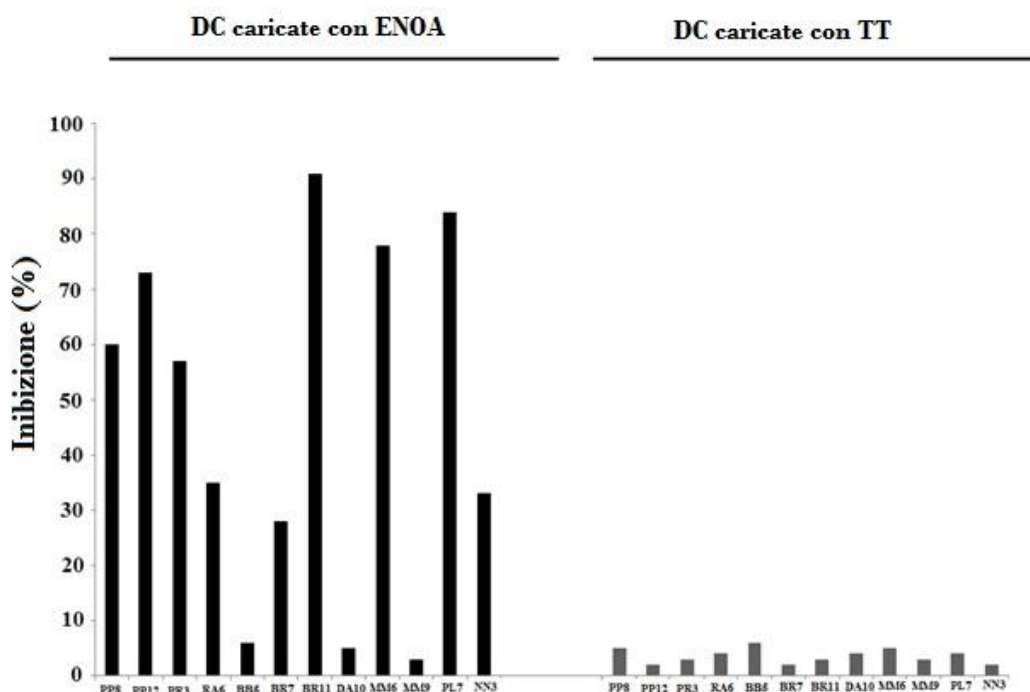


Figura 17. I cloni Treg ENOA-specifici inibiscono la proliferazione delle cellule T ENOA-specifiche effettrici. Il test di soppressione è stato realizzato utilizzando cellule dendritiche (DC) caricate con ENOA e cellule DC caricate con tossoide tetanico (TT) come controllo.

2.7 DISCUSSIONE

In questa parte dello studio abbiamo analizzato la risposta intratumorale T specifica per l'antigene ENOA, un antigene associato al cancro pancreatico di recente scoperta ed in grado di suscitare risposte immuni nei pazienti con tale neoplasia (Cappello *et al*, 2009).

A partire da 15 pazienti affetti da AP, abbiamo isolato e caratterizzato le cellule T infiltranti (TIL) tre diversi siti del tumore: la regione centrale del tumore (CT), la regione marginale del tumore (MT) e la circostante mucosa sana (MS).

L'analisi della progenie clonale dei TIL ha mostrato una predominanza di cloni T CD4⁺ rispetto ai T CD8⁺; in maniera interessante, il numero dei cloni T CD8⁺ raddoppiava nella regione centrale del tumore rispetto alla mucosa sana.

Dall'analisi del profilo citochinico dei cloni T derivati dai TIL si è osservato come la maggior parte dei cloni CD4⁺ e CD8⁺ fosse capace di produrre IFN- γ , soprattutto quelli isolati dalla regione centrale del tumore. Era presente però, anche una parte consistente di cloni (20%) in grado di produrre IL-4 da sola o insieme all'IFN- γ . Dati recenti della letteratura hanno dimostrato come sia le cellule neoplastiche sia le cellule associate al cancro pancreatico, come fibroblasti e cellule dendritiche, presenti nel microambiente tumorale, possano determinare una polarizzazione in senso Th2 della risposta immune in pazienti con CP. In pratica, secondo alcuni studi, a livello del CP esisterebbero complessi meccanismi di interazione fra le cellule tumorali e le cellule del microambiente circostante che influenzerebbero le risposte immuni in senso anti-tumorale, riducendo le probabilità di sopravvivenza del paziente CP (De Monte *et al*, 2011). In accordo con quanto osservato da De Monte e colleghi, abbiamo riscontrato come la percentuale di cellule T produttrici IL-4 sia superiore (25%) nel tessuto neoplastico rispetto alla circostante mucosa sana (15%).

Inoltre, abbiamo osservato un'elevata percentuale di cloni T CD4⁺ e CD8⁺ secernenti IL-17 nella MS; per contro, un elevato numero di Treg e Tcreg si osservava nella regione centrale del tumore, dato che, oltre a confermare la presenza di un forte microambiente immunosoppressivo nel cancro pancreatico (Warshaw *et al*, 1992; von Bernstorff *et al*, 2001), sembra responsabile della paralisi funzionale delle cellule Th1/Th17 effettrici reclutate a livello della mucosa sana circostante.

Il ruolo delle cellule Th17 nel cancro risulta ancora controverso: un aumento dei linfociti Th17 è stato osservato in alcuni tumori umani, come il cancro ovarico, il tumore al seno, il cancro al colon ed il melanoma (Miyahara *et al*, 2008; Su *et al*, 2010). Al contrario, livelli bassi di cellule Th17 infiltranti il tumore sono stati riscontrati nel cancro ovarico avanzato,

dove si correlano con una prognosi migliore dei pazienti (Kryczek *et al*, 2009). Un numero scarso di Th17 è stato documentato anche in pazienti con tumore della mammella HER2-positivo (Horlock *et al*, 2009), così come in tumori ematopoietici, dove le cellule B neoplastiche sembrano essere in grado di attivare le Treg e di inibire le cellule Th17 (Benchetrit *et al*, 2002, Kryczek *et al*, 2009). Nel presente studio abbiamo osservato un numero piuttosto elevato di cellule Th17 effettrici nella mucosa circostante il tumore, con un'attività citotossica superiore nelle cellule Th1/Th17 isolate da MS rispetto a quelle isolate da CT; questo ci fa pensare che vi sia un reclutamento di cellule Th17 con funzione protettiva a livello della zona circostante il tumore, la cui funzione viene però inibita a livello del microambiente tumorale.

Come dicevamo, il ruolo delle cellule Th17 nelle risposte immuni al tumore è ancora dibattuto, con studi che sostengono il ruolo tumorigenico di queste cellule (Wu *et al*, 2009; Wang *et al*, 2009), ad esempio per le proprietà angiogenetiche della IL-17 (Numasaki *et al*, 2003; Takahashi *et al*, 2005; Lee *et al*, 2008), a lavori a sostegno del fatto che le Th17 possano arrestare la progressione tumorale. Le attività antitumorali delle Th17 potrebbero risiedere in meccanismi cellulari T dipendenti (Benchetrit *et al*, 2002), ma anche nel reclutamento di cellule dendritiche in sede tumorale capaci di attivare i linfociti T citotossici tumore-specifici (Alvarez *et al*, 2009). Le Th17, inoltre, potrebbero contribuire all'immunità protettiva verso il tumore inducendo la produzione di chemochine di tipo Th1 e stimolando la produzione di CXCL9 e CXCL10 per reclutare cellule effettrici nel microambiente tumorale. In accordo con la teoria a sostegno dell'effetto protettivo delle Th17, i nostri dati hanno dimostrato come la maggior parte dei cloni Th17 isolati dal tessuto tumorale pancreatico fossero in grado di produrre IFN- γ e soprattutto, possedessero un'attività citotossica.

In maniera interessante, è stato riscontrato un aumento dei livelli di Th17 sia durante il trattamento con trastuzumab di pazienti affetti da tumore al seno (Martin-Orozco *et al*, 2009) sia durante il trattamento con tremelimumab nel melanoma metastatico (von Eeuw *et al*, 2009). Alvarez e colleghi hanno dimostrato, in un modello murino di linfoma, come la fusione di cellule dendritiche con cellule tumorali (FC) trasdotte con adenovirus codificante per il CD40L (Adv-CD40L) stimoli risposte Th17 aumentando l'effetto antitumorale di vaccini FC (Alvarez *et al*, 2009). Insieme, questi dati suggeriscono l'importante coinvolgimento delle cellule Th17 nelle risposte immuni al cancro.

Il sangue periferico dei pazienti con AP mostrava sia la presenza di linfociti T ENOA-specifici sia la presenza di anticorpi IgG anti-ENOA nel siero (Suso *et al*, 2011).

In questo lavoro abbiamo per la prima volta evidenziato la presenza di cellule T ENOA-specifiche anche a livello tumorale in pazienti con AP, che risultavano più del 20% fra i cloni derivati dai TIL. Dei 90 cloni T ENOA-specifici esaminati, solo tre erano CD8⁺, e, dei restanti cloni CD4⁺, la maggior parte mostrava un profilo Th1 con attività citotossica. La popolazione Th17 è particolarmente interessante, essendo che la maggior parte delle cellule secernenti IL-17, produceva contemporaneamente anche IFN- γ , e che il loro numero è doppio nella MS rispetto a CT. In opposizione, la maggior parte dei cloni ENOA-specifici Th0 e tutti i Th2 si riscontravano nella sede centrale del tumore.

Inoltre, abbiamo mostrato come, mentre tutti i cloni Th1 erano in grado di uccidere le cellule bersaglio, solo la metà dei cloni Th0 e nessuno dei cloni Th2 era in grado di farlo. All'interno della popolazione Th17, solo i cloni che producevano anche IFN- γ erano in grado di eliminare le cellule bersaglio. Di particolare interesse è il fatto che la specifica attività citolitica dei cloni Th1 e Th17 isolati da MS sia significativamente superiore a quella dei linfociti T ENOA-specifici isolati da CT. Questi dati confermano come il microambiente tumorale influenzi negativamente l'attività citolitica dei linfociti T reattivi contro le cellule tumorali (Warshaw *et al* 1992; von Bernstorff *et al*, 2001).

È da sottolineare che circa il 20% dei cloni T CD4⁺ ENOA-specifici era Tnull o Treg e che la loro percentuale aumentava significativamente dalla MS (8%) alla CT (17%), e nessuno di essi era in grado di uccidere le cellule bersaglio.

In altre parole, mentre il numero di cellule effettrici Th17 diminuiva passando dalla mucosa sana alla zona tumorale, il numero di cellule Th2 e Th0, incapaci di contrastare le cellule tumorali, parallelamente al numero di Treg, che inibiscono le funzioni delle cellule T effettrici, aumentavano in CT. La maggior parte delle cellule Treg si sono, inoltre, dimostrate capaci di inibire la risposta proliferativa all'antigene delle cellule T ENOA-specifiche effettrici *in vitro*. Abbiamo, infine, osservato che i pazienti con un rapporto di cellule Treg/Teffettrici ENOA-specifiche basso tendono a sopravvivere più a lungo (più di 10 mesi), rispetto a quelli con un rapporto Treg/Teffettrici più alto (meno di 10 mesi).

In conclusione, per la prima volta, abbiamo dimostrato che in pazienti con tumore del pancreas, i livelli di cellule Treg ENOA-specifiche aumentano a livello intratumorale e che queste cellule sono in grado di ridurre la funzionalità delle cellule effettrici Th17 e Th1 (Amedei *et al*, 2013).

I nostri dati ci permettono di ipotizzare che certi approcci terapeutici, quali la vaccinazione con ENOA, in combinazione con strategie volte a contrastare gli effetti delle Treg e a migliorare le funzioni effettrici delle Th1/Th17 (Kyte *et al*, 2009; von Euw *et al*, 2009) nel

microambiente tumorale, potrebbero rappresentare una nuova ed efficace via per il trattamento di pazienti affetti da cancro pancreatico.

3. VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNE T PDIA3-SPECIFICA IN PAZIENTI CON CARCINOMA COLORETTALE

Il carcinoma del colon-retto (CCR) è fra le forme tumorali più diffuse e nonostante ci siano stati notevoli progressi nella comprensione della patologia molecolare, nella diagnosi e nel trattamento, i tassi di guarigione rimangono bassi. I regimi terapeutici tradizionali sono, inoltre, limitati in termini di tolleranza, efficacia e cross-resistenza. Nuove terapie prive di tossicità e cross-resistenza sono necessarie per migliorare la sopravvivenza dei pazienti. Vaccini tumorali improntati all'attivazione di effettori immunitari (cellule T e anticorpi), per prevenire ricadute o per trattare tumori allo stadio avanzato, hanno già dimostrato benefici nel cancro della prostata e nel linfoma (Vidal *et al*, 2011). Osservando come la presenza di infiltrato immunitario nel tumore del colon si associ ad una prognosi migliore (Galon *et al*, 2006; Pagès *et al*, 2005), recentemente, gli studi si sono concentrati sulla ricerca di vaccini in grado di attivare la risposta immunitaria contro il tumore (Boghossian *et al*, 2011). Per far questo l'identificazione di antigeni strettamente tumore associati risulta di fondamentale importanza e le recenti osservazioni sulle proprietà immunogeniche della proteina PDIA3 ci hanno portato a voler caratterizzare meglio la risposta T PDIA3-specifica in pazienti con CCR.

A tale scopo abbiamo reclutato 10 pazienti affetti da CCR sottoposti a resezione chirurgica del tumore primario (Tabella3); per ogni paziente sono stati raccolti frammenti di mucosa colica prelevati dalla regione centrale del tumore (CT) e dalla circostante mucosa sana (MS). I campioni di tessuto sono stati messi in coltura al fine di isolare linfociti T attivati *in vivo*, successivamente clonati con la tecnica della diluizione limite. La progenie clonale è stata poi caratterizzata da un punto di vista fenotipico tramite analisi al citofluorimetro dei marcatori di superficie e ne è stata testata la specificità per PDIA3 mediante test di proliferazione. I cloni T PDIA3-specifici sono stati caratterizzati altresì da un punto di vista funzionale mediante analisi del profilo citochinico e delle caratteristiche effettrici.

3.1 Caratterizzazione dei linfociti T infiltranti il tumore coloretale.

Per valutare la risposta immune intratumorale nei pazienti con adenocarcinoma coloretale, abbiamo espanso e clonato i TIL attivati *in vivo*, isolati a partire da campioni di tessuto tumorale (CT) e dalla circostante mucosa sana (MS).

Siamo riusciti ad espandere cloni T da ogni paziente per un numero complessivo di 159 cloni (Tabella 10). Il numero dei cloni T ottenuto dai TIL infiltranti il CT (132/159) è risultato molto più alto di quello dei cloni T ottenuti dai linfociti infiltranti la MS (27/159). Dall'analisi citofluorimetrica è emerso che il 90% (143/159) dei cloni T ottenuti risultavano CD4⁺, mentre solo il 10% (16/159) erano CD8⁺. Tutti i cloni CD8⁺ provenivano da CT (Figura 18).

Tabella 10. Caratteristiche dei pazienti arruolati nello studio e cloni T ottenuti dai TIL infiltranti il tessuto neoplastico.

| Pazienti | Sesso | Età | TNM | Cloni T ottenuti | Cloni T PDIA3-specifici (%) |
|-------------------------|--------------|-----------|----------------------------------|------------------|-----------------------------|
| S.M.S | F | 71 | pT3, N1, Mx | 21 | 4 (19) |
| M.V. | M | 83 | pT4, N1, Mx | 11 | 1 (9) |
| C.G. | M | 75 | pT3, N0, Mx | 17 | 5 (29) |
| T.B.G. | M | 73 | pT2, N1, M1 | 15 | 5 (33) |
| C.G. | M | 64 | pT3, N1, Mx | 20 | 4 (20) |
| I.M.P. | F | 75 | pT2, N1, Mx | 10 | 0 (0) |
| C.R. | M | 52 | pT3, N1, Mx | 21 | 5 (24) |
| N.V. | M | 72 | pT3, N0, Mx | 17 | 3 (18) |
| M.I. | F | 63 | pT3, N0, Mx | 15 | 6 (40) |
| B.P. | F | 68 | pT3, N1, Mx | 12 | 0 (0) |
| Tutti i pazienti | 6M/4F | 70 | Adenocarcinoma coloretale | 159 | 33 (21) |

In base alla produzione di citochine, la maggior parte dei cloni T CD4⁺ mostrava un profilo Th1 (61/143, 43%) con una distribuzione piuttosto simile in CT (41%) e in MS (48%). Una

quota considerevole di cloni T (34%, 48/143) mostrava un profilo Th17. I cloni secernenti IL-17 rappresentavano il 26% dei cloni isolati da MS ed il 31% dei cloni isolati da CT. Il 65% (31/48) dei cloni in grado di produrre IL-17 era in grado di secernere contemporaneamente IFN- γ , con un profilo che definiamo Th17/Th1. Soltanto tra i cloni CD4⁺ ottenuti da CT abbiamo osservato la presenza di cloni in grado di produrre IL-4 da sola (Th2; 2/132) o in combinazione con IFN- γ (Th0; 6/132) (Figura 19).

Per quanto riguarda i cloni CD8⁺, 5 dei 16 cloni isolati da CT (31%) produceva IFN- γ (Tc1).

I rimanenti 11 cloni CD8⁺ (69%), così come 26 dei cloni CD4⁺, non era in grado di produrre nessuna tra le citochine IL-4, IL-17 ed IFN- γ .

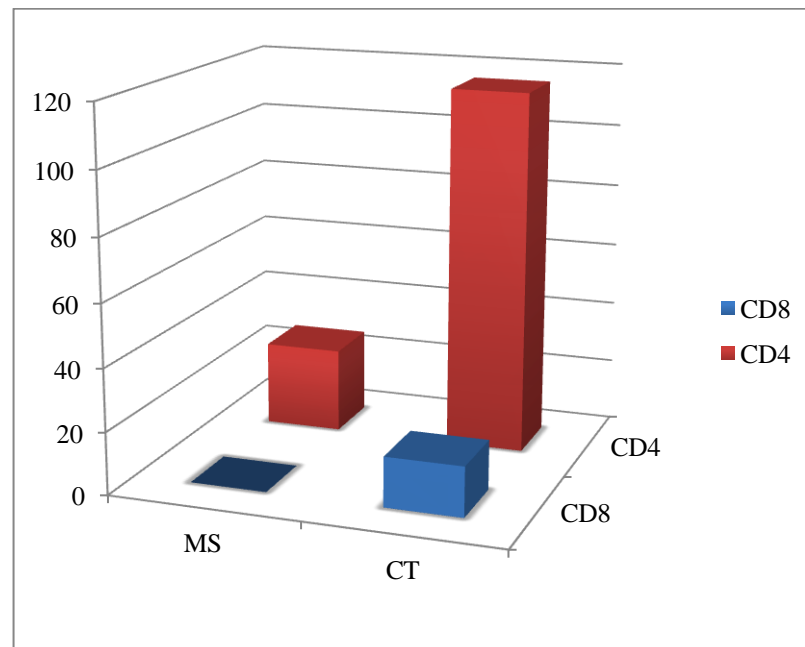


Figura 18. Rappresentazione grafica del numero di cloni T CD4⁺ e CD8⁺ ottenuti dal tessuto tumorale e dalla mucosa sana di 15 pazienti affetti da CCR.

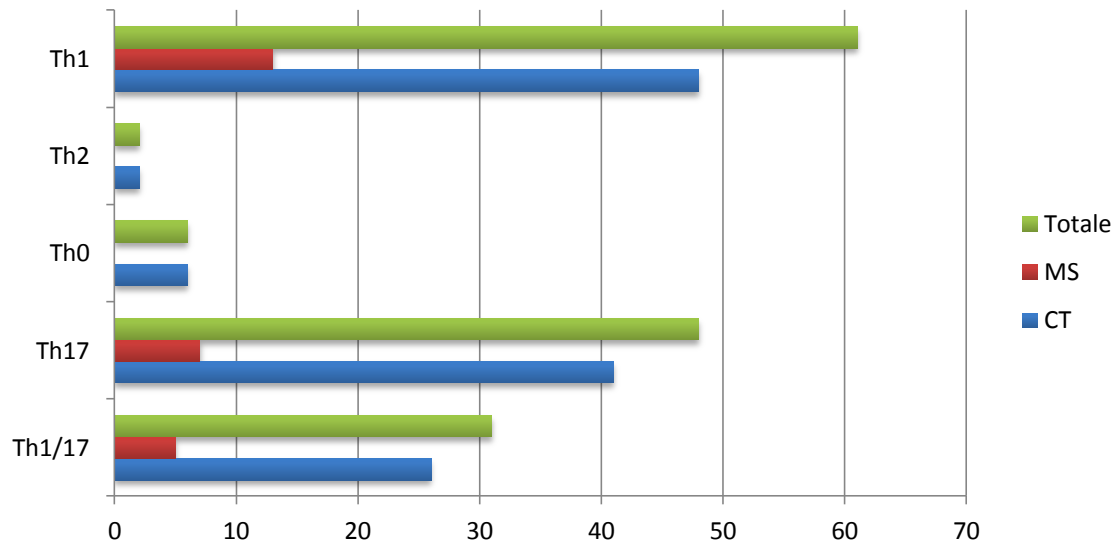


Figura 19. Numero di cloni secernenti IL-4, IL-17 e/o IFN- γ isolati dal tumore e dalla mucosa sana di pazienti con CCR.

3.2 Presenza di cellule Treg intratumorali nei pazienti con CCR.

Nell'analizzare la produzione citochinica dei cloni T ottenuti dai TIL, abbiamo riscontrato un'alta percentuale di cloni CD4⁺ (18%, 26/143) e CD8⁺ (69%, 11/16) che non erano in grado di produrre IFN- γ , IL-17, e IL-4. Analizzando l'espressione di FoxP3, la produzione di TGF- β (citofluorimetria) e la produzione di IL-10 (ELISA), abbiamo visto che dei T CD4⁺, 22/143 (15%) erano FoxP3⁺ e producevano IL-10 e TGF- β , quindi Treg secondo nostra definizione, mentre 4/143 (3%) erano FoxP3⁻ e non producevano IL-10/ TGF- β , perciò Tnull. Cellule Treg sono state isolate da entrambi i siti CT e MS, ma la percentuale di Treg è significativamente più alta in MS (26%) piuttosto che in CT (11%). Cellule Tnull sono state isolate solo da CT. Per quanto riguarda i cloni T CD8⁺, 10 su 11 (91%) mostravano un fenotipo funzionale di tipo Tcreg, ed 1 su 11 (9%) di tipo Tcnull; la percentuale di Tcreg complessivamente isolate da CT era quindi del 63%, quella di Tcnull del 6% (Figura 20).

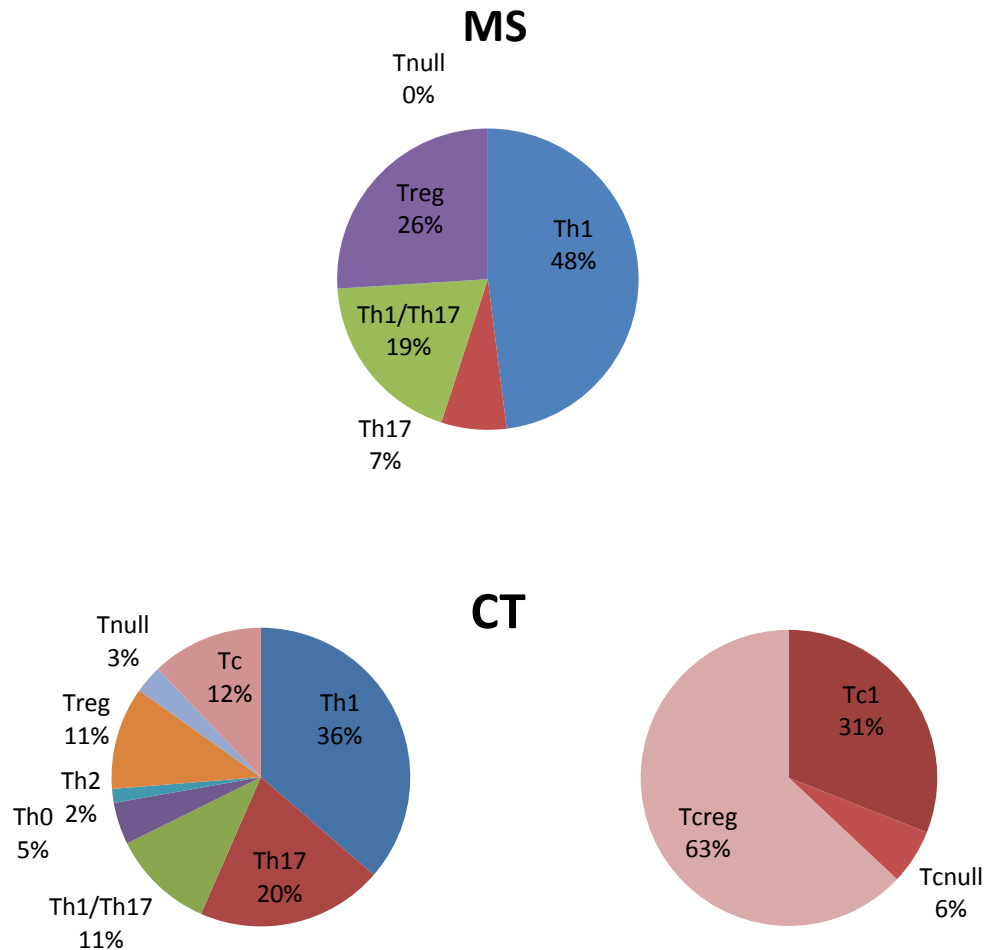


Figura 20. Grafici rappresentativi delle diverse popolazioni di cloni T CD4⁺ e CD8⁺ isolate dalla mucosa sana e dal tumore di 10 pazienti affetti da CCR.

3.3 Presenza di cloni T PDIA3-specifici in pazienti con CCR.

Tutti i cloni T ottenuti dai pazienti con CCR sono stati testati per la loro capacità di proliferare in presenza della proteina PDIA3. Dei 159 cloni T analizzati, 33 (21%) proliferavano in presenza della PDIA3 (Tabella 10), in particolare 10 provenienti dalla MS e 23 provenienti da CT. Tutti i cloni T PDIA3-specifici erano CD4⁺, la maggior parte dei quali mostrava fenotipo Th1 (23/33, 70%), con una percentuale maggiore in MS (9/10, 90%) rispetto a CT (14/23, 61%). Complessivamente, 7 cloni T PDIA3 specifici erano in grado di produrre IL-17 (21%), da sola (3 cloni isolati da CT) o in combinazione ad IFN- γ

(cloni Th1/Th17, 1 isolato da MS e 3 da CT). Dei rimanenti 3 cloni T PDIA3-specifici CD4⁺ isolati da CT, uno (3%) era in grado di produrre IL-4 (Th2) e due (6%) esibivano un fenotipo Treg (Figura 21). In conclusione, dei cloni T PDIA3-specifici isolati dai TIL di pazienti con CCR, il 79% era in grado di produrre IFN- γ , mostrando quindi un profilo di tipo effettore, teoricamente in grado di eliminare le cellule cancerose.

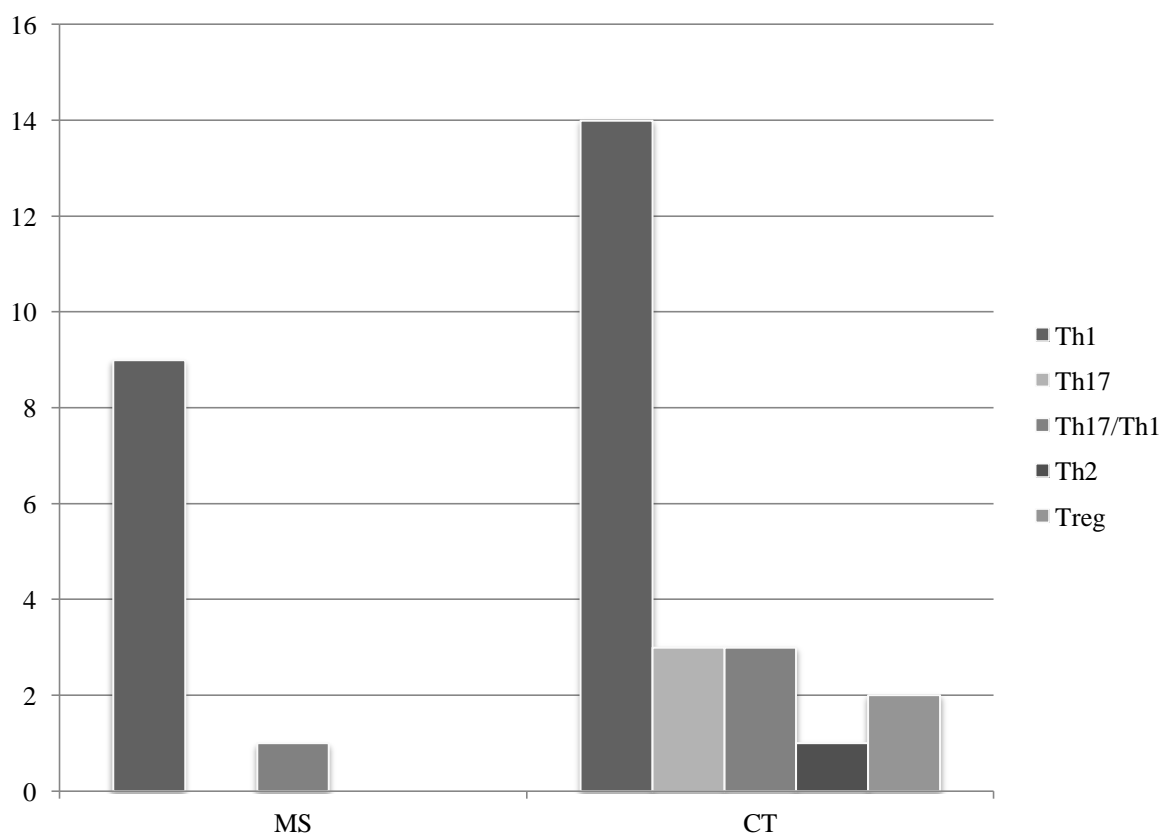


Figura 21. Numero e tipo funzionale di cloni T PDIA3-specifici CD4⁺ isolati dalla mucosa sana e dal tessuto tumorale di pazienti CCR.

3.4 Valutazione dell'attività citotossica dei cloni T PDIA3-specifici.

Per valutare le capacità effettrici dei cloni T PDIA3-specifici ottenuti, abbiamo saggiato la loro capacità citotossica, perforino-mediata, utilizzando come bersaglio cellule B-EBV marcate con ^{51}Cr e pre-incubate con PDIA3. Con un rapporto effettore-bersaglio di 10:1, tutti i 23 cloni Th1 erano in grado di lisare le cellule bersaglio. Tra la popolazione di cloni Th17, solo quelli in grado di produrre anche IFN- γ (4/7, 57%) lisavano le cellule presentanti l'antigene. Nessuno dei cloni Th2 e Treg era in grado di provocare il rilascio di ^{51}Cr nel surnatante di coltura (Figura 22).

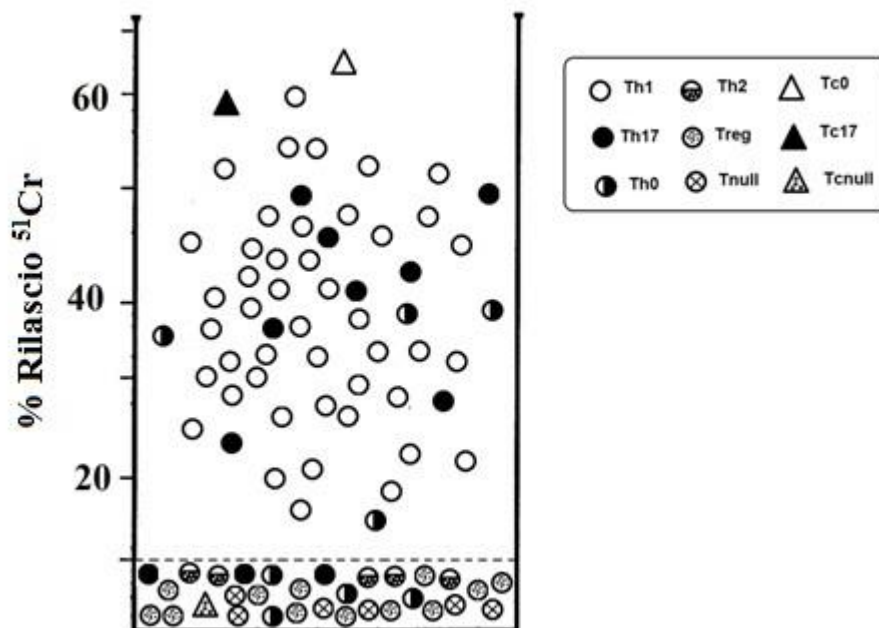


Figura 22. Attività citotossica dei cloni T PDIA3-specifici. Per determinare la citotossicità perforino-mediata, i cloni T sono stati coltivati con cellule B-EBV autologhe marcate con ^{51}Cr e caricate con PDIA3 per 8 ore. I risultati rappresentano il valore medio di tre colture, della percentuale di rilascio di ^{51}Cr , per un rapporto effettore/bersaglio di 10:1. La linea tratteggiata rappresenta 3 SD oltre il valore medio del rilascio di ^{51}Cr ottenuto con colture di cellule B-EBV non caricate con l'antigene.

Dal momento che le cellule T effettrici attivate possono uccidere i loro bersagli anche mediante apoptosi, tramite l'interazione Fas-Fas Ligando, è stata valutata anche la capacità dei cloni T PDIA3-specifici di provocare il rilascio del ^{51}Cr dalle cellule della linea umana SW620 Fas⁺ tramite induzione di apoptosi. Sotto stimolazione antigenica, 24 dei 33 cloni PDIA3-specifici (73%) erano in grado di indurre apoptosi nelle cellule bersaglio. Il ruolo dell'interazione Fas-Fas Ligando nel rilascio di ^{51}Cr è stata dimostrata dalla sua inibizione mediante l'impiego di anticorpi bloccanti anti-Fas (dati non mostrati).

3.5 DISCUSSIONE

In questa parte dello studio abbiamo voluto valutare il ruolo della proteina PDIA3 come possibile antigene associato al CCR. La proteina PDIA3, nota anche come GRP58, Erp57 e Erp60, è una glicoproteina solubile di 58 KDa, membro della famiglia delle disolfuro isomerasi (PDI), localizzata soprattutto nel lume del reticolo endoplasmatico ma espressa anche nel nucleo, nel citoplasma e sulla membrana cellulare. Tra le varie funzioni che svolge, essa è in grado di cotraslocare sulla superficie delle cellule tumorali in associazione alla calreticulina (CRT), permettendone l'apoptosi indotta dalle antracicline. L'esposizione della PDIA3 sulla superficie delle cellule tumorali potrebbe quindi innescare una risposta immune diretta contro di esse (Obeid *et al*, 2007; Obeid, 2008).

L'interesse sul ruolo immunogenico della PDIA3 nasce dall'osservazione che pazienti affetti da CCR mostrano una risposta anticorpale alla PDIA3 che sembra correlarsi positivamente con la sopravvivenza globale dei pazienti, oltre alla capacità di attivare una risposta T specifica. Tali studi, non ancora pubblicati, sono stati condotti nei laboratori diretti dal Prof. Novelli (Università degli Studi di Torino) con cui siamo da tempo in collaborazione.

Sulla base di queste osservazioni abbiamo deciso di isolare e caratterizzare l'infiltrato linfocitario T presente nel tessuto neoplastico (CT) e nella circostante mucosa sana (MS) di pazienti con CCR e di andare a ricercare la presenza di linfociti T PDIA3-specifici per caratterizzarne le funzioni effettrici.

Il numero di cloni linfocitari T ottenuti dai TIL infiltranti il CT (132/159, 83%) è risultato assai superiore rispetto a quello ricavato da MS (27/159, 17%), indicando un infiltrato di cellule T in aumento in sede tumorale piuttosto che nella mucosa sana circostante. La maggior parte dei cloni T ottenuti possedeva un fenotipo CD4⁺ (143/159, 90%), mentre

solo il 10% risultava CD8⁺. In maniera interessante, i linfociti CTL CD8⁺ sono stati isolati tutti da CT, dove risulta evidentemente necessaria la loro presenza per eliminare le cellule neoplastiche.

Analizzando il profilo citochinico dei cloni, sia nella MS che nella CT, si osserva una maggioranza di cloni con fenotipo Th1: 48% in MS e 36% in TT. Abbiamo trovato una buona percentuale di cloni T in grado di produrre IL-17, che sono rispettivamente il 26% in MS ed il 31% in CT; di questi però un'ampia percentuale, complessivamente del 65% (MS + CT) è comunque in grado di produrre anche IFN- γ .

Soltanto da CT, abbiamo isolato cloni T in grado di produrre IL-4, da sola (Th2, 2%), o in combinazione con IFN- γ (Th0, 5%).

Per quanto riguarda i cloni T CD8⁺, il 31% dei cloni isolati da CT mostrava un fenotipo Tc1, essendo in grado di produrre IFN- γ .

Complessivamente, abbiamo riscontrato come la maggior parte dei cloni T isolati sia da MS (67%) sia da CT (83%), fossero in grado di secernere la citochina IFN- γ , nota per le sue capacità citotossiche e per il suo ruolo protettivo nell'immunità ai tumori, con una percentuale in aumento nel tessuto tumorale rispetto alla mucosa sana.

Una consistente parte di cloni, isolati sia da MS che da TT, ha mostrato un profilo di tipo regolatorio (Treg). Il 15% di tutti i cloni CD4⁺ ottenuti risultava, infatti, FoxP3⁺ ed era capace di produrre IL-10 e TGF- β , con una percentuale superiore in MS (26%) rispetto a CT (11%). In CT si osserva, inoltre, un'elevata percentuale di cloni T CD8⁺ con fenotipo regolatorio (63%), ad indicare come i linfociti CTL presenti in sede tumorale possano contribuire al mantenimento di un microambiente di tipo immunosoppressivo.

Circa il 6% dei cloni T CD8⁺ ed il 3% dei cloni T CD4⁺ non si sono rivelati in grado di produrre nessuna delle citochine da noi analizzate e per questo li abbiamo definiti Tnull/Tnull, rispettivamente.

Abbiamo poi indagato la presenza di cellule T specifiche per la PDIA3 nell'infiltrato linfocitario di pazienti con CCR. Complessivamente, tra i cloni T ottenuti da tutti i pazienti, il 21% dei cloni T proliferavano in risposta alla PDIA3, ed ognuno di questi era CD4⁺. La percentuale dei cloni T PDIA3-specifici isolati dalla MS (37%) risultava più del doppio rispetto a quella dei cloni specifici riscontrati in CT (17%).

Tutti i cloni T PDIA3-specifici isolati da MS si sono dimostrati in grado di produrre IFN- γ , il 90% con fenotipo puramente Th1, ed il 10% con fenotipo Th1/Th17.

A livello della CT il 61% dei cloni T PDIA3 specifici presentava un fenotipo Th1, il 26% era in grado di produrre IL-17, da sola (Th17, 13%) od in combinazione con IFN- γ (Th1/Th17, 13%), il 9% mostrava fenotipo Treg ed il 4% produceva IL-4 (Th2).

In conclusione, dei cloni T PDIA3-specifici isolati dai TIL di pazienti con CCR, il 79% era in grado di produrre IFN- γ ; testandone l'attività citotossica, tutti questi i cloni si sono rivelati in grado di uccidere le cellule bersaglio sia tramite citolisi perforino-mediata che tramite induzione dell'apoptosi mediata da Fas.

Dai dati ottenuti in questo studio è possibile concludere che, mentre il numero di cellule effettrici Th1 e Th17 diminuisce passando da MS a CT, il numero di cellule Th2 e Th0, incapaci di contrastare le cellule tumorali, parallelamente al numero di Treg, aumentano in CT, indicando la presenza di un microambiente tumorale in grado di modulare e spegnere le risposte immunitarie anti-tumorali. Infine, abbiamo riscontrato che la presenza di cellule T PDIA3-specifiche infiltranti il tumore CCR non è rilevabile in tutti i pazienti; infatti, da 2 pazienti su 10 (20%) non è stato isolato nessun clone T PDIA3 specifico. La spiegazione di questo può risiedere nel fatto che in questi pazienti la risposta T specifica per questo antigene è troppo debole o addirittura assente per produrre un numero di linfociti T riscontrabili con le tecniche che abbiamo a disposizione.

I nostri dati ci permettono di affermare che la PDIA3 rappresenta un nuovo antigene CCR-associato in grado di innescare risposte immuni T-specifiche, in alcuni seppur non in tutti, i pazienti affetti da CCR. La vaccinazione con PDIA3, o il trasferimento adottivo di cellule T PDIA3-specifiche espanse *in vitro*, potrebbero rappresentare una nuova e valida via di trattamento per i pazienti con CCR visto che, come abbiamo dimostrato, la stragrande maggioranza dei cloni linfocitari T PDIA3-specifici mostra un chiaro profilo effettrici con spiccate proprietà citotossiche mentre sono quasi assenti i linfociti T PDIA3-specifici con profilo regolatorio.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

A dispetto dei progressi nella diagnosi clinica, nelle tecniche chirurgiche e nello sviluppo di regimi terapeutici radio/chemioterapici, la prognosi dei tumori dell'apparato digerente rimane infausta ed è quindi necessario sviluppare nuove e più efficaci opzioni terapeutiche. Tra queste, spicca l'immunoterapia specifica, un approccio terapeutico volto a potenziare le capacità del sistema immunitario di eliminare le cellule tumorali in maniera selettiva. Studi riguardanti approcci immunoterapeutici basati sull'impiego di cellule T hanno dato risultati alquanto brillanti nei modelli animali mentre nell'uomo, gli studi clinici, applicabili solo in casi avanzati di tumori metastatici, hanno mostrato un'efficacia variabile da paziente a paziente (Amedei *et al*, 2011a). Infatti, affinché l'immunoterapia possa diventare realmente efficace nel trattamento dei tumori gastrointestinali è necessario risolvere ancora diversi problemi, come l'identificazione di marcatori delle cellule tumorali che siano specifici ed immunogenici e l'elaborazione di strategie in grado di mitigare l'effetto immunosoppressivo del tumore.

È oggi noto che le neoplasie clinicamente evidenti ed in progressiva crescita, hanno sviluppato le opportune strategie per eludere le naturali difese immunitarie dell'ospite, esprimendo poche molecole di superficie in grado di innescare reazioni di rigetto e reclutando cellule dell'immunità che sopprimono le risposte immuni effettrici. Per questo motivo, prima di potenziare il sistema immunitario di pazienti neoplastici, è necessario studiare le caratteristiche delle cellule immunitarie infiltranti il tumore, comprenderne il ruolo (se protettivo o se, invece, pro-tumorale) e determinare quali antigeni tumore associati siano in grado di innescare un'efficace risposta antitumorale. Questo è stato lo scopo del nostro lavoro di ricerca, partendo dall'analisi della risposta T specifica verso peptidi derivanti da antigeni tumorali noti in letteratura per essere associati al cancro gastrico, per poi addentrarci nello studio della risposta T verso antigeni di recentissima scoperta in associazione ai tumori del pancreas e del colon-retto.

Lo studio condotto durante il primo anno di ricerca ci ha permesso di stabilire come alcuni peptidi derivati da antigeni associati a cancro gastrico (GCAA) fossero effettivamente immunogenici ed in grado di innescare *in vitro* una risposta T effettrice, permettendoci di supportare la fattibilità di una vaccinazione basata su specifici GCAA o sull'inoculo di linfociti T GCAA-specifici espansi *in vitro*. È comunque evidente che i meccanismi di

escape tumorale presenti *in vivo* potrebbero far fallire tali approcci immunoterapeutici ed è quindi necessario elaborare ulteriori strategie che ci permettano di aggirarli.

Nel secondo anno abbiamo studiato la risposta immune T specifica per l' α -enolasi (ENOA) in pazienti con adenocarcinoma pancreatico, per capire se tale proteina, scoperta di recente per essere iper-espressa a livello delle cellule tumorali pancreatiche, fosse in grado di innescare una risposta T tumore-specifica. I nostri risultati hanno confermato tale ipotesi, ma lo studio delle caratteristiche funzionali dei linfociti T ENOA-specifici ha anche rivelato come tale risposta sia scarsamente protettiva, con una presenza consistente di cellule Treg ENOA-specifiche a livello tumorale in grado di ridurre la funzionalità delle cellule effettrici Th17 e Th1. Prima di pensare all'impiego di questa proteina nell'immunoterapia del cancro pancreatico è quindi necessario condurre ulteriori studi, per elaborare strategie che permettano di contrastare gli effetti delle Treg migliorando al contempo le funzioni effettrici delle cellule Th17 e delle Th1. Sarebbe, inoltre, interessante studiare se a livello di tale proteina vi fossero determinanti antigenici più o meno immunogeni ed in grado di innescare risposte T differenti, di tipo più o meno protettivo nei confronti del tumore.

Infine, nel corso del terzo anno, abbiamo voluto valutare il ruolo della proteina PDIA3 come possibile antigene associato al cancro coloretale, basandoci sull'osservazione che pazienti affetti da CCR mostravano una risposta anticorpale alla PDIA3 che sembrava correlarsi positivamente con la loro sopravvivenza globale. Abbiamo, in effetti, riscontrato una risposta T PDIA3-specifica a livello tumorale in pazienti con CCR; tale risposta, inoltre, a differenza di quella indotta da ENOA in pazienti con adenocarcinoma pancreatico, si caratterizza per l'elevato numero di cellule T PDIA3-specifiche dal profilo prevalentemente di tipo effetttore, con un numero assai esiguo di cellule dal profilo regolatorio. La vaccinazione con PDIA3 o il trasferimento adottivo di cellule T PDIA3-specifiche espanse *in vitro*, potrebbero, quindi, rappresentare una nuova e valida via di trattamento per i pazienti con cancro del colon-retto. Anche in questo caso potrebbe essere comunque interessante indagare quali peptidi derivanti dalla PDIA3 possano essere realmente ed efficacemente più immunodominanti.

BIBLIOGRAFIA

Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, *et al.* Surface phenotype and antigen specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007; 8:639-646.

Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, *et al.* Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann NY Acad Sci* 2009; 1171:59–76.

Aggarwall BB, Sethi G, Ahn KS *et al.* Targeting signal-transducerand-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer:modern target but ancient solution. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1091:151–69.

Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:834-46.

AIOM. Associazione Italiana di Oncologia Medica. Linee guida Carcinoma Pancreas Esocrino. Edizione 2013. Disponibile online: www.aiom.it.

AIRTUM Working group. I numeri del cancro in Italia 2013: Pancreas esocrino 2013; 93-96.

Alvarez E, Moga E, Barquinero J, *et al.* Dendritic and tumor cell fusions transduced with adenovirus encoding CD40L eradicate B-cell lymphoma and induce a Th17-type response. *Gene Ther* 2009; 17:469–477.

Amedei A, Nicolai E, D'Elis MM. T cells and adoptive immunotherapy: recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology. *Clin Dev Immunol* 2011a; 2011:320571.

Amedei A, Benagiano M, della Bella C, Nicolai E, D'Elis MM. Novel immunotherapeutic strategies of gastric cancer treatment. *J Biomed Biotechnol* 2011b; 2011:437348.

Amedei A, Nicolai E, Benagiano M, Della Bella C, Cianchi F, Bechi P, Taddei A, Bencini L, Farsi M, Cappello P, Prisco D, Novelli F, D'Elia MM. Ex vivo analysis of pancreatic cancer-infiltrating T lymphocytes reveals that ENO-specific Tregs accumulate in tumor tissue and inhibit Th1/Th17 effector cell functions. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62:1249-60.

American Cancer Society. Atlanta, Georgia. *Cancer Facts & Figures* 2013.

Anderson KE, Mack TM, Silverman DT. Cancer of the pancreas. In: Schottenfeld D, Fraumeni Jr JF, eds., *Cancer Epidemiology and Prevention*. New York: Oxford University Press 2006; 721-762.

André T, Boni C, Navarro M, *et al.* Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*. 2009; 27:3109-16.

André T, Quinaux E, Louvet C, *et al.* Phase III study comparing a semimonthly with a monthly regimen of fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for stage II and III colon cancer patients: final results of GERCOR C96.1. *J Clin Oncol* 2007; 25:3732-8.

Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, *et al.* Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends in Immunol* 2012; 33:505-512.

Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007; 204:1849-1861.

Annunziato F, Romagnani S. The transient nature of the Th17 phenotype. *Eur J Immunol* 2010; 40:3312–3316.

Artinyan A, Anaya DA, McKenzie S, *et al.* Neoadjuvant therapy is associated with improved survival in resectable pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2011; 117:2044–2049.

Bang YJ, Kim YW, Yang HK, *et al.* Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2012; 379:315-21.

Beatty G and Paterson Y. IFN-gamma-dependent inhibition of tumor angiogenesis by tumorinfiltrating CD4 T cells requires tumor responsiveness to IFN-gamma. *J Immunol* 2001; 166: 2276–2282.

Benchetrit F, Ciree A, Vives V, *et al.* Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 2002; 99:2114–2121.

Boghossian S, Robinson S, Von Delwig A, *et al.* Immunotherapy for treating metastatic colorectal cancer. *Surg Oncol.* 2012; 21:67-77.

Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, *et al.* WHO Classification and TNM of tumours of the digestive system (4th edition), Lyon 2010.

Bracci PM, Wang F, Hassan MM, *et al.* Pancreatitis and pancreatic cancer in two large pooled case-control studies. *Cancer Causes Control* 2009; 20:1723-1731.

Breslin TM, Hess KR, Harbison DB, *et al.* Neoadjuvant chemoradiotherapy for adenocarcinoma of the pancreas: treatment variables and survival duration. *Ann Surg Oncol* 2001; 8:123-32.

Brown KM, Siripurapu V, Davidson M, *et al.* Chemoradiation followed by chemotherapy before resection for borderline pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg* 2008; 195:318-21.

Burnet M. Aging and immunological surveillance. *Triangle* 1973; 12:159-62.

Capello M, Ferri-Borgogno S, Cappello P, *et al.* α -Enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *FEBS J* 2011; 278:1064-1074.

Cappello P, Rolla S, Chiarle R, *et al.* Vaccination with ENO1 DNA prolongs survival of genetically engineered mice with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2013; 144:1098-106.

Cappello P, Tomaino B, Chiarle R, *et al.* An integrated humoral and cellular response is elicited in pancreatic cancer by alpha-enolase, a novel pancreatic ductal adenocarcinoma-associated antigen. *Int J Cancer* 2009; 125:639–648.

Caretto D, Katzman SD, Villarino AV, *et al.* Cutting Edge: The Th1 Response Inhibits the Generation of Peripheral Regulatory T Cells. *J Immunol* 2010; 184:30-34.

Catenacci DVT, Kozloff M, Kindler HL, *et al.* Personalized colon cancer care in 2010. *Semin Oncol* 2011; 38:284–308.

Chaturvedi V, Collison LW, Guy CS, *et al.* Cutting Edge: Human Regulatory T Cells Require IL-35 To Mediate Suppression and Infectious Tolerance. *J Immunol* 2011; 186:6661-6666.

Chen JG, Xia JC, Liang XT, *et al.* Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients. *Int J Biol Sci* 2011; 7:53-60.

Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, *et al.* Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997; 17:5328–5337.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, *et al.* Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81:1893-904.

Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, *et al.* Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996; 77:1303-10.

Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, *et al.* IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat. Immunol* 2010; 11:1093-1101.

Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU, *et al.* Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity* 2005; 22:371–383.

Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins, Le Basi Patologiche delle Malattie, 1999. Ed. Piccin, VI edizione.

Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, *et al.* MAGIC Trial Participants. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:11–20.

Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, *et al.* Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:11-20.

Dash R, Richards JE, Su ZZ, *et al.* Mechanism by Which Mcl-1 Regulates Cancer-Specific Apoptosis Triggered by mda-7/IL-24, an IL-10-Related Cytokine. *Cancer Res* 2010; 70:5034-5045.

De Monte L, Reni M, Tassi E, *et al.* Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med* 2011; 208:469–478.

Del Chiaro M, Zerbi A, Falconi M, *et al.* Cancer risk among the relatives of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology* 2007; 7:459-69.

D'Elios MM, Amedei A, Manghetti M, *et al.* Impaired T-cell regulation of B-cell growth in *Helicobacter pylori*--related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology* 1999; 117:1105-12.

Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343:108-17.

Dhillon PK, Farrow DC, Vaughan TL, *et al.* Family history of cancer and risk of esophageal and gastric cancers in the United States. *Int J Cancer* 2001; 93:148–52.

Diedrich G, Bangia N, Pan M, *et al.* A role for calnexin in the assembly of the MHC class I loading complex in the endoplasmic reticulum. *J Immunol* 2001; 166:1703-9.

- Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:83-117.
- Duhen T, Duhen R, Lanzavecchia A, *et al.* Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood* 2012; 119:4430-4440.
- Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, *et al.* Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 2009; 10:857-863.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3:991-8.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21:137-48.
- Ehrlich P. Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1909; 5:73–290.
- Emdad L, Lebedeva IV, Su ZZ, *et al.* Historical perspective and recent insights into our understanding of the molecular and biochemical basis of the antitumor properties of mda-7/IL-24. *Cancer Biol Ther* 2009; 8:391-400.
- Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:2241-52.
- Eufemi M, Coppari S, Altieri F, *et al.* ERp57 is present in STAT3-DNA complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323:1306-12.
- Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, *et al.* Th22 represent a distinct subset of human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009; 119:3573–3585.
- Fletcher RH. Carcinoembryonic antigen. *Ann Intern Med* 1986; 104:66-73.

Fradet Y, Picard V, Bergeron A, *et al.* Cancer-testis antigen expression in bladder cancer. *Prog Urol* 2005; 15:1303-13.

Fridman, WH, Mlecnik B, Bindea G, *et al.* Immunosurveillance in human non-viral cancers. *Curr Opin Immunol* 2011; 23:272-278.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313:1960-4.

Garbi N, Hämmerling G, Tanaka S. Interaction of ERp57 and tapasin in the generation of MHC class I-peptide complexes. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:99-105.

Gaudernack G. Prospects for vaccine therapy for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20:299–314.

Ge Q, Holler PD, Mahajan VS, *et al.* Development of CD4+ T cells expressing a nominally MHC class I-restricted T cell receptor by two different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:1822–1827.

Gérard JP, Conroy T, Bonnetain F, *et al.* Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCO 9203. *J Clin Oncol* 2006; 24:4620-5.

Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, *et al.* Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 1994; 35:1590-592.

Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, *et al.* Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 2001; 294:605-9.

Giuliani F, de Vita F, Colucci G, *et al.* Maintenance therapy in colon cancer. *Cancer Treat Rev* 2010; 36:S42–S45.

Goedegebuure PS, Linehan DC, Eberlein TJ. T cells against Tumors. *Encyclopedia of Cancer, Second Edition, Elsevier Science (USA)* 2002; 4: 329-337.

Gomi S, Nakao M, Niiya F, *et al.* A cyclophilin B gene encodes antigenic epitopes recognized by HLA-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1999; 163:4994–5004.

Grazia-Roncarolo M, Gregori S, Battaglia M, *et al.* IL-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212:28-50.

Green DR, Ferguson TA. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:917-24.

Guerra N, Tan YX, Joncker NT, *et al.* NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 2008; 28:571-80.

Gupta S, Vittinghoff E, Bertenthal D, *et al.* New-onset diabetes and pancreatic cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:1366-72.

Haier J, Owzcareck M, Guller U, *et al.* Expression of MAGE-A cancer/testis antigens in esophageal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 2006; 26:2281-7.

Haller DG, Taberero J, Maroun J, *et al.* Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29:1465-71.

Hamai A, Pignon P, Raimbaud I, *et al.* Human TH17 Immune Cells Specific for the Tumor Antigen MAGE-A3 Convert to IFN- γ -Secreting Cells as They Differentiate into Effector T Cells In Vivo. *Cancer Res* 2012; 72:1059-1063.

Helicobacter and Cancer Collaborative Group. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* 2001; 49:347–53.

Horlock C, Stott B, Dyson PJ, *et al.* The effects of trastuzumab on the CD4+ CD25+ FoxP3+ and CD4+ IL17A+ T-cell axis in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2009; 100:1061–1067.

Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, *et al.* The central role of CD4+ T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 1998; 188:2357–2368.

Imai N, Harashima N, Ito M, *et al.* Identification of Lck-derived peptides capable of inducing HLA-A2-restricted and tumor-specific CTLs in cancer patients with distant metastases. *Int J Cancer* 2001; 94:237–242.

International Agency for Research on Cancer. Globocan 2008. Disponibile online: <http://globocan.iarc.fr>.

Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, *et al.* Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393:535-45.

Iovino F, Meraviglia S, Spina M, *et al.* Immunotherapy targeting colon cancer stem cells. *Immunotherapy* 2011; 3:97–106.

Ito M, Shichijo S, Tsuda N, *et al.* Molecular basis of T cell-mediated recognition of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61:2038–2046.

Jenner RG, Townsend MJ, Jackson I, Sun *et al.* The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of Tcell differentiation through a shared set of target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:17876-17881.

Jiang R, Tan Z, Deng L, *et al.* Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology* 2011; 54:900–909.

Jung S, Schluesener HJ. Human T lymphocytes recognize a peptide of single point-mutated, oncogenic ras proteins. *J Exp Med* 1991; 173:273-6.

Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, *et al.* Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 1996; 4:313-319.

Kauffman HM, McBride MA, Cherikh WS, *et al.* Transplant tumor registry: donors with central nervous system tumors¹. *Transplantation* 2002; 73:579-82.

Kawano K, Gomi S, Tanaka K, *et al.* Identification of a new endoplasmic reticulum resident protein recognized by HLA-A24-restricted tumor infiltrating lymphocytes of lung cancer. *Cancer Res* 2000; 60:3550–3558.

Kew M. Alpha-fetoprotein in primary liver cancer and other diseases. *Gut* 1974; 15:814-21.

Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 2002; 3:999-1005.

Kinjyo I, Inoue H, Hamano S, *et al.* Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1. *J Exp Med* 2006; 203:1021–31.

Knuth A, Danowski B, Oettgen HF, *et al.* T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:3511-5.

Koebel CM, Vermi W, Swann JB, *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007; 450:903-7.

Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, *et al.* Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009; 114:1141–1149.

Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, *et al.* B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* 2006; 203:871-881.

Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, *et al.* Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *J Clin Oncol* 2007; 25:2198-204.

Kyte JA, Trachsel S, Risberg B, Thor *et al.* Unconventional cytokine profiles and development of T cell memory in long-term survivors after cancer vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58:1609–1626.

Lazarevic V, Glimcher LH. T-bet in disease. *Nat Immunol* 2011; 12:597-606.

Lee JW, Wang P, Kattah MG, *et al.* Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells. *J Immunol* 2008; 181:6536–6545.

Lee YK, Turner H, Maynard CL, *et al.* Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 2009; 30:92-107.

Li D, Morris JS, Liu J, *et al.* Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA* 2009; 301:2553-62.

Lucenteforte E, La Vecchia C, Silverman D, *et al.* Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol* 2012; 23:374-82.

MacKie RM, Reid R, Junor B. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med* 2003; 348:567-8.

Maguire HC Jr, Greene MI. The neu (c-erbB-2) oncogene. *Semin Oncol* 1989; 16:148-55.

Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nat Immunol* 2008; 9:641–649.

Marshall NA, Galvin KC, Corcoran AM, *et al.* Immunotherapy with PI3K inhibitor and Toll-like receptor agonist induces IFN- γ +IL-17+ polyfunctional T cells that mediate rejection of murine tumors. *Cancer Res* 2012; 72:581-591.

Martin-Orozco N, Chung Y, Chang SH, *et al.* Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur J Immunol* 2009; 39:216–224.

Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, *et al.* T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 2009; 31:787–798.

Massucco P, Capussotti L, Magnino A, *et al.* Pancreatic resections after chemoradiotherapy for locally advanced ductal adenocarcinoma: analysis of perioperative outcome and survival. *Ann Surg Oncol* 2006; 13:1201-8.

Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:991-1045.

McCormack RT, Nelson RD, LeBien TW. Structure/function studies of the common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA/CD10) expressed on human neutrophils. *J Immunol* 1986; 137:1075-82.

Meng RD, El-Deiry WS. p53-independent upregulation of KILLER/DR5 TRAIL receptor expression by glucocorticoids and interferon-gamma. *Exp Cell Res* 2011; 262:154-169.

Mine T, Sato Y, Noguchi M, *et al.* Humoral responses to peptides correlate with overall survival in advanced cancer patients vaccinated with peptides based on pre-existing, peptide-specific cellular responses. *Clin Cancer Res* 2004; 10:929-37.

Miyagaki T, Sugaya M, Suga H, *et al.* IL-22, but not IL-17, dominant environment in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res* 2011; 17:7529-538.

Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, *et al.* Generation and regulation of human CD4⁺ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:15505–15510.

Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3+CD4+ regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol* 2011; 89:346-351.

Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, *et al.* Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; 30:899-911.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683–765.

Moretta A, Pantaleo G, Moretta L, *et al.* Direct demonstration of the clonogenic potential of every human peripheral blood T cell. Clonal analysis of HLA-DR expression and cytolytic activity. *J Exp Med* 1983; 157:743-54.

Muranski P, Antony PA, Restifo NP, *et al.* Tumor-reactive CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* 2010; 207:637–650.

Murphy KM, Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol* 2010; 11:674–680.

Naito Y, Saito K, Shiiba K, *et al.* CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:3491-4.

Nakao M, Shichijo S, Imaizumi T, *et al.* Identification of a gene coding for a new squamous cell carcinoma antigen recognized by the CTL. *J Immunol* 2000; 164:2565–2574.

Nakatsura T, Senju S, Ito M, *et al.* Cellular and humoral immune responses to a human pancreatic cancer antigen, coactosin-like protein, originally defined by the SEREX method. *Eur J Immunol* 2002; 32:826-36.

Niccolai E, Prisco D, D'Elia MM, Amedei A. What is recent in pancreatic cancer immunotherapy? *Biomed Res Int* 2013; 2013:492372.

NIH consensus conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA* 1990; 264:1444-50.

Nishikawa H, Kato T, Tawara I, *et al.* IFN-gamma controls the generation/activation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in antitumor immune response. *J Immunol* 2005; 175:4433-40.

Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 2010; 127:759-767.

Nishimura MI, Avichezer D, Custer MC, *et al.* MHC class I-restricted recognition of a melanoma antigen by a human CD4⁺ tumor infiltrating lymphocyte. *Cancer Res* 1999; 59:6230–6238.

Nishizaka S, Gomi S, Harada K, *et al.* A new tumor- rejection antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes infiltrating into a lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2000; 60:4830–4837.

Numasaki M, Fukushi J, Ono M, *et al.* Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 2003; 101:2620–2627.

Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007; 13:54-61.

Obeid M. ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin. *J Immunol* 2008; 181:2533-43.

Ochi A, Nguyen AH, Bedrosian AS, *et al.* MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells. *J Exp Med* 2012; 209:1671-1687.

O'Garra A, Murphy KM. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development. *Nat Immunol* 2009; 10:929–932.

O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, *et al.* IL-10 producing and naturally occurring CD4 Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 2004; 114:1372-1378.

Ogata K, Aihara R, Mochiki E, *et al.* Clinical significance of melanoma antigen-encoding gene-1 (MAGE-1) expression and its correlation with poor prognosis in differentiated advanced gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2011; 18:1195-203.

Old LJ, Boyse EA. Immunology of experimental tumors. *Annu Rev Med* 1964; 15:167-86.

Old LJ. Cancer immunology: the search for specificity--G. H. A. Clowes Memorial lecture. *Cancer Res* 1981; 41:361-75.

O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010; 327:1098-102.

Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, *et al.* Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu Rev Immunol* 29: 71–109.

Pagès F, Berger A, Camus M, *et al.* Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:2654-66.

Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:265-276.

Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 2003; 21:807-39.

Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:588-594.

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.
- Patel M, Hoffe S, Malafa M, *et al.* Neoadjuvant GTX chemotherapy and IMRT-based chemoradiation for borderline resectable pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 2011; 104:155-61.
- Persson PG, Bernell O, Leijonmarck CE, *et al.* Survival and cause-specific mortality in inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 1996; 110:1339-1345.
- Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:916-932.
- Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Tumor-reactive CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* 2010; 207:637–650.
- Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 2011; 332:600–603.
- Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:267–96.
- Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6:699-708.
- Ramanathan RK, Lee KM, McKolanis J, *et al.* Phase I study of a MUC1 vaccine composed of different doses of MUC1 peptide with SB-AS2 adjuvant in resected and locally advanced pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2005; 54:254-64.
- Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, *et al.* Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* 1983; 14:931-968.

Rivat C, Rodrigues S, Bruyneel E, *et al.* Implication of STAT3 signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3) – and vascular endothelial growth factor-mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Res* 2005; 65:195–202.

Roch N, Kutup A, Vashist Y, *et al.* Coexpression of MAGE-A peptides and HLA class I molecules in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2010; 30:1617-23.

Rotondi M, Lazzeri E, Romagnani P, *et al.* Role for interferon-gamma inducible chemokines in endocrine autoimmunity: an expanding field. *J Endocrinol Invest* 2003; 26:177-180.

Sahin U, Türeci O, Schmitt H, *et al.* Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:11810-3.

Saif MW. Pancreatic neoplasm in 2011: an update- *Journal of the Pancreas* 2011; 12:316-321.

Saka M, Morita S, Fukagawa T, *et al.* Present and future status of gastric cancer surgery,” *Jpn J Clin Oncol* 2011; 41:307–313.

Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, *et al.* Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *N Engl J Med* 2007; 357:1810-20.

Sato E, Olson SH, Ahn J, *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:18538-43.

Sato Y, Fujiwara T, Mine T, *et al.* Immunological evaluation of personalized peptide vaccination in combination with a 5-Fluorouracil derivative (TS-1) for advanced gastric or colorectal carcinoma patients. *Cancer Sci* 2007; 98:1113–1119.

Sato Y, Shomura H, Maeda Y *et al.* Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide. *Cancer Sci* 2003; 94:802–808.

Seo N, Hayakawa S, Tokura Y. Mechanisms of immune privilege for tumor cells by regulatory cytokines produced by innate and acquired immune cells. *Semin Cancer Biol* 2002; 12:291–300.

Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, *et al.* Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res* 2008; 14:3254-3261.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410:1107-11.

Shevach EM. Mechanisms of Foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009; 30:636-645.

Shichijo S, Nakao M, Imai Y, *et al.* A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 187:277-88.

Shinchi H, Takao S, Noma H, *et al.* Length and quality of survival after external-beam radiotherapy with concurrent continuous 5-fluorouracil infusion for locally unresectable pancreatic cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 53:146-50.

Shresta S, Pham CT, Thomas DA, *et al.* How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 1998; 10:581-7.

Shrikant PA, Rao R, Li Q, *et al.* Regulating functional cell fates in CD8 T cells. *Immunol Res* 2010; 46:12-22.

Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, *et al.* HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 2010; 28:367-88.

Sjodahl K, Lu Y, Nilsen TI, *et al.* Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. *Int J Cancer* 2007; 120:128–32.

Smalley SR, Benedetti JK, Haller DG, *et al.* Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection. *J Clin Oncol* 2012; 30:2327-33.

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.

Smyth MJ, Thia KY, Street SE, *et al.* Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 2000b; 191:661-8.

Smyth MJ, Thia KY, Street SE, *et al.* Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 2000a; 192:755-60.

Somasundaram R, Robbins P, Moonka D, *et al.* CD4(+), HLA class I-restricted, cytolytic T-lymphocyte clone against primary malignant melanoma cells. *Int J Cancer* 2000; 85:253–259.

Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol* 2011; 12:383-390.

Stokes JB, Nolan NJ, Stelow EB, *et al.* Preoperative capecitabine and concurrent radiation for borderline resectable pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 2011; 18:619-27.

Street SE, Trapani JA, MacGregor D, *et al.* Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med* 2002; 196:129-34.

Stutman O. Immunodepression and malignancy. *Adv Cancer Res* 1975; 22:261-422.

Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 1974; 183:534-6.

Su X, Ye J, Hsueh EC, *et al.* Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J Immunology* 2010; 184:1630–1641.

Sultana A, Smith CT, Cunningham D, *et al.* Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:2607-15.

Suso EM, Dueland S, Rasmussen AM, *Vet al.* hTERT mRNA dendritic cell vaccination: complete response in a pancreatic cancer patient associated with response against several hTERT epitopes. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60:809–818.

Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, *et al.* Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:713-758.

Taga K, Mostowski H, Tosato G. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* 1993; 81:2964–2971.

Takahashi H, Numasaki M, Lotze MT, *et al.* Interleukin-17 enhances bFGF, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. *Immunol Lett* 2005; 98:189-193.

Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, *et al.* Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 2002; 195:161-169.

Tatsumi T, Kierstead LS, Ranieri E, *et al.* Disease-associated Bias in T Helper Type 1 (Th1)/Th2 CD4+ T Cell Responses Against MAGE-6 in HLA-DRB1*0401+ Patients With Renal Cell Carcinoma or Melanoma. *J Exp Med* 2002; 196:619–628.

Thiébaud AC, Jiao L, Silverman DT, *et al.* Dietary fatty acids and pancreatic cancer in the NIH-AARP diet and health study. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:1001-11.

Thomas L. In: Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive State. Edit. by Lawrence HS, Hoerber, New York 1959; 529.

Tomaino B, Cappello P, Capello M, *et al.* Circulating autoantibodies to phosphorylated alpha-enolase are a hallmark of pancreatic cancer. *J Proteome Res* 2011; 10:105–112.

Touchefeu Y, Harrington KJ, Galmiche JP, *et al.* Review article: gene therapy, recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32:953–968.

Tsunoda A, Shibusawa M, Kawamura M, *et al.* Colorectal cancer after pelvic irradiation: case reports. *Anticancer Res* 1997; 17: 729-732.

van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254:1643-7.

van Houdt IS, Sluijter BJ, Moesbergen LM, *et al.* Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *Int J Cancer* 2008; 123:609-15.

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, *et al.* Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011; 29:235-71.

Vicari AP, Trinchieri G. Interleukin-10 in viral diseases and cancer: exiting the labyrinth? *Immunol Rev* 2004; 202:223–236.

Vidal L, Gafter-Gvili A, Shpilberg O. Immunotherapy for patients with follicular lymphoma: the contribution of systematic reviews. *Acta Haematol* 2011; 125:23-31.

Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:523–532.

Vignali DAA. Mechanisms of Treg Suppression: Still a Long Way to Go. *Front Immunol* 2012; 3:191-195.

von Bernstorff W, Voss M, Freichel S, *et al.* Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001; 7:925s–932s.

von Euw E, Chodon T, Attar N, *et al.* CTLA4 blockade increases Th17 cells in patients with metastatic melanoma. *J Transl Med* 2009; 7:35.

Vrieling A, Bueno-de-Mesquita HB, *et al.* Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 2010; 126:2394-403.

Wang L, Yi T, Kortylewski M, *et al.* IL-17 can promote tumour growth through an IL-6–Stat3 signalling pathway. *J Exp Med* 2009; 206:1457–1464.

Warshaw AL, Fernández-del Castillo CN. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* 1992; 26:455–465.

WCRF & AICR. Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: AICR; 2007.

Wilke CM, Bishop K, Fox D, *et al.* Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends in Immunol* 2011; 32:603–611.

Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, *et al.* Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997; 112:594-642.

Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, *et al.* 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: a single institution experience. *J Gastrointest Surg* 2006; 10:1199–1210.

Wu S, Rhee K, Albesiano E, *et al.* A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature Med* 2009; 15:1016-1022.

Xu X, Fu XY, Plate J, *et al.* IFN- γ induces cell growth inhibition by Fas mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res* 1998; 58:2832-2837.

Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol* 2011; 234:24-430.

Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, *et al.* MAGE expressions mediated by demethylation of MAGE promoters induce progression of non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2011; 31:171-5.

Yang D, Nakao M, Shichijo S, *et al.* Identification of a gene coding for a protein possessing shared tumor epitopes capable of inducing HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes in cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59:4056-63.

Ychou M, Boige V, Pignon JP, *et al.* Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. *J Clin Oncol.* 2011; 29:1715-21.

Ye ZJ, Zhou Q, Gu Y, *et al.* Generation and differentiation of IL-17-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion. *J Immunol* 2010; 185:6348–6354.

Zaidi MR, Merlino G. Two faces of IFN-g in cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17:6118-6124.

Zhang W, Chen Y, Wei H, *et al.* Antiapoptotic activity of autocrine interleukin-22 and therapeutic effects of interleukin-22-small interfering RNA on human lung cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6432-6439.

Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89:587-596.

Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:715-27.

Zou W, Restifo NP. TH17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:248-256.