

**CORSO DI
FORMAZIONE A DISTANZA**

**Immunoncologia e
Immunoterapia Oncologica:
“ la quinta strada ”**

Roberto Benelli

CORSO DI FORMAZIONE A DISTANZA
Immunoncologia e Immunoterapia Oncologica:
“la quinta strada”

Responsabile Scientifico: Dott. Roberto Benelli (Prato)

Periodo di Svolgimento: dal 18/06/2018 al 17/06/2019

Durata effettiva dell'attività FAD: 10 ore

Crediti ECM-FAD assegnati: 10

Destinatari

Tutte le professioni e discipline

Razionale del corso

Questa è una pubblicazione nella quale si ripercorrono i progressi della immunoncologia e dell'immunoterapia oncologica che negli ultimi anni si sono sorprendentemente sviluppati. Abbiamo cercato di riassumere concetti che sicuramente sono ben noti agli addetti ai lavori ma possono essere di interesse per tutti i professionisti della sanità per comprendere e approfondire le loro conoscenze sugli sviluppi delle terapie emergenti che si basano sulle risposte del sistema immunitario.

Obiettivi ECM Nazionali

Contenuti tecnico-professionali (conoscenze e competenze) specifici di ciascuna professione, di ciascuna specializzazione e di ciascuna attività ultraspecialistica.

Programma

Il volume che potrà essere scaricato in pdf consta di dei seguenti capitoli:

- Introduzione
- Le tappe dell'Immunoncologia e dell'immunoterapia oncologica
- Le terapie immunoncologiche
- Gli inibitori dei checkpoint immunitari
- Le risposte al trattamento con inibitori dei checkpoint
- Parametri di valutazione della risposta all'immunoterapia
- Gli effetti avversi dell'immunoterapia
- Acquisizioni recenti
- Approfondimenti e glossario
 - Sistema Immunitario
 - Il microbiota/microbioma
 - Microambiente Tumorale
 - Fattori che influenzano l'attività del sistema immunitario
 - Attività fisica e immunità
 - Immunità e comportamenti naturali
- Glossario

Al termine dello studio, per poter ricevere i Crediti dovranno essere effettuati

➤ Test di Verifica dell'apprendimento con domande a scelta multipla a doppia randomizzazione

➤ Test di Valutazione della Qualità

Il Test di verifica dell'apprendimento potrà essere ripetuto più volte. Il minimo per ricevere i crediti è del 75% di risposte esatte (23 risposte esatte)

CORSO DI
FORMAZIONE A DISTANZA

IMMUNONCOLOGIA e IMMUNOTERAPIA ONCOLOGICA: “ la quinta strada ”

INDICE

Introduzione	4
Le tappe dell'immunoncologia e dell'immunoterapia oncologica ..	7
Le terapie immunoncologiche	19
Gli inibitori dei checkpoint immunitari	26
Le risposte al trattamento con inibitori dei checkpoint	31
Parametri di valutazione della risposta all'immunoterapia	37
Gli effetti avversi dell'immunoterapia	38
Acquisizioni recenti	40
Approfondimenti	43
Sistema immunitario	44
Il microbiota/microbioma	51
Microambiente tumorale	55
Fattori che influenzano l'attività del sistema immunitario	59
Attività fisica e immunità	71
Immunità e composti naturali	79
Glossario	86



Il **cancro** è una malattia multifattoriale, un insieme eterogeneo di molteplici affezioni non più catalogabili considerando soltanto le caratteristiche istologiche dei tessuti e degli organi colpiti, ma da classificare sulla base delle caratteristiche genetiche e molecolari e da combattere su questo piano avendo sempre presente l'instabilità e la capacità di mutare delle cellule neoplastiche in risposta alle terapie. In questo scenario si muovono oggi l'immunoncologia e l'immunoterapia oncologica.

L'**immunoncologia** è un'area di studio molto complessa ed in continua evoluzione sviluppata partendo dalle scoperte del patologo tedesco *Rudolf Virchow* (1821-1902). Questo scienziato, con i suoi studi innovativi, ha ampliato i confini della medicina e si è guadagnato una fama internazionale tanto da essere considerato "Eroe di tutti i tempi" (*Dun L. Rudolf Virchow. Four lives in one. Ed. 2016.*).

L'immunoncologia si è fatta strada a piccoli passi nel XX secolo, alternando percorsi tortuosi a scoperte rilevanti, procedendo nel dubbio e nell'incertezza, ma anche nell'entusiasmo e nella passione della ricerca scientifica; ciò emerge dal lavoro dell'illustre immunologo Prof. *Alberto Mantovani* i cui studi hanno dimostrato come i macrofagi, componenti fondamentali dell'immunità innata e delle reazioni infiammatorie, sono in grado di promuovere la crescita tumorale tanto che la strategia alternativa di lotta al cancro si propone di colpire non solo le cellule tumorali, ma anche il microambiente infiammatorio che le circonda di cui le cellule immunitarie (linfociti T e macrofagi) fanno parte (*Mantovani A. I guardiani della vita. Ed. Baldini e Castoldi s.r.l., 2014.*).

L'**immunoterapia oncologica** sta guadagnando, in questi ultimi anni, un posto di primo piano nella cura del cancro venendo così a premiare tutti gli studiosi che, nel corso degli anni, hanno creduto in questa disciplina alla ricerca della soluzione di un problema annoso e sempre attuale che ha appassionato generazioni di scienziati. L'incapacità del sistema immunitario di esercitare un'attività favorevole nella patologia neoplastica è apparsa, per molti anni, un ostacolo insormontabile all'utilizzo di questa strada per la cura dei tumori.

Le cellule tumorali, infatti, pur presentando sulla loro superficie proteine mutate (antigeni) in grandi quantità, teoricamente capaci di indurre una risposta immunitaria, come accade per i batteri e i virus, in realtà, nella quasi totalità dei casi, non promuovono una risposta adeguata. È come se queste cellule fossero invisibili ai sistemi di difesa dell'organismo. Anzi, il sistema immunitario nel microambiente infiammatorio che circonda le cellule tumorali può addirittura favorire la loro moltiplicazione e quindi la progressione neoplastica.

L'immunoterapia oncologica, dopo due secoli di ricerche, si affianca oggi alla chemioterapia e alle terapie a bersaglio molecolare nella cura della patologia neoplastica. Rispetto a quest'ultime, le terapie immuno-oncologiche hanno come obiettivo il sistema immunitario ed operano nel tentativo di riattivarlo direttamente in modo da eliminare le cellule neoplastiche, oppure di inibire meccanismi di soppressione esercitati dal tumore.

L'immunoterapia riveste un interesse particolare per i seguenti motivi:

a) la risposta immunitaria può attaccare singole cellule tumorali, cellule quiescenti e cellule metastatiche. In tal modo si differenzia dalla chemioterapia e dalla radioterapia che colpiscono selettivamente cellule in divisione mitotica. Inoltre può dare risposte terapeutiche favorevoli anche in neoplasie molto avanzate (*"effetto Lazzaro"*);

b) l'immunoterapia a differenza della chemioterapia, non agendo direttamente sulle cellule tumorali in moltiplicazione, non determina la selezione di ceppi cellulari resistenti;

c) le risposte cliniche all'immunoterapia risultano differenti rispetto a quelle offerte dalle altre terapie antitumorali. Infatti gli immunoterapici agendo sul sistema immunitario, non determinano effetti benefici in tempi rapidi ma solo dopo alcuni mesi dall'inizio del trattamento. In questo periodo di latenza è talora possibile osservare un aumento della massa tumorale, nota come *"pseudo-progressione"*, che può manifestarsi quando le cellule T infiltrano i siti neoplastici. Ad essa può far seguito, in un secondo tempo, la regressione neoplastica;

d) è possibile creare farmaci immunoterapici personalizzati prelevando cellule del sistema immunitario del malato, trattandole e somministrandole di nuovo nel corpo dello stesso paziente;

e) può prevenire la comparsa di recidive grazie al meccanismo della memoria immunologica, cioè della capacità dell'organismo di ricordare gli antigeni che hanno indotto la risposta immunitaria e reagire nel casosi ripresentino;

f) può essere associata ad altre terapie oncologiche (chemio e radioterapia, terapie target) e a composti adiuvanti quali farmaci antinfiammatori inibitori delle prostaglandine PGE2 e delle ciclossigenasi COX-2; g) presenta effetti collaterali generalmente più contenuti rispetto alla chemioterapia anche se talora possono essere rilevanti. Occorre infatti considerare che l'immunoterapia oncologica può indurre un aumento dei meccanismi di difesa in parti del corpo dove non sono necessari determinando fenomeni infiammatori di vario tipo e a varia localizzazione (pelle, apparato gastroenterico, etc.).

Le terapie immunoncologiche tuttavia, se da una parte sono in grado di ottenere risultati sorprendenti, in altri casi non risultano efficaci. Gli studi e la ricerche future permetteranno di comprendere meglio le ragioni di questa diversa risposta, migliorando le prospettive terapeutiche.

L'**immunoterapia oncologica** rappresenta di conseguenza "*la quinta strada*" nella cura dei tumori, dopo chirurgia, chemioterapia, radioterapia e terapie biologiche a bersaglio molecolare (*terapie target*) sviluppate in seguito alla decodificazione del genoma umano ed agli sviluppi delle ricerche di biologia molecolare. L'immunoterapia è oggi in grado di cronicizzare o addirittura condurre alla guarigione con risultati miracolistici neoplasie avanzate per le quali fino a pochi anni fa non esistevano cure efficaci.

L'ingegneria genetica e la tipizzazione tumorale permetteranno nei prossimi anni di costruire precise mappe tumorali e renderanno la immunoterapia sempre più selettiva, specifica per ciascun paziente, permettendo di trattare i malati in modo mirato e con un risparmio di risorse. Infatti le terapie immunoncologiche hanno oggi un alto costo e di conseguenza è necessario attuare una selezione oculata dei soggetti da trattare.

The background of the slide is an abstract, marbled pattern in shades of blue and white, resembling a microscopic view of tissue or a nebula. The text is centered in the middle of the slide.

**Le tappe
dell'immunoncologia
e dell'immunoterapia
oncologica**

Le tappe dell'immunoncologia e dell'immunoterapia oncologica

La storia dell'immunologia e dell'immunoncologia si dipana, in oltre 200 anni di studi e di ricerche, in un'alternanza di scoperte, vittorie, fallimenti, scoraggiamenti e di rinnovato entusiasmo di tutti gli studiosi che hanno percorso questa strada nella lotta contro il cancro. L'inizio della lunga storia dell'immunologia risale, probabilmente, alla sperimentazione del vaccino contro il vaiolo da parte del medico e naturalista britannico **Edward Jenner**. Lo scienziato, alla fine del 1700, dimostra, su base empirica, che l'infezione con il vaiolo vaccino, di lieve entità per l'uomo, rende immuni dalla forma umana della malattia. Sempre nella seconda metà del 1700 l'anatomista britannico **William Hewson**, considerato il padre dell'ematologia, descrive per la prima volta i linfociti che solo nel 1958-1960 sono riconosciuti responsabili delle reazioni immunologiche dell'organismo ed in grado di moltiplicarsi in seguito a stimolazione con composti mitogeni (Medawar, 1958; Nowell, 1960) (Ribatti D. *L'immunologia nel Novecento*. Carrocci Editore, 2017.). Se queste scoperte segnano l'inizio dell'immunologia, si deve tuttavia a **Rudolf Virchow**, "il papa della medicina", la nascita della immunoncologia e prende valore l'ipotesi di un legame fra **infiammazione e cancro**. Nel 1863, lo studioso dimostra infatti la presenza di infiltrati leucocitari in tessuti tumorali che, secondo lo scienziato, era la prova provata dell'origine del cancro da aree di infiammazione cronica. Si devono ad **Alberto Mantovani** studi recenti sul legame fra microambiente tumorale infiammatorio, resistenza alle cure e progressione neoplastica. In particolare l'osservazione che i macrofagi, cellule fondamentali dell'immunità innata e componente fondamentale della reazione infiammatoria, invece di bloccare la crescita tumorale possono esercitare anche un'azione favorente l'attività e la progressione tumorale (Balkwill e Mantovani. *Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet*, 2001.). I primi progressi dell'immunologia si hanno alla fine del 1800 con il premio Nobel **Emil von Berhing** che, a Berlino, dimostra che l'inoculazione di tossine batteriche nell'animale da esperimento determina la produzione di antitossine (anticorpi) in grado di neutralizzarle. Solo con l'illustre biologo francese **Louis Pasteur**, considerato il progenitore dell'immunologia moderna, si giunge ad una definizione scientifica dell'immunità e all'introduzione della vaccinazione come pratica preventiva nelle malattie infettive. Agli inizi del 1900 gli scienziati **Ilja Metchnikoff** e **Paul Ehrlich**, premi Nobel per la medicina nel 1908,

dimostrano la capacità dell'organismo di difendersi dalle malattie attraverso il sistema immunitario. Si deve a Metchnikoff la scoperta dei fagociti avvenuta analizzando stelle marine nel mare di Messina. Utilizzando una spina di rosa del suo giardino lo scienziato si accorse che, pungendo alcune larve di stelle marine, nel punto di penetrazione giungevano globuli bianchi in grado di fagocitare i microorganismi inoculati. Con *Paul Ehrlich*, microbiologo e immunologo tedesco, fondatore della chemioterapia, si gettano le basi dell'immunoterapia e si arriva alla **definizione di anticorpo** quale componente del siero in grado di reagire in maniera specifica contro un determinato agente patogeno (antigene). Secondo lo scienziato **nell'organismo sono presenti anticorpi in grado di attaccare, come proiettili magici (*magic bullets*), le cellule tumorali**. L'illustre immunologo australiano *Frank Macfarlane Burnet* descrive il sistema immunitario come *una forza in grado di reagire e trasformarsi* e nel 1957, insieme a *Lewis Thomas*, sostiene che **il sistema immunitario è attivo in modo permanente nei tumori**. I due scienziati formulano la **teoria della "immunosorveglianza"** come una funzione fisiologica del sistema immunitario in grado di riconoscere e distruggere cloni di cellule trasformate prima che portino al cancro e uccidere i tumori una volta formati. Tale teoria si identifica nelle **"tre E"** e si articola in tre fasi: *Elimination*, *Equilibrium*, *Escape*. La prima fase (*Elimination*) è caratterizzata dall'eliminazione, da parte del sistema immunitario, di cellule che si riproducono in maniera incontrollata. A questa fase fa seguito una condizione di equilibrio (*Equilibrium*) in cui il sistema immunitario riesce ancora a mantenere il controllo dei fenomeni. Si arriva infine all'ultima fase (*Escape*) in cui il tumore ha il sopravvento, blocca e sovrverte le risposte immunitarie e crea un **microambiente infiammatorio** che concorre alla crescita neoplastica. Burnet elaborò la teoria della sorveglianza immunitaria attribuendo l'insorgenza di un tumore maligno ad un'azione inadeguata dell'immunità come si verifica negli individui anziani e nelle condizioni di immunodeficienza. Numerose evidenze tuttavia hanno messo in discussione questa teoria in quanto la risposta immunitaria nei tumori non è mediata soltanto dai linfociti T, ma vi concorrono anche i linfociti B, i macrofagi e le cellule Natural Killer (NK), quasi a comporre una "orchestra immunologica" con azioni combinate e coordinate il cui direttore è rappresentato dalle cellule T. Inoltre la popolazione cellulare è molto eterogenea e presenta una notevole variabilità delle caratteristiche antigeniche delle numerose

sottopopolazioni di cellule neoplastiche tanto che risulta difficile prevedere una risposta immunitaria specifica nei confronti di un determinato tumore. Infine è stato osservato che le risposte immunitarie contro molti tumori sono inefficaci, ma possono essere riattivate così da essere in grado di distruggere le cellule tumorali. Tornando indietro nel tempo, alla fine del 1800, erano già noti fenomeni di regressione tumorale come conseguenza di processi infettivi. Nel 1891 **William B. Coley**, chirurgo a New York, riporta la guarigione di un voluminoso sarcoma dopo l'iniezione nel paziente di una miscela di streptococchi. È questo uno dei primi esempi di immunoterapia. In precedenza il fisico tedesco **Busch** aveva riportato la scomparsa di un tumore maligno in un paziente che aveva contratto l'erisipela (infezione da streptococco). Coley, dopo la favorevole esperienza, al *Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC, NY-NY)*, tentò la cura di oltre 1000 pazienti utilizzando miscugli batterici noti come “*tossine di Coley*” ottenendo risultati non sempre favorevoli tanto che fu molto criticato e addirittura etichettato come un ciarlatano. Nel 1894 la rivista medica americana JAMA si esprimeva in senso critico nell'impiego delle tossine di Coley. In seguito la scienza moderna ha dimostrato che i principi dello studioso erano corretti e che alcuni tumori maligni sono sensibili alla stimolazione del sistema immunitario; per questo Coley è oggi riconosciuto come il padre della immunoterapia (Mc Carthy. *The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue Sarcomas. The Yowa Orthopaedic Journal*, 2006.). Anche in Italia il patologo ed immunologo **Eugenio Centanni** ha utilizzato preparati microbici per stimolare una risposta dell'immunità innata. **Donald Morton**, nel 1970, descrive una regressione tumorale utilizzando il BCG (*Bacillo di Calmette-Guérin*), batterio modificato come vaccino per la terapia della TBC. Si deve però a **Lloyd John Old**, immunologo al MSKCC, lo sviluppo della prima immunoterapia nei tumori della vescica con instillazioni endovesicali di BCG. Esso è in grado di risvegliare, a livello del viscere, una reazione dell'immunità innata che distrugge le cellule tumorali. **Alvaro Morales** nel 1976 pubblica i primi risultati clinici favorevoli con BCG che diviene lo standard di cura. Intanto si rendono disponibili vaccini preventivi per il virus dell'epatite B ed il virus HPV rispettivamente per la prevenzione del cancro del fegato, della cervice uterina e altre neoplasie. Nel 2010 si ha l'approvazione di un vaccino per la cura del cancro prostatico metastatico che tuttavia non darà i risultati sperati. La nuova frontiera della ricerca è rappresentata da vaccini terapeutici basati sul riconoscimento da parte del sistema immunitario di strutture della

cellula tumorale. Nel 1972 viene attribuito il premio Nobel per la medicina agli studiosi **Gerald Edelman** e **Rodney Porter** per aver definito l'esatta struttura chimica degli anticorpi. In essi è presente una parte proteica comune nella quale si riconosce una porzione fissa ed una variabile. La prima è in grado di facilitare l'attività fagocitaria dei fagociti e di far attivare una cascata enzimatica, rappresentata dal *complemento*, che determina la lisi della parete cellulare batterica. La parte variabile è invece quella che riconosce l'antigene a cui si lega in modo specifico. In seguito si scopre che gli anticorpi sono presenti nei liquidi biologici e vengono prodotti e associati alla membrana delle cellule B: sono cioè i recettori con cui tali cellule riconoscono in modo specifico gli antigeni. La capacità di riconoscimento interessa un numero enorme di specificità come dimostrato dal biologo **Susumu Tonegawa**, premio Nobel nel 1987, che scopre che nel corso della vita i geni delle immunoglobuline subiscono rimaneggiamenti che amplificano l'informazione genetica utilizzabile. Negli anni '70 **Rolf Martin Zinkernagel**, immunologo svizzero, scopre la modalità con cui il sistema immunitario distingue se stesso (cosiddetto *self*). Ciò avviene attraverso il "complesso maggiore di istocompatibilità" (MHC) già identificato intorno al 1930 dall'americano **Peter Gorer**.

Nel 1973 **Ralph Steinman**, immunologo alla *Rockefeller University* (New York), comprende la funzione delle cellule dendritiche. Tali cellule, identificate nella cute da **Paul Langerhans** nel 1868, sono specializzate nella cattura e presentazione dell'antigene e costituiscono l'anello di congiunzione fra immunità innata ed immunità acquisita. Steinman muore tre giorni prima di ricevere il premio Nobel per la sua grande scoperta. A metà degli anni '70 **Ronald Herberman**, al *National Institutes of Health* (USA), e **Eva Klein**, in Svezia, scoprono i linfociti *Natural Killer* (NK), o cellule NK, in grado di uccidere "naturalmente" le cellule tumorali e più in generale cellule prive di identità immunologica.

Studi sulle cellule NK sono stati eseguiti anche dall'immunologo italiano **Lorenzo Moretta** e dalla sua equipe a Genova. Le conoscenze acquisite su queste cellule e sui recettori hanno permesso di raggiungere importanti risultati nella cura delle leucemie acute.

Nel 1975, a Cambridge (Inghilterra), i premi Nobel **George Köhler** e **César Milstein**, studiando i linfociti B mettono a punto una tecnica che permette di produrre una quantità illimitata di anticorpi fra

loro identici e dotati di specificità predefinita. Sono gli **anticorpi monoclonali** che rappresentano molecole indispensabili nella ricerca oncologica ed in ambito clinico e terapeutico.

In oncologia permettono di identificare e tipizzare differenti sottotipi di tumore e quindi di classificarli con maggior precisione consentendo di indirizzare selettivamente le cure. Si apre così la strada alla *Precision Medicine* e alle *Target Therapy* utilizzate per la cura dei linfomi, ma anche di tumori solidi (mammella, polmone, colon). Molti dei nuovi farmaci antitumorali sono oggi anticorpi monoclonali e le attuali tecnologie rendono possibili la coltura di cellule B umane, il prelievo di anticorpi dai pazienti e la loro amplificazione. Una tappa importante nella storia recente dell'immunologia è la scoperta dei recettori TLR (*Toll-like receptors*) avvenuta ad opera di **Christiane Nüsslein-Volhard**, negli anni '70, in un laboratorio tedesco. Analizzando i geni coinvolti nello sviluppo del moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*), che si caratterizza per la rapida riproduzione e possiede grandi cromosomi facilmente osservabili, viene identificata un'anomalia. Il gene responsabile del fenomeno viene definito *Toll* (meraviglioso). La scoperta, pubblicata sulla rivista *Nature* nel 1980, ha contribuito ad ampliare le conoscenze del sistema immunitario. I ***Toll-like receptors*** sono localizzati sulle cellule dell'immunità ed in particolare sulle cellule dendritiche dell'immunità innata. Il loro compito è di far partire un segnale di allarme che viene innescato alla presenza di microrganismi o sostanze estranee derivanti da un danno ad organi e tessuti. Mediante questo segnale le cellule dendritiche attivano le cellule dell'immunità specifica (cellule T e B). Ecco quindi che si concretizza l'intuizione del grande immunologo di Boston **Charles Janeway**: “sono le cellule dell'immunità innata a far partire la risposta dell'immunità specifica”. Si deve a **Steven Rosenberg**, del *National Cancer Institute*, la ricerca appassionata di una terapia immunologica per i tumori. L'idea dominante dello studioso è che il sistema immunitario umano è in grado di governare la malattia e sconfiggere il cancro. I suoi primi successi a livello clinico risalgono al 1984, anno in cui il trattamento con citochine (interleuchina-2) determina la regressione del primo caso di melanoma metastatico. Infatti l'illustre scienziato somministrando dosi elevate di interleuchina-2 alla paziente *Linda Taylor* otteneva, nei mesi successivi, la regressione delle lesioni tumorali che divenivano sempre più piccole e meno numerose fino alla loro scomparsa. La Taylor, con oltre trenta anni di vita vissuta dopo la

fase acuta, è considerata la paziente “zero” di tutta l’immunoncologia. La cura a base di Interleuchina-2 tuttavia risulta molto tossica e scarsamente riproducibile. Alla fine degli anni ‘80 lo studioso **Ronald Schwarz** osserva che il complesso antigene tumorale-linfocita da solo non riesce ad attivare il sistema immunitario: per ottenere una reazione completa è necessario che siano presenti sostanze stimolatorie/costimolatorie. Il motivo per cui il sistema immunitario non riconosce le cellule neoplastiche è da ricercare nell’incapacità di produrre queste sostanze o avvertirne la presenza.

L’anno 1987 rappresenta una tappa importante per il progresso dell’immunoncologia. Alcuni ricercatori francesi guidati da **Pierre Golstein** del laboratorio di immunologia di Marsiglia-Luminy scoprono infatti la **proteina CTLA-4** (*Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen-4* = Antigene 4 dei linfociti T citotossici). Questa molecola è localizzata sulla membrana dei linfociti T nella fase di quiescenza mentre trasloca quando i linfociti si attivano per combattere ed eliminare agenti estranei all’organismo. Si deve all’immunologo **James P. Allison**, del *Memorial Center (New York)* e successivamente dell’*Anderson Cancer Center (Houston)*, la scoperta dei meccanismi che regolano le risposte immunitarie dei linfociti T e, in modo particolare, la scoperta che CTLA-4 è una molecola regolatoria negativa, un freno (*checkpoint*) del sistema immunitario che è presente sulla superficie dei linfociti T ed è in grado di inibirne l’azione quando si unisce con lo specifico ligando B7 (presente anche sulla superficie delle cellule neoplastiche). Questa proteina infatti blocca i linfociti T quando sono attivati impedendo che reagiscano indefinitamente evitando in tal modo fenomeni di autoimmunità. Nei tumori la molecola CTLA-4 si lega alla proteina B7 che è sovraespressa in numerose neoplasie. A seguito della formazione dei complessi CTLA-4 - B7 si ha l’inibizione della proliferazione dei linfociti T ed il blocco della loro attività nei confronti delle cellule tumorali. Dalle ricerche di *Allison* e del suo gruppo di lavoro deriva la scoperta che negli esseri umani il blocco di CTLA-4 con anticorpi monoclonali selettivi determina regressione tumorale per riattivazione dei linfociti T. Il blocco del *checkpoint* immunitario diventa quindi un bersaglio ideale e un approccio innovativo nella cura dei tumori. Togliendo il freno CTLA-4 i linfociti sono in grado di riprendere la loro attività in modo particolare nei confronti di tumori aggressivi e metastatici (melanoma, carcinoma polmonare non a piccole cellule ed altre neoplasie).

È questo il vero inizio della immunoterapia oncologica!

Per una possibile applicazione della scoperta nella pratica clinica è tuttavia necessario disporre di una grande quantità di anticorpi. Il biochimico inglese **Greg Winter**, del *Medical Research Council*, è in grado di risolvere il problema relativo alla produzione di anticorpi monoclonali anti checkpoint. A questo proposito utilizza anticorpi ottenuti nei ratti e frammenti di anticorpi umani (anticorpi umanizzati) per renderli innocui al sistema immunitario in quanto vengono riconosciuti come self. Agli inizi degli anni '90 alcuni studiosi fra cui **Lloyd J. Old** e **Steven Rosenberg** dimostrano che i linfociti di un paziente con tumore, se isolati e posti a contatto, in vitro, con le cellule dello stesso tipo di tumore e quindi con i suoi antigeni, le riconoscono, reagiscono e le distruggono. Molti di questi antigeni sono comuni a neoplasie di tipo diverso e di differenti soggetti. È questa la dimostrazione lampante che il sistema immunitario reagisce nei confronti dei tumori. Di conseguenza vengono effettuati tentativi di stimolazione delle difese immunitarie somministrando frammenti e componenti di cellule tumorali. Tuttavia non mancano i fallimenti e lo scoraggiamento nei confronti dell'approccio immunologico al trattamento del cancro. Negli ultimi anni sono stati scoperti una decina di checkpoint diversi da CTLA-4 (il primo identificato) fra cui il sistema PD-1/PD-L1 e anticorpi monoclonali rivolti contro di essi che sono già in fase di avanzata sperimentazione clinica o già disponibili nell'armamentario terapeutico da utilizzare per la cura di alcuni tumori.

Il recettore di morte programmata PD-1 è stato scoperto nel 1992 da **Tasuku Honjo**, professore di immunologia alla *Kyoto University*. Questa proteina bersaglio, al pari di CTLA-4, è in grado di inibire l'attività delle cellule T. I suoi ligandi sono PD-L1 e PD-L2. PD-L1 può essere espresso sulle cellule tumorali e la sua presenza nel microambiente tumorale permette di selezionare i pazienti che possono fruire di una migliore risposta agli anticorpi inibitori di PD-1 e PD-L1. Negli anni successivi vengono ulteriormente chiariti i meccanismi dell'immunoterapia ed è possibile identificare le neoplasie che possono rispondere alle cure, le modalità di trattamento, gli effetti avversi, talora rilevanti, e le modalità di risposta alla terapia, che differiscono da quelle ottenibili con la chemioterapia. L'immunoterapia dà infatti risposte di tipo ritardato che possono impiegare anche alcuni mesi per manifestarsi. Anzi, talora, inizialmente, si verifica un incremento nella dimensione delle lesioni tumorali che fa pensare ad una mancata risposta al trattamento; si tratta però di

pseudoprogressione. Accanto a regressioni complete, ottenute anche dopo anni dall'inizio della terapia, e la cronicizzazione della malattia, è possibile la ripresa neoplastica. Questa può essere di nuovo bloccata impiegando differenti inibitori dei checkpoint in modo sequenziale, o in associazione fra loro o con altri presidi terapeutici. La possibilità di potenziare le cure immunoterapiche ricorrendo a terapie integrate fa ben sperare per il futuro della disciplina e la possibilità di utilizzare le conoscenze acquisite anche nel campo della prevenzione tumorale. Dal 2010 sono disponibili numerosi anticorpi monoclonali anti checkpoint da utilizzare in ambito oncologico. In Italia **Michele Maio** e la sua equipe portano avanti la ricerca e i trattamenti di immunoterapia oncologica. L'illustre oncologo è oggi Direttore del Centro di Immunoterapia Italiano che ha sede nel Policlinico Santa Maria alle Scotte di Siena. Dalla sua esperienza deriva un incoraggiamento all'impiego di farmaci immunoterapici nella cura di alcuni tumori aggressivi. A questo proposito riporta il caso di una paziente, *Rosa Maria*, colpita da un melanoma metastatico che, in circa 20 anni, ha sperimentato “sulla propria pelle” un vaccino immunoterapico, gli anticorpi anti CTLA-4 e successivamente l'anticorpo anti PD-1 *Nivolumab* ottenendo la regressione delle metastasi dopo una fase di ripresa della neoplasia seguita al trattamento con *Ipilimumab* (anticorpo anti CTLA-4). È questa la dimostrazione di come sia possibile ottenere una risposta favorevole passando da una cura immunologica all'altra in un lungo arco temporale. Dal 2004 il Dr. Maio ha dato vita al NIBIT (*Network Italiano per la Bioterapia dei Tumori*) divenuto oggi una Fondazione (www.fondazioneinibit.org) (Maio e Codignola. *Il corpo anticancro*. Ed. Piemme, 2017.). Nell'ambito del XV congresso internazionale del NIBIT del mese di ottobre 2017 è stato presentato CIO (*Centro di Immunoncologia*), il primo Centro in Europa interamente dedicato al trattamento dei tumori con l'immunoterapia, con sede a Siena. Fra le prospettive della ricerca futura esiste la possibilità di poter **riprogrammare le cellule tumorali** in modo da farle maturare e trasformare in macrofagi che possono combattere le cellule patologiche. È quanto emerge da esperimenti condotti su cellule leucemiche da un gruppo di ricercatori della *Stanford University* che descrivono la metodica e prospettano la possibilità che questo fenomeno, osservato in vitro, possa essere riprodotto in vivo e utilizzabile a scopo terapeutico (McClellan et al. *Reprogramming of primary human Philadelphia chromosome-positive B cell acute lymphoblastic leukemia cells (...)*. PNAS, 2015.).

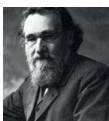
IMMUNONCOLOGIA E IMMUNOTERAPIA ONCOLOGICA: TAPPE RILEVANTI



Rudolf Virchow, nel 1863, dimostra per primo la presenza di un **infiltrato leucocitario nei tessuti tumorali** e ipotizza un **legame fra infiammazione e cancro**. È oggi dimostrato che l'infiammazione è una componente essenziale del cancro e facilita la sua crescita e proliferazione, in particolare ad opera dei macrofagi come osservato da **Alberto Mantovani**.



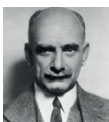
William B. Coley, nel 1891, riporta la guarigione di un voluminoso sarcoma a seguito di una iniezione di una miscela di streptococchi e tenta la cura di pazienti affetti da tumori utilizzando miscugli batterici noti come **“tossine di Coley”**. Lo scienziato, considerato ai suoi tempi un “ciarlatano”, è riconosciuto oggi come il padre dell'Immunoterapia.



Ilja Metchnikoff e Paul Ehrlich, agli inizi del 1900, dimostrano la capacità del nostro organismo di difendersi dalle malattie attraverso il sistema immunitario. Al biologo russo Metchnikoff si deve la **scoperta dei fagociti** (neutrofili, macrofagi, cellule dendritiche), **elementi cellulari dell'immunità innata**. **Paul Ehrlich** (fondatore della chemioterapia), nel 1900, sostiene che nel corpo umano sono presenti molecole (anticorpi) in grado di attaccare i tumori.



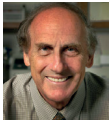
Frank Macfarlane Burnet e Lewis Thomas, nel 1957, formulano la teoria della **“immunosorveglianza”**, o delle **“tre E”** che si articola in tre fasi: *Elimination* (eliminazione da parte del sistema immunitario di cellule che si riproducono in maniera incontrollata), *Equilibrium* (il sistema immunitario mantiene ancora il controllo dei fenomeni), *Escape* (il tumore ha il sopravvento, blocca e sovverte le risposte immunitarie e crea un **microambiente infiammatorio** che concorre alla crescita neoplastica). Numerose evidenze hanno messo in discussione la teoria di Burnet e Thomas.



Christiane Nüsslein-Volhard, negli anni '70, identifica in un laboratorio tedesco i **Toll-like receptors (TLR)** recettori localizzati sulle cellule dell'immunità ed in particolare sulle cellule dendritiche.



Rolf Martin Zinkernagel, immunologo svizzero, ha scoperto negli anni '70 la modalità con cui il sistema immunitario distingue se stesso (cosiddetto *self*) attraverso il **complesso maggiore di istocompatibilità (MHC)** identificato dall'americano **Peter Gorer** negli anni '30.



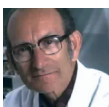
Ralph M. Steinman, immunologo della *Rockefeller University* (NY-NY), nel 1973 ha scoperto la **funzione delle cellule dendritiche**. Esse sono capaci di catturare e presentare gli antigeni e costituiscono un anello di congiunzione fra immunità innata e acquisita (linfociti).



Lloyd Old, negli anni '70, sviluppa l' **immunoterapia con BCG** (*Bacillo di Calmette-Guérin*) per i tumori della vescica. **Alvaro Morales** pubblica nel 1976 i primi risultati clinici favorevoli.



Ronald Herberman, al *National Institutes of Health* (Bethesda), e **Eva Klein**, in Svezia, a metà degli anni '70 scoprono i **linfociti Natural Killer (NK)** che sono in grado di uccidere naturalmente le cellule tumorali. Studi sulle cellule NK sono stati eseguiti anche dall'immunologo italiano **Lorenzo Moretta** che ha raggiunto risultati importanti nelle leucemie.



César Milstein e **George Köhler** nel 1975 scoprono gli **anticorpi monoclonali** (anticorpi prodotti da un singolo clone cellulare dotati di grande specificità e quindi diretti contro un unico bersaglio) che hanno permesso di migliorare l'attività diagnostica in medicina ed hanno trovato applicazione nella terapia delle malattie autoimmuni e nel cancro.



Steven Rosenberg nel 1984 sottopone, per la prima volta, una paziente affetta da melanoma metastatico alla terapia con **interleuchina-2** ed ottiene la regressione delle metastasi. Dalla fine degli anni '80 al 2000 l'interleuchina-2 e gli interferoni sono utilizzati in terapia.



James P. Allison, immunologo all'Anderson Cancer Center di Houston, dimostra che la **proteina CTLA-4** (antigene numero 4 dei linfociti T) scoperta nel 1987 da ricercatori francesi guidati da **Pierre Golstein**, è una molecola regolatoria negativa, un freno (*checkpoint*) del sistema immunitario. Essa è presente sulla superficie dei linfociti T ed è in grado di fermarne l'azione quando sono attivati. Nei tumori CTL-4 viene bloccata così che i linfociti T sono inibiti. Anticorpi monoclonali selettivi anti checkpoint sono tuttavia in grado di riattivare i linfociti T che possono esercitare un'azione antitumorale.



Tasuku Honjo, professore di immunologia alla Kyoto University, nel 1992 scopre il recettore di morte programmata PD-1. Questa proteina, al pari di CTLA-4, è in grado di inibire l'attività delle cellule T. I suoi ligandi PD-L1-PD-L2 possono essere espressi sulle cellule tumorali.

Negli anni più recenti sono stati prodotti anticorpi monoclonali rivolti contro i checkpoint ed i loro ligandi.



Greg Winter risolve il problema relativo alla **produzione, in grandi quantità, di anticorpi monoclonali umanizzati anti checkpoint**.

Anni
2009-2016

Nel **2009** è entrata in uso la **vaccinazione HPV** per la prevenzione del carcinoma della cervice uterina.

Nel **2010** la FDA (*Food and Drug Administration*) ha approvato l'impiego del **vaccino Sipuleucel-T** per il trattamento del carcinoma della prostata metastatico.

Nel **2011** è stato approvato **Ipilimumab** (anticorpo anti CTLA-4) per la cura del melanoma metastatico e nel **2014-2015** gli anticorpi anti-PD-1, **Nivolumab** e **Pembrolizumab**, per il trattamento di altre neoplasie in fase avanzata (polmone "non a piccole cellule", rene e urotelio). Sempre nel 2014 la FDA designa la **terapia CAR** (*Chimeric Antigen Receptor*) per le leucemie come fortemente innovativa e nel 2016-2017 approva anticorpi anti PD-L1 (**Durvalumab**, **Atezolizumab**, **Avelumab**) e la prima terapia genica per la leucemia linfoblastica acuta con il CAR-T **Tisagenlecleucel**.

The background of the slide is an abstract, marbled pattern in shades of blue and white. The pattern consists of intricate, swirling, and branching lines that resemble a microscopic view of tissue or a complex network. The colors range from deep navy blue to bright, almost white highlights, creating a dynamic and textured visual effect.

Le terapie immunoncologiche

Le terapie immunoncologiche

Numerose sono le modalità terapeutiche che utilizzano un approccio immunologico per la cura dei tumori. Esse comprendono: 1-gli inibitori dei checkpoint immunitari; 2-le terapie con anticorpi monoclonali; 3-le terapie con citochine; 4-i vaccini; 5-la terapia genica: CAR-T, TILs.

1-gli inibitori dei checkpoint immunitari

I checkpoint immunitari (CTLA-4, PD-1, etc.) sono molecole poste su cellule del sistema immunitario (linfociti T) che normalmente vengono attivate o disattivate per modulare la risposta immunitaria. Le cellule tumorali sono in grado di bloccare i checkpoint immunitari in tal modo eludono le cellule T del sistema immunitario. Gli inibitori dei checkpoint rappresentano oggi uno degli approcci più promettenti dell'immunoterapia oncologica. Essi sono anticorpi in grado di bloccare specifici checkpoint (CTLA-4, PD-1, etc.) e riattivare i linfociti in stato di quiescenza. Determinano azioni favorevoli nel melanoma, nel carcinoma polmonare non a piccole cellule, nei tumori del rene, dell'urotelio ed in altre neoplasie.

2-le terapie con anticorpi monoclonali

Anticorpi monoclonali sono sostanze prodotte in laboratorio dirette su specifiche molecole proteiche (recettori) presenti sulla superficie di cellule neoplastiche. Una volta avvenuto il legame degli anticorpi con i recettori delle cellule tumorali queste non risultano più in grado di proliferare ed il sistema immunitario è stimolato ad aggredirle. Anticorpi monoclonali possono bloccare l'attività di fattori di crescita tumorali quali EGF (*Epidermal Growth Factor*) o ancora anticorpi anti-Her2/Neu impiegati nel carcinoma della mammella. Possono anche inibire l'angiogenesi bloccando il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), etc. Fra gli anticorpi monoclonali rientrano farmaci quali **Bevacizumab**. È questo un anticorpo monoclonale umanizzato che si lega al fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF-A). È impiegato per il trattamento di numerose forme tumorali tra cui quelle del colon-retto, del polmone, del rene ed in alcune patologie oculari (proliferazione retinica dei diabetici). Ed ancora **Dinutuximab** che è un anticorpo monoclonale in sperimentazione nel neuroblastoma. Esso è diretto contro la proteina ganglioside GD2 posta sulle cellule tumorali. Sono allo studio anche anticorpi coniugati con farmaci citotossici che possono essere veicolati selettivamente contro le cellule tumorali riducendo in tal modo la tossicità per le cellule normali.

3-le terapie con citochine

Le citochine sono proteine che permettono la comunicazione all'interno del sistema immunitario e al di fuori di esso. Inoltre possono promuovere l'attivazione, la proliferazione e la sopravvivenza dei linfociti (T, B, NK) tanto da ottenere una risposta antitumorale. La moderna tecnologia è oggi in grado di attivare o frenare queste molecole proteiche. Rientrano in questo gruppo le interleuchine, gli interferoni, le chemochine.

Le **Interleuchine (IL)** finora scoperte sono numerate da 1 a 36.

L'**interleuchina-1 (IL-1)** è la prima citochina scoperta negli anni '60 da *Charles Dinarello*. Essa è prodotta per la difesa dell'organismo da infezioni batteriche ed è attiva nella risposta infiammatoria insieme ad altre citochine. Oltre ad IL-1 è stata individuata una sua antagonista recettoriale, cioè una molecola simile ad IL-1 (falso recettore o recettore *decoy*), che può attaccarsi al recettore di questa citochina impedendone l'attivazione. È questa la modalità con cui l'organismo utilizza falsi recettori per bloccare la risposta infiammatoria. Studi successivi hanno dimostrato che il blocco dell' IL-1 rappresenta un freno all' infiammazione causata dal sistema immunitario tanto che antagonisti dell' IL-1 sono impiegati nella terapia delle artriti e del mieloma multiplo.

L'**interleuchina-2** è la prima citochina utilizzata a scopo terapeutico, come singolo trattamento, o in combinazione con la chemioterapia, o con altre citochine come l'interferone-alfa. È stata impiegata per il trattamento del carcinoma renale e per il melanoma metastatico. Gli effetti tossici manifestati con questa terapia ne hanno tuttavia limitato l'impiego clinico. Anche altre interleuchine (IL-7, IL-12, IL-21) sono allo studio per la terapia del cancro.

Gli **Interferoni** sono proteine prodotte da tutte le cellule dell'organismo , ma in particolar modo dai leucociti e fra questi dalle cellule dendritiche plasmacitoidi che hanno un aspetto simile alle plasmacellule. Sono state identificate nel 1957 dal virologo *Alick Isaacs* e dal fisico *Jean Lindenmann*. Sono molecole prodotte dall'organismo per combattere i virus, ma possono avere anche attività antitumorale e la capacità di stimolare il sistema immunitario, in quanto attivano i macrofagi e i leucociti NK. Gli interferoni fino ad oggi scoperti sono numerosi. Fra questi gli interferoni alfa e beta (di tipo 1) sono prodotti dalle cellule stimulate

da un virus e conferiscono alle stesse capacità di resistenza.

L'interferone gamma di tipo 2 ha caratteristiche più di tipo immunologico ed è prodotto da linfociti T e da cellule natural killer. Stimola una reazione dell'organismo contro agenti infettivi e la crescita neoplastica. La scoperta dei geni responsabili della produzione di interferoni ha permesso di ottenere una notevole quantità di queste proteine da utilizzare nelle infezioni virali (epatite B e C), nella cura di alcuni tumori e per stimolare il sistema immunitario in condizioni di immunodeficienza congenita.

L'*interferone-alfa* è stato impiegato per il trattamento di neoplasie ematologiche, per il carcinoma renale ed il melanoma. Recentemente è stato scoperto che gli interferoni non hanno solo azione protettiva, ma possono anche essere causa di quadri patologici e sostenere manifestazioni di autoimmunità.

Interleuchina-2 e interferone, pur essendosi dimostrati utili in passato contro alcune forme di cancro, oggi, grazie allo sviluppo di trattamenti più efficaci e con minori effetti indesiderati, sono riservati solo a casi particolari.

4-i vaccini

Si distinguono vaccini che hanno lo scopo di **prevenire il cancro** e vaccini utilizzati per il **trattamento del cancro**.

I vaccini profilattici al pari dei vaccini tradizionali proteggono l'organismo da infezioni virali che possono causare il cancro. Attualmente sono disponibili due vaccini preventivi preparati contro virus responsabili dello sviluppo di forme tumorali e cioè il virus HPV (*Human Papilloma Virus*) causa di condilomi, del carcinoma della cervice uterina, del carcinoma anale, di alcune neoplasie della testa e del collo ed ancora il virus dell'epatite B (HBV) che causa il tumore al fegato. Il vaccino anti HPV è offerto alle ragazze in età prepuberale, ma è raccomandato anche ai maschi sia per la protezione indiretta delle donne non vaccinate, sia per la prevenzione di tumori della testa e del collo. Il vaccino per il virus dell'epatite B è un vaccino basato sulle tecniche del DNA ricombinante e quindi sicuro e facilmente riproducibile. L'introduzione di questo vaccino ha portato ad una drastica riduzione dei casi di epatite B.

I vaccini terapeutici sono medicinali che una volta somministrati al paziente affetto da neoplasia stimolano il sistema immunitario ad attaccare le cellule tumorali. I vaccini possono essere costituiti da cellule neoplastiche, parti di cellule, o da cellule immunitarie trattate.

I **vaccini a cellule intere** utilizzano cellule prelevate durante l'asportazione di un tumore (cellule autologhe), o provenienti da un altro paziente (cellule allogeniche), che vengono somministrate dopo essere state modificate in laboratorio.

I **vaccini ad antigeni** sono costituiti da una o più proteine di un determinato tumore (antigeni) capaci di stimolare una risposta immunitaria. Questi vaccini sono utilizzabili in tutti i pazienti che presentano una determinata patologia neoplastica, a differenza dei vaccini a cellule intere.

I **vaccini a cellule dendritiche**. Fa parte di questo gruppo *Sipuleucel-T*, un vaccino che è stato utilizzato per il trattamento del carcinoma della prostata avanzato e ormonorefrattario. Il vaccino è preparato sottoponendo il sangue del paziente a leucaferesi e raccogliendo cellule immunitarie che vengono esposte ad una proteina allo scopo di stimolarle e direzionarle contro le cellule neoplastiche. Dopo questa esposizione le cellule immunitarie attivate sono somministrate per via endovenosa allo stesso paziente. I componenti attivi di *Sipuleucel-T* sono quindi rappresentati da cellule autologhe che presentano un antigene del tumore (APC) che vengono incubate con la proteina denominata PAP-GM-CSF. Questa proteina è costituita da fosfatasi acida prostatica (PAP), espressa nel tessuto tumorale, legata allo stimolatore GM-CSF che è un attivatore delle cellule immunitarie. Il vaccino, approvato dalla FDA nel 2010, non ha tuttavia dato i risultati inizialmente sperati. Una rivalutazione di questo vaccino si è avuta nel 2017 nel corso dell'incontro annuale dell'*American Urologic Association*: in tale circostanza sono stati presentati i risultati di uno studio condotto su pazienti con carcinoma della prostata metastatico e resistente alla castrazione. I dati ottenuti dimostrano un aumento di sopravvivenza in soggetti afro-americani rispetto ai pazienti di origine caucasica. La differenza nell'efficacia terapeutica dipenderebbe dal fatto che i soggetti afro-americani, che sappiamo avere una più elevata incidenza e mortalità per cancro della prostata, hanno un maggior numero di cellule T e, quindi, darebbero luogo ad una risposta immunitaria più efficace.

Fa parte dei vaccini terapeutici il **vaccino antitubercolare BCG** (*Bacillo di Calmette-Guérin*) che è costituito da batteri (*Mycobacterium tuberculosis*) vivi attenuati. Questo vaccino è attualmente utilizzato nella terapia endovesicale delle ricorrenze del cancro della vescica di alto grado e nel carcinoma in situ. Il BCG è infatti in grado di stimolare le difese immunitarie

contro questa neoplasia, perchè il sistema immunitario risponde in genere contro il bacillo tubercolare che si nasconde proprio all'interno delle cellule dell'immunità ed in particolare nei macrofagi. L'impiego del BCG per il trattamento del carcinoma vescicale non muscolo invasivo ad alto rischio dà risposte complete nell'83% dei casi. La cistectomia radicale rappresenta lo standard di trattamento in caso di fallimento (*Dalbagni G. MSKCC, 2014*).

I **vaccini a virus oncolitici** sono costituiti da virus idonei a veicolare nel tumore composti che possono indurre una risposta immunitaria contro le cellule neoplastiche. È il caso del T-VEC che è un virus della famiglia degli herpes virus modificato per sintetizzare un fattore di crescita: il GM-CSF. T-VEC è quindi costituito da un virus oncolitico che iniettato direttamente nelle lesioni tumorali che non possono essere asportate chirurgicamente infetta le cellule neoplastiche e rilascia il GM-CSF. In tal modo le cellule tumorali vengono distrutte e liberano molte proteine che funzionano da richiamo per i linfociti. T-Vec è stato approvato nel 2015 per il trattamento del melanoma in stadio iniziale.

Lo studio dei vaccini terapeutici contro il cancro è in notevole fermento. Oggetto delle attuali ricerche è lo sviluppo di preparati basati sulla identificazione di neoantigeni presenti sulle cellule tumorali e sull'attivazione di cellule dendritiche in grado di scatenare o riattivare la risposta immunitaria (*Mantovani A. Immunità e vaccini. Ed. Mondadori, 2016*).

5-la terapia genica: i CAR-T (Chimeric Antigen Receptor-T) e i TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes)

Le moderne tecnologie permettono di isolare e prelevare cellule immunitarie (cellule dendritiche, cellule T ed NK) dal sangue o da infiltrati tumorali di un paziente, modificarle geneticamente con l'aggiunta o la rimozione di frammenti di geni, espanderle in coltura con fattori di crescita e reinocularle nello stesso paziente per utilizzarle come armi terapeutiche. In questo contesto rientrano la terapia con CAR-T ed i TILs.

a) CAR-T: la terapia con **CAR-T** è basata sull'impiego clinico di linfociti T provenienti da un donatore e modificati geneticamente in laboratorio (resi dunque "chimerici") in modo da esprimere recettori capaci di riconoscere e attaccare selettivamente antigeni espressi sulla superficie delle cellule tumorali. I linfociti così modificati, fatti moltiplicare in laboratorio, e somministrati per infusione ai pazienti, aumentano la capacità di eliminazione delle cellule tumorali. Sono in corso sperimentazioni con CAR-T nei tumori ematologici (leucemia

linfoblastica acuta, leucemia linfocitica cronica, linfoma N.H.) e nei tumori solidi quali il carcinoma del pancreas. Numerosi studi su cellule CAR-T hanno per target l'antigene CD19 che è espresso sulla superficie delle cellule tumorali delle leucemie a cellule B. Un esempio è offerto dalla proteina chimerica ***tisagenlecleucel*** per il trattamento della leucemia linfoblastica acuta a cellule B. Essa è costituita da una porzione extracellulare rappresentata da un frammento di anticorpo anti-CD19 ed una porzione intracellulare che esprime il segnale T ed un costimolatore.

Il dominio intracellulare svolge un ruolo importante nell'attivazione e nell'attività antitumorale di *tisagenlecleucel*. Per l'impiego clinico di queste terapie è necessario considerare, accanto agli aspetti tecnici ed alla sicurezza delle procedure, l'efficacia, la durata dei possibili effetti favorevoli, l'insorgenza di resistenza alla terapia, la tossicità ed il rischio di reazioni immunitarie talora gravi quali la "tempesta citochinica" che può presentarsi in corso di trattamento. Sono anche da considerare gli enormi costi da affrontare per ogni trattamento. Gli studi sui CAR-T sono in corso in molti centri internazionali. Un progetto europeo denominato EURE-CART in cui è coinvolto l'Istituto San Raffaele di Milano prevede l'arruolamento di pazienti con leucemia mieloide acuta o con un mieloma multiplo ed il loro trattamento con una CAR-T diretta contro la proteina CD44v6.

b) TILs Sono cellule T che vengono prelevate direttamente nei siti tumorali dei pazienti con tumore maligno trattate in laboratorio con interleuchina-2 e somministrate poi nello stesso paziente in modo da esercitare l'azione terapeutica.

Trials clinici che sfruttano cellule TIL sono allo studio in soggetti con melanoma, cancro del rene e dell'ovaio.

La scelta della terapia immunoncologica

Fra le terapie immunologiche a disposizione, gli inibitori dei checkpoint immunitari hanno suscitato un notevole interesse per i favorevoli risultati ottenuti in alcuni tumori in stadio avanzato. Prima di iniziare la terapia deve essere studiato il profilo genetico del tumore allo scopo di valutare il migliore approccio terapeutico e personalizzare le cure. A questo proposito la biopsia liquida è fondamentale per lo studio dinamico delle mutazioni cellulari nel tempo. Per la scelta terapeutica essa può variare, a seconda dei casi, utilizzando, ad esempio, gli inibitori dei checkpoint come unico presidio, o in combinazione con la chemioterapia, la radioterapia, i composti adiuvanti.

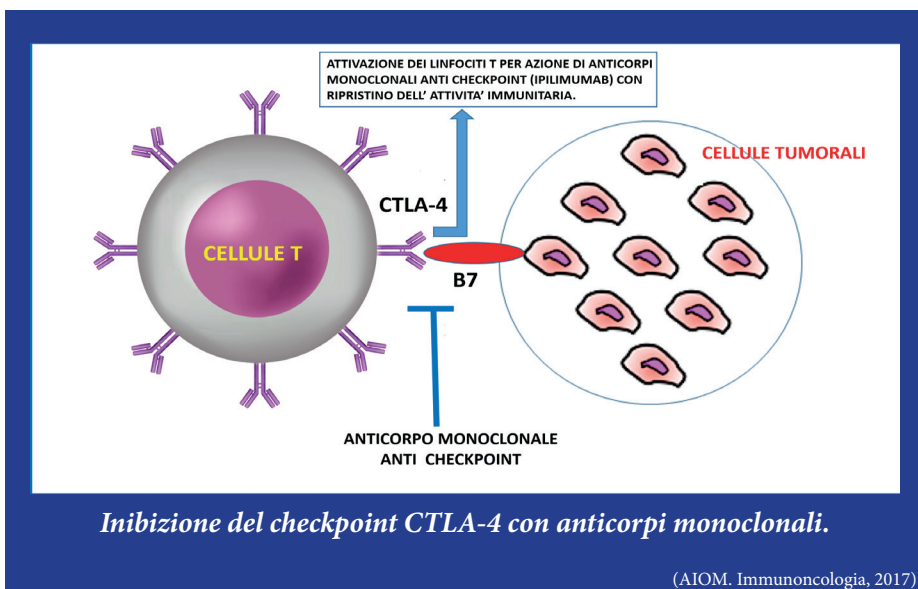
Gli Inibitori dei Checkpoint Immunitari

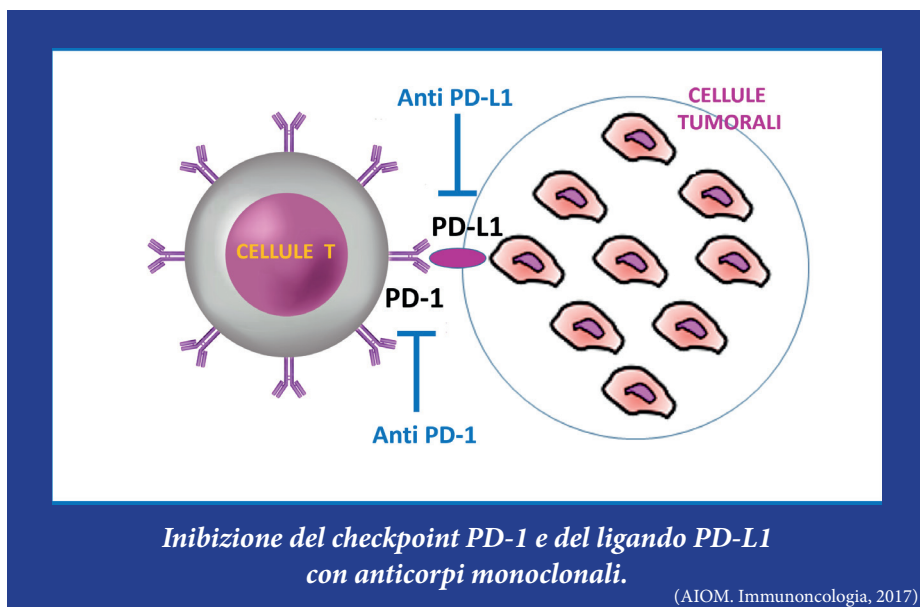
I **checkpoint immunitari** sono molecole regolatorie del sistema immunitario che inibiscono le cellule T dell'immunità acquisita.

Così facendo esercitano un'azione di freno ed impediscono ai linfociti T di rimanere attivi a dismisura; in tal modo prevengono risposte autoimmuni che potrebbero portare a gravi conseguenze fino addirittura alla morte per una reazione immunologica spropositata.

Le cellule tumorali possono non essere riconosciute dal sistema immunitario a causa di vari fattori fra cui l'espressione dei *checkpoint* sui linfociti T citotossici. I primi checkpoint ad essere stati scoperti sono i recettori di membrana **CTLA-4** (*Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen - 4*) e **PD-1** (*Programmed Death -1*).

CTLA-4 è un regolatore negativo dei linfociti T presente quando essi sono attivati. Anche PD-1 è un regolatore negativo espresso sulla membrana delle cellule T attivate e su altri elementi del sistema immunitario fra cui le cellule B e le Natural Killer, tanto che il suo blocco può influenzare la funzione di queste cellule. CTLA-4 e PD-1 si legano a ligandi rappresentati rispettivamente dalla proteina B7 e da PD-L1/PD-L2 (*Programmed Death Ligand-1, 2*). Questi ultimi possono essere espressi in numerose cellule immunitarie e non, ma si trovano altamente espressi anche in neoplasie aggressive che in questo modo possono evadere l'attacco del sistema immunitario.





Il recettore CTLA-4 è stato il primo checkpoint immunitario ad essere utilizzato come target terapeutico. CTLA-4, una volta avvenuta l'attivazione delle cellule T, risulta iperegolato sulla membrana plasmatica dove blocca la funzione dei linfociti attraverso una varietà di meccanismi inclusa l'interazione del ligando B7 (espresso sulle cellule APC nei linfonodi e nella milza) con la proteina di costimolazione CD28 espressa dai linfociti T. Invece il checkpoint immunitario PD-1, espresso sulle cellule T, interagisce con i ligandi PD-L1 e PD-L2 espressi primariamente nei tessuti infiammatori e nel microambiente tumorale.

Il ligando PD-L1 è espresso sui leucociti, su cellule non appartenenti al sistema ematopoietico e può essere indotto su cellule parenchimali da citochine infiammatorie o da vie di segnale tumorali.

L'espressione PD-L1 si ritrova anche associata con un incremento di linfociti infiltranti i tessuti neoplastici (TILs).

Il ligando PD-L2 è principalmente espresso sulle cellule dendritiche e sui monociti e può essere indotto da cellule immunitarie e non (*Postow et al. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. J Clin Oncol, 2015; Buchbinder e Desai. CTLA-4 and PD-1 pathways. American J Clin Oncol, 2016.*).

La produzione di **anticorpi monoclonali anti CTLA-4 e anti PD-1**, inibitori dei checkpoint, ha aperto nuove prospettive nella cura di alcuni tumori. Tali anticorpi permettono infatti la riattivazione dei linfociti che, una volta

La regolazione delle cellule T ed il Blocco dei Checkpoint immunitari

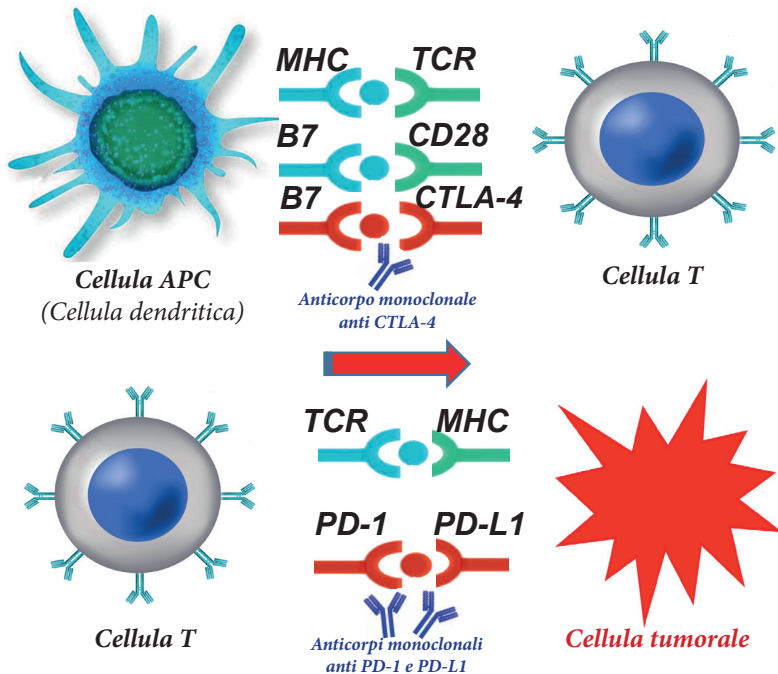
Uno dei meccanismi principali con cui l'organismo si difende da agenti estranei e quindi anche da neoantigeni derivanti dalle cellule neoplastiche fa capo alle cellule T citotossiche CD8. Tali cellule per espletare la loro azione devono essere attivate ma, una volta esaurito il loro compito, devono essere disattivate per non incorrere in effetti avversi e reazioni autoimmuni. L'attivazione/inibizione dei linfociti T consente all'organismo di esercitare le normali attività di difesa. Nei tumori le cellule neoplastiche sfruttano meccanismi inibitori delle cellule T per bloccarne l'attività. La scoperta di questi meccanismi ha permesso di utilizzare anticorpi monoclonali, inibitori dei checkpoint immunitari, per riattivare le cellule T che, in tal modo, possono esercitare nuovamente la loro azione.

Attivazione delle cellule T (meccanismi)

L'attivazione delle cellule T richiede due segnali: il legame del recettore TCR con il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) sulle cellule che presentano l'antigene (APC) ed il legame fra la proteina di membrana CD28 ed il recettore B7 (molecola costimolatoria). Quando si realizza questo meccanismo i linfociti T si attivano.

I checkpoint immunitari (CTLA-4, PD-1) rappresentano un freno all'attivazione di tali cellule. Se il recettore inibitore CTLA-4 è occupato dalla proteina B7 si blocca l'attivazione dei linfociti T; tale interazione (CTLA-4 - B7) avviene primariamente a livello dei linfonodi. Anche il recettore inibitore PD-1, espresso dalle cellule T durante l'esposizione agli antigeni, regola negativamente tali cellule inattivandole quando si lega ai ligandi PD-L1/PD-L2 espressi primariamente nei tessuti in preda ad infiammazione e nel microambiente tumorale.

Il blocco dei checkpoint (CTLA-4, PD-1) e del ligando PD-L1 con anticorpi monoclonali riattiva le cellule T che, in tal modo, possono esercitare l'azione antitumorale.



liberati dal blocco inibitorio, riacquistano la capacità di reagire anche contro le cellule neoplastiche che così possono essere attaccate ed eliminate. Numerosi altri checkpoint immunitari sono stati scoperti fino ad oggi e anticorpi inibitori degli stessi sono in fase di studio o già disponibili per impieghi clinici nell'armamentario terapeutico immunoncologico. Tali anticorpi altamente specifici hanno dimostrato azioni favorevoli in tumori resistenti e metastatici. Sono disponibili anche anticorpi anti PD-L1 incluso BMS-936559 attualmente utilizzati in trials clinici.

Anticorpi monoclonali immunomodulanti inibitori dei checkpoint

Anticorpi anti CTLA-4 e anti PD-1

Ipilimumab: è il capostipite degli anticorpi monoclonali immunomodulanti entrato nell'uso terapeutico nel 2011. Il composto agisce sul recettore CTLA-4. Il blocco di questa molecola impedisce il legame B7-CTLA-4 cioè fra la proteina presente sulle cellule tumorali ed il checkpoint immunitario CTLA-4 presente sulla membrana dei linfociti T. In tal modo rimuove il segnale inibitore e riattiva la risposta immunitaria antitumorale. Ipilimumab è utilizzato nel melanoma metastatico, nel carcinoma renale, nel tumore polmonare. La combinazione di ipilimumab e nivolumab è efficace nel trattamento del carcinoma renale avanzato o metastatico in prima linea, ovvero in pazienti non trattati precedentemente (*Congresso Europeo di oncologia ESMO, 2017*). Ipilimumab può dare risultati favorevoli anche nel carcinoma prostatico metastatico (*Cabel et al. J ImmunoTherapy of cancer, 2017.*).

Nivolumab: è un anticorpo monoclonale che blocca la proteina PD-1. È impiegato nel melanoma e nel tumore polmonare (ca. squamoso e adenocarcinoma) non a piccole cellule. Nivolumab è attivo nel carcinoma renale a cellule chiare ed è efficace anche nei linfomi NH e in altre neoplasie. Nel 2017 la Commissione Europea ha approvato questo anticorpo per il trattamento di carcinomi vescicali localmente avanzati e non resecabili o per carcinomi uroteliali metastatici che non hanno risposto alla chemioterapia con derivati del platino. Nivolumab è stato studiato estensivamente ed ha dimostrato un'attività decisamente superiore agli inibitori del checkpoint CTLA-4. Dopo un anno di terapia con Nivolumab in media è in vita il 60-70% dei pazienti e le risposte cliniche ed il tempo a progressione risultano superiori.

Pembrolizumab: è un anticorpo monoclonale anti PD-1 che è impiegato per il trattamento dei pazienti affetti da melanoma avanzato e, in monoterapia, nel trattamento di prima linea del carcinoma polmonare non a piccole cellule metastatico il cui tumore esprime PD-L1. Inoltre è in sperimentazione nel mesotelioma.

Pidilizumab: è un anticorpo anti PD-1 in sperimentazione per il cancro del rene e per neoplasie ematologiche.

Tremelimumab: è un anticorpo monoclonale anti CTLA-4. È in sperimentazione nel mesotelioma anche in associazione con Durvalumab.

Anticorpi anti PD-L1

Durvalumab: è stato il primo anticorpo anti PD-L1. È impiegato nel melanoma metastatico, nei tumori della testa e del collo, stomaco, pancreas, fegato, in neoplasie ematologiche e polmonari. Inoltre è utilizzato in pazienti pediatrici affetti da tumori solidi, del sistema nervoso e nei linfomi.

Atezolizumab: anticorpo anti PD-L1. È stato impiegato nel carcinoma polmonare non a piccole cellule e nei carcinomi vescicali in progressione dopo chemioterapia.

Avelumab: anticorpo anti PD-L1. Nel 2017 Avelumab e Durvalumab sono stati approvati dall'FDA rispettivamente per il carcinoma di Merkel (tumore maligno aggressivo della pelle) e per il carcinoma della vescica avanzato.

Recentemente è stata identificata e studiata la proteina CD-38 che è riconosciuta come un nuovo checkpoint immunitario che agisce con un meccanismo di resistenza nel blocco dell'asse PD-1/PD-L1. Colpire CD-38 può indurre un effetto favorevole nel trattamento del carcinoma polmonare non a piccole cellule in cui la proteina è iperegolata (*Chen et al. CD38 as a novel immune checkpoint and a mechanism of resistance to the blockade of the PD-1/PD-L1 axis. ASCO, 2017.*). CD-38 è presente in grande quantità anche sulle cellule del mieloma multiplo. La sua inibizione con l'anticorpo monoclonale **Daratumab** stimola il sistema immunitario a distruggere le cellule tumorali.

Gli **inibitori dei checkpoint** rappresentano sicuramente uno degli approcci più promettenti dell'immunoterapia. Differenti inibitori possono essere somministrati in associazione fra loro potenzialmente sinergica. Tra queste la combinazione anti PD-1/PD-L1 e anti CTLA-4/B7. Risulta anche possibile la somministrazione degli inibitori in modo sequenziale alternando, ad esempio, gli inibitori di CTLA-4 e di PD-1 nella prospettiva di una migliore risposta terapeutica ma con il possibile rischio di effetti avversi di grado maggiore (*Lee et al. Molecular mechanism of PD-1/PD-L1 blockade via anti PD-L1 antibodies (...).Scientific Reports, 2017.*). Gli inibitori possono anche essere associati ad altri composti terapeutici (chemioterapia, terapie target, cortisonici, fitocomposti, etc.) e alla radioterapia. Il trattamento con questi composti pone ulteriori problemi che riguardano la scelta del tipo di inibitori da impiegare, le dosi da somministrare, gli intervalli temporali delle somministrazioni ed i cicli terapeutici utili per ottenere una risposta soddisfacente; solo l'esperienza clinica potrà fornire risposte adeguate.

Le risposte al trattamento con inibitori dei checkpoint

Numerose sono le variabili da considerare nella terapia dei tumori quando vengono impiegati gli inibitori dei checkpoint:

- a) *la differente risposta terapeutica ai diversi inibitori dei checkpoint;*
- b) *il blocco contemporaneo o sequenziale di due diversi checkpoint;*
- c) *la differente risposta clinica e le risposte superiori alle attese (gli “exceptional responders”);*
- d) *le risposte al trattamento in rapporto all'età;*
- e) *i risultati favorevoli anche per neoplasie resistenti ai trattamenti tradizionali e con localizzazioni metastatiche;*
- f) *le possibilità di potenziamento dell'immunoterapia.*

La differente risposta terapeutica ai diversi inibitori dei checkpoint

Ogni paziente può essere sensibile ad un inibitore e non ad un altro; ciò può accadere con due diversi inibitori di checkpoint che agiscono su due diversi bersagli molecolari. Se il paziente diventa insensibile ad un inibitore può essere trattato con un diverso inibitore con possibili risultati favorevoli. Quindi per i pazienti si prospetta una sorta di “nomadismo terapeutico” passando di terapia in terapia. La sfida per il futuro è di riuscire ad identificare il miglior trattamento possibile prima di intraprenderlo per ottenere la massima efficacia. È questo un compito arduo dal momento che due sono gli attori in gioco e cioè il sistema immunitario del paziente nella sua complessità e la variabilità genetica del tumore, diversa in ogni paziente e nelle differenti fasi della malattia. A questo proposito rivestono un notevole interesse gli studi della genetista *Alexandra Snyder* del *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (NY-NY). La studiosa ha identificato nei melanomi un insieme di geni mutati che possono dar luogo a numerose proteine presenti soltanto sulle cellule tumorali. È stato osservato che maggiore è la variabilità genetica della neoplasia, maggiore è la possibilità che questa venga riconosciuta come agente estraneo dal sistema immunitario, maggiore sarà anche la risposta alla terapia. Questo criterio, in assenza di altri indicatori, può essere utilizzato per identificare i soggetti potenzialmente sensibili all'immunoterapia. Il sistema immunitario infatti risulta più efficiente quanto maggiore è il numero delle proteine estranee espresse dal tumore derivanti dalla sua instabilità genetica. In un singolo tumore le mutazioni genetiche possono essere anche migliaia (oltre 15-17 mila) a differenza di altre patologie in cui sono solo poche decine.

Per queste proteine anomale, tipicamente tumorali, è stato coniato il termine di “neoantigeni”. Tali molecole sono espresse precocemente da tutte le cellule tumorali e spesso sono specifiche per ciascun paziente tanto da risultare potenziali bersagli dell’immunoterapia. Si definiscono in tal modo scenari diversi che differiscono nelle varie neoplasie che, di conseguenza, rispondono in maniera diversa all’immunoterapia. Ecco perchè il melanoma ed i tumori del polmone metastatici rispondono in misura maggiore all’immunoterapia rispetto, per esempio, al carcinoma della mammella. Quest’ultimo infatti è geneticamente più stabile a differenza dei primi che presentano un *landscape* molto frastagliato con alta instabilità genetica. Neoantigeni tumorali sono utili marcatori in grado di predire la sensibilità del tumore alla terapia con anti checkpoint; da essi è possibile ottenere linfociti specializzati da utilizzare contro la neoplasia. Ne deriva l’importanza dell’esecuzione di test genomici per identificare i pazienti che possono rispondere favorevolmente all’immunoterapia. Le attuali tecniche di sequenziamento del genoma tumorale che rendono disponibili risultati in poche ore rappresentano un importante supporto per la selezione dei candidati alle nuove cure.

Il blocco contemporaneo o sequenziale di due diversi checkpoint

Il blocco contemporaneo di due diversi checkpoint è in grado di potenziare l’effetto terapeutico: è quanto è stato osservato nel melanoma e nei tumori polmonari. All’aumento dell’efficacia può tuttavia corrispondere un incremento della tossicità. Risulta anche possibile trattare i pazienti con differenti inibitori dei checkpoint con modalità sequenziale con risultati favorevoli.

La differente risposta clinica e le risposte superiori alle attese (gli “exceptional responders”)

I pazienti trattati con immunoterapici possono ottenere la regressione completa della neoplasia ma dopo un certo periodo di tempo (anche anni) possono diventare insensibili forse perchè non sviluppano un’immunità permanente verso il tumore o perchè questa può modificarsi nel tempo.

Alcuni soggetti possono dimostrare risposte terapeutiche superiori alle attese (*exceptional responders*). Si tratta di individui senza alcuna speranza che con queste terapie ottengono risposte spettacolari sino alla guarigione (“*effetto Lazzaro*”), o alla stabilizzazione.

Le risposte al trattamento in rapporto all'età

L'immunoterapia può dare **risultati favorevoli anche nell'infanzia ed in soggetti in età avanzata** (oltre i 90 anni) nei quali si può assistere ad una risposta completa con regressione delle metastasi ed una tossicità non dissimile dai soggetti adulti. Risposte favorevoli sono state osservate in alcuni tumori cerebrali dei bambini, nei tumori del polmone e nei melanomi in soggetti molto anziani (ultranovantenni) sottoposti a trattamento con inibitori dei checkpoint anti PD-1.

I risultati favorevoli anche per neoplasie resistenti ai trattamenti tradizionali e con localizzazioni metastatiche

L'immunoterapia può dare risposte favorevoli nelle metastasi cerebrali tanto più quando è associata a chemioterapici che superano, almeno in parte, la barriera ematoencefalica quali la *fotemustina*. Ciò avviene per attivazione della microglia cioè di cellule che sono i macrofagi del SNC. Risposte favorevoli sono state osservate con l'associazione *ipilimumab+fotemustina* nel melanoma con metastasi al cervello ed al fegato. Sperimentazioni cliniche con inibitori dei checkpoint sono in corso nel glioblastoma cerebrale e nel neuroblastoma.

Le possibilità di potenziamento dell'immunoterapia

- *l'efficacia degli inibitori dei checkpoint può essere potenziata sia con un pretrattamento con chemioterapici quali i derivati del platino e la ciclofosfamide, sia sfruttando l'energia dei raggi X.*

Ciò accade perchè il microambiente tumorale che si forma per azione del pretrattamento risulta più favorevole all'attività degli immunoterapici in quanto sviluppa una varietà genetica con molti neoantigeni di varia natura che attraggono i linfociti. Risulta quindi che neoplasie definite "fredde" e caratterizzate da poche mutazioni genetiche fondamentali possono diventare "calde" a seguito della liberazione di una molteplicità di neoantigeni come conseguenza della morte cellulare indotta dalla chemio e dalla radioterapia. Si sviluppa così un terreno favorevole ai linfociti che vengono da esso attratti e possono distruggere i tessuti patologici. L'associazione immunoterapia e radioterapia è attualmente un campo di ricerca in rapida espansione per il numero ed il tipo di trials clinici. Molti immunoterapici hanno dimostrato una buona risposta in associazione alla radioterapia e l'induzione di cellule T ma una serie di questioni rimangono aperte quali le dosi Rx più idonee, il loro frazionamento e la sequenza dei trattamenti

(Kang et al. *Journal of immunotherapy of cancer*, 2016.). È stato osservato anche che la radioterapia mirata associata con inibitori dei checkpoint come ipilimumab produce, in casi fortunati, una forte risposta immunitaria non solo locale ma anche generale (*effetto abscopal*=fuori del campo) e risultati clinici favorevoli con regressione di neoplasie quali il carcinoma polmonare non a piccole cellule metastatico ed altre neoplasie come il melanoma ed il cancro del rene (Golden et al. *Cancer Immunology Research*, 2013; Siva et al. *Cancer Lett*, 2015.).

- *l'efficacia degli inibitori dei checkpoint può essere potenziata utilizzando farmaci epigenetici* quali l'*azaticidina* (impiegata nelle leucemie) e la *guadecitabina*. Quest'ultima è in sperimentazione con ipilimumab nel melanoma metastatico (Maio, 2015). L'associazione si basa sul fatto che i farmaci epigenetici non agiscono soltanto sulla replicazione del DNA, ma anche sull'equilibrio fra sistema immunitario e cellula tumorale favorendo in tal modo i risultati della terapia immunologica.

- *l'immunoterapia viene potenziata dall'impiego di adiuvanti inibitori delle prostaglandine PGE2 e delle ciclossigenasi COX-2.*

È noto che le cellule di alcuni tumori (pelle, mammella, colon) esprimono PGE2 come conseguenza della crescita neoplastica e del microambiente infiammatorio che si genera. In animali da esperimento con melanoma o tumori del colon la contemporanea somministrazione di acido acetilsalicilico con un anti PD-1 determina regressione neoplastica di grado maggiore rispetto a quanto accade impiegando il solo immunoterapico. L'aspirina infatti blocca a monte la sintesi di prostaglandine E2 o PGE2 che sono molecole centrali nell'infiammazione.

Prendendo in considerazione i fitoterapici, è stato osservato in modelli sperimentali che la combinazione di curcumin (estratto dalla *Curcuma longa*), avente attività antinfiammatoria inibitrice del fattore di trascrizione NF-kB e delle ciclossigenasi COX-2, ed il contemporaneo blocco anti-PD-1/PD-L1 svolge attività antitumorale sinergica (Hayakawa et al. *J Immunotherapy of cancer*, 2014.).

Le proprietà protettive contro il cancro di composti antinfiammatori fanno intravedere il possibile utilizzo di una generale strategia antinfiammatoria che mira a colpire il microambiente tumorale nel quale le cellule neoplastiche proliferano magari arrestando l'attività dei macrofagi che sono presenti in grande quantità ed esercitano azione protumorale. Un esempio è offerto dalla scoperta della molecola *trabectedina*, derivante da

un mollusco marino del mar dei Caraibi. Questo composto, studiato dal farmacologo *Maurizio D'Incalci*, è un agente citotossico che interagisce con il DNA cellulare, ma è anche dotato di azioni contro i macrofagi TAM che popolano il microambiente tumorale e che sono responsabili della progressione neoplastica producendo fattori di crescita, lo sviluppo di nuovi vasi e la disseminazione del tumore (*Mantovani A. Immunità e vaccini. Ed. Mondadori, 2016.*),

Il futuro della ricerca è rivolto, da una parte, alla scoperta di nuovi composti antinfiammatori che, se ben tollerati, potrebbero essere somministrati a scopo preventivo, e dall'altra alla ricerca di composti rivolti a controllare la risposta immunitaria nel microambiente tumorale che anzichè svolgere un ruolo di difesa favorisce lo sviluppo e la progressione del cancro.

- *la composizione del microbioma è intimamente connessa con le risposte all'immunoterapia.*

Il rapporto fra microbioma e sistema immunitario è complesso e bidirezionale. Il microbioma è presente in ogni parte del corpo con una composizione diversa e specifica. Esso è oggetto di studio in numerosi campi della medicina. La maggior parte degli studi sul microbioma si è concentrata sui microrganismi che popolano l'intestino: il microbioma intestinale rappresenta il 99% di quello totale. La parte restante è fornita dal microbioma presente sulle mucose di tutto l'organismo. Studi condotti su modelli animali (topo) hanno messo in evidenza come il microbioma influenza le funzioni antitumorali del sistema immunitario e come attraverso la sua modulazione è possibile migliorare la risposta agli inibitori dei checkpoint immunitari (PD-1/PD-L1); è quello che dovranno dimostrare trials clinici in corso. In un recente studio dei ricercatori dell'*Anderson Cancer Center* (Texas), presentato a Orlando nel 2017 nell'ambito dell'*ASCO-SITC Clinical Immuno-Oncology Symposium*, è stato dimostrato che in pazienti affetti da melanoma in fase avanzata e in trattamento con inibitori del checkpoint immunitario PD-1 la risposta alla terapia si correla con un determinato microbioma intestinale e di particolari specie batteriche. I pazienti che hanno dimostrato una risposta favorevole al trattamento presentavano una maggior presenza di batteri *Clostridiales*. I *non responders*, al contrario, mostravano una maggior presenza di batteri *Bacteroidales*. Nei *responders* inoltre l'infiltrato immunitario dei campioni tumorali presentava una maggiore concentrazione di cellule CD8+, i linfociti anti-tumore, rispetto ai

pazienti che non avevano dimostrato una risposta alla terapia.

Il microbioma risulta fondamentale perché il sistema immunitario si sviluppi ed “impari” ad utilizzare in modo appropriato freni e acceleratori. È per questo motivo che una delle aree della ricerca immunologica è orientata a modificare le risposte immunitarie agendo su di esso. Alcune tecniche che possono modulare la sua composizione sono:

- a) l'impiego di pre o probiotici per potenziare alcuni tipi di batteri;
- b) la somministrazione di antibiotici per distruggere ceppi batterici in modo selettivo;
- c) il trapianto fecale: può essere utilizzato per ristabilire la composizione e la funzionalità del microbioma intestinale.

Affinchè si possa avere una flora batterica intestinale ottimale per la risposta all'immunoterapia tuttavia non basta la somministrazione di singoli componenti (ad esempio *bacteroides*) in quanto ciò che assicura l'effetto sul sistema immunitario è l'insieme della microflora.

- *l'attività fisica*

Essa modula le risposte del sistema immunitario ed esercita effetti favorevoli quando è di grado moderato ed è eseguita regolarmente.

Parametri di valutazione della risposta all'immunoterapia

Gli effetti delle cure immunoterapiche risultano diversi da quelli che si osservano con la chemioterapia. L'efficacia di questa è infatti valutata in base al tasso di risposta e cioè alla percentuale di pazienti in cui si osserva la riduzione del volume e del numero delle masse tumorali misurabili.

I trattamenti immunoncologici possono dar luogo ad una variabilità di risposte cliniche:

a) *pseudoprogressione*: in una bassa percentuale di casi (10-20%) è possibile osservare pseudoprogressione. Questa si può presentare per esempio con un incremento del volume dei linfonodi, la comparsa di lesioni polmonari, etc. Il fenomeno può essere dovuto alla temporanea inadeguatezza del sistema immunitario a riconoscere e neutralizzare le cellule neoplastiche. Un altro motivo può tuttavia essere rappresentato dall'infiltrazione del tumore da parte dei linfociti T finalmente in grado di agire. L'infiltrazione linfocitaria può determinare un aumento di volume delle lesioni tumorali o evidenziare lesioni che prima non erano visibili. Solo quando i linfociti hanno eliminato le cellule neoplastiche si assiste alla regressione volumetrica delle lesioni o alla loro totale scomparsa;

b) *periodo di latenza per avere un risultato*: talora sono necessari molti mesi per avere una risposta favorevole. L'intervallo è in genere calcolato fra 6 mesi e due anni;

c) *trasformazione della malattia in una patologia a carattere cronico*: l'immunoterapia può aumentare la sopravvivenza dei pazienti in un'alta percentuale di casi e trasformare la neoplasia in una malattia a carattere cronico;

d) *i non responders*: vi sono pazienti che non rispondono alle cure immunoterapiche. Si è ipotizzato fra l'altro che la mancata risposta sia legata al basso livello di antigenicità di alcuni tumori. Per ovviare a questo meccanismo sono allo studio tecniche di ingegneria genetica con l'introduzione di virus depotenziati nel DNA del tumore al fine di accrescerne il livello antigenico.

Interruzione della terapia: i risultati ottenibili con l'immunoterapia presentano un'ampia variabilità tanto che sono ancora in via di definizione i parametri da utilizzare per una valutazione oggettiva della risposta al trattamento. Individui trattati possono vivere anni con il proprio tumore avendo nello stesso tempo una buona qualità di vita. Solo quando la remissione neoplastica sembra duratura è possibile interrompere la terapia continuando a monitorare il paziente con controlli periodici.

Gli effetti avversi dell'immunoterapia

L'immunoterapia oncologica, determinando un incremento dei meccanismi di difesa dell'organismo, non è esente da effetti secondari che si manifestano a vari livelli ed in tempi diversi (*Postow M.A. Managing immune checkpoint-blocking antibody side effects. ASCO, 2015.*).

Gli effetti avversi differiscono, in parte, da quelli che si manifestano con la chemioterapia tradizionale che, non esercitando l'attività in modo selettivo, colpisce anche le cellule sane.

Si riconoscono effetti avversi precoci e tardivi.

Effetti avversi precoci

Il trattamento può provocare manifestazioni cutanee e mucose, astenia e anoressia, nausea, vomito e diarrea, reazioni allergiche, sintomatologia pseudoinfluenzale con febbre molto elevata. Talora è possibile avere grave diarrea che tuttavia è gestibile con alte dosi di cortisonici. Gli effetti avversi precoci dovuti a reazioni temporanee del sistema immunitario possono manifestarsi già alcune settimane dopo l'inizio della cura con anticorpi anti checkpoint e non immediatamente come accade con la chemioterapia.

Rash cutaneo e irritazioni delle mucose rappresentano le manifestazioni avverse più comuni che si presentano con gli inibitori dei checkpoint. All'incirca il 50% dei pazienti trattati con *ipilimumab* manifesta rash cutaneo (eritema, manifestazioni maculo-papulari) e/o prurito con localizzazioni al tronco ed alle estremità. Tali manifestazioni possono essere trattate con corticosteroidi per os, o per via sistemica, e con antistaminici.

Diarrea e colite sono le manifestazioni più frequenti nei pazienti che vengono trattati con inibitori di CTLA-4. In presenza di grave sintomatologia è necessario ricorrere ad idonea idratazione, somministrazione di elettroliti e all'impiego di corticosteroidi per via endovenosa. Solo molto raramente si può verificare perforazione intestinale.

Epatotossicità con incremento delle transaminasi e talora febbre può manifestarsi, in genere, dopo 8-12 settimane dall'inizio del trattamento con anticorpi anti checkpoint. Richiede il trattamento con corticosteroidi e talvolta con farmaci immunosoppressori.

Effetti avversi tardivi

Numerosi sono anche gli effetti tardivi dell'immunoterapia oncologica.

Essi comprendono:

a) **sindromi ematologiche**: leucopenia con neutropenia e quindi rischio di infezioni che richiedono un trattamento antibiotico e antivirale protratto, anemia, trombocitopenia;

b) **affezioni muscolo-scheletriche** con artralgie, artrite;

c) **endocrinopatie** prevalentemente rappresentate da infiammazione della ghiandola pituitaria (ipofisite) con riduzione dell'increzione ormonale di ormoni ipofisari e ipotiroidismo: esordiscono nel 10% dei pazienti trattati con anticorpi anti CTLA-4. Si può avere anche ipertiroidismo e crisi surrenalica con disidratazione, ipotensione, squilibrio elettrolitico.

d) **alterazioni meno frequenti** sono rappresentate da fenomeni infiammatori a carico dell'apparato respiratorio, infiammazioni oculari, secchezza della congiuntiva (sindrome di Sjögren), insufficienza renale, pancreatite, sindromi neurologiche, neuropatia periferica.

Infine può accadere che l'immunoterapia, pur manifestando effetti favorevoli, determini il rilascio di grandi quantità di citochine (*cytokine storm* = tempesta citochinica) prodotte dall'organismo con aumento della temperatura corporea, calo pressorio, sintomi di grave infiammazione talora letale.

Tossicità degli anti checkpoint

La tossicità degli anticorpi anti checkpoint è legata, come precedentemente detto, al peculiare meccanismo di azione di questi composti. Attivando il sistema immunitario manifestano la loro attività verso le cellule tumorali, ma determinano anche un quadro di ipereattività del sistema immunitario. Tali fenomeni sono spesso transitori e vengono definiti come "immunoreattività".

I pazienti devono essere informati di questa eventualità, in modo che possano cogliere immediatamente i sintomi appena si presentano, li possano comunicare ai medici che quindi attiveranno le terapie necessarie (corticosteroidi, inibitori del TNF-alfa, altri agenti immunosoppressori) e non si comprometta il risultato terapeutico.

La tossicità da anti checkpoint può essere talora rilevante: gli effetti avversi sono generalmente più importanti con Ipilimumab (anti CTL-4) e meno con Nivolumab e Pembrolizumab (anti PD-1).

I pazienti che sono costretti a sospendere l'immunoterapia a causa degli effetti secondari possono tuttavia godere per lungo tempo di una buona risposta al trattamento effettuato.

Acquisizioni recenti

Dopo il 2010 si è registrato un forte impulso alle emergenti cure immunoncologiche per tumori avanzati o di difficile trattamento. Nel **carcinoma polmonare non a piccole cellule** la maggior parte dei pazienti trattati con un singolo agente immunoterapico anti PD-1/PD-L1 non mostra benefici ed è necessario impiegare più immunoterapici data la notevole eterogeneità antigenica della neoplasia. In una recente pubblicazione sono riportati risultati favorevoli con l'impiego di nivolumab ed una risposta positiva nel 75% dei tumori del polmone con elevato tasso di mutazioni e positività di PD-L1. La risposta si riduce al 16% nei casi con minore percentuale di mutazioni e bassa positività di PD-L1 (*Carbone et al. N. Eng. J Med., 2017.*). Utilizzando l'associazione nivolumab-ipilimumab risulta un elevato tasso di risposte cliniche, attività duratura e buona tolleranza (*Antonia et al. Immunotherapy: beyond anti-PD-1 and anti PD-L1 therapies. ASCO, 2016; Antonia et al. Safety and efficacy of first line nivolumab and ipilimumab in advanced NSCLC. J Thorac Oncol, 2016.*). Nel **carcinoma renale** l'immunoterapia con anticorpi monoclonali ha permesso di migliorare i risultati ottenuti in passato con la terapia con citochine (interleuchina 2) ma anche quelli registrati con i più recenti inibitori di VEGF (*Vascular Endotelial Growth Factor*), mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) e dei recettori delle tirosin-chinasi (RTK) che sono coinvolti nella crescita, nella neoangiogenesi tumorale e nella progressione metastatica del cancro. Al 53° Congresso Asco (*American Society of Clinical Oncology*) tenuto a Chicago nel 2017 sono stati presentati i risultati ottenuti nello studio *Immotion150* condotto con **atezolizumab** (farmaco anti PD-L1) insieme a **bevacizumab** (farmaco anti-angiogenesi) - dopo progressione in corso di terapia con *sunitinib* (inibitore di recettori delle tirosin-chinasi) o *atezolizumab* in monoterapia - su una particolare forma di carcinoma renale metastatico. Risulta che *bevacizumab*, oltre a presentare proprietà immunomodulatorie, incrementa l'infiltrazione (migrazione) dei linfociti T nei tessuti tumorali. L'associazione terapeutica ha evidenziato un'importante attività clinica nei pazienti che hanno effettuato lo *switch*, con un tasso di risposta globale del 26% e una sopravvivenza mediana libera da progressione pari a 8,8 mesi. Rimanendo in ambito urologico, è stata confermata l'efficacia di **pembrolizumab** nel trattamento del **carcinoma uroteliale**: lo dimostrano i risultati aggiornati di due studi sperimentali con il farmaco appartenente alla classe anti PD-1, in pazienti con carcinoma

uroteliale localmente avanzato o metastatico ed in particolare in soggetti che hanno fallito una precedente terapia con cisplatino. Questi dati dimostrano ulteriormente il potenziale di *pembrolizumab* come terapia di seconda linea dopo il fallimento del trattamento con platino e in prima linea in pazienti non eleggibili alla terapia con cisplatino. In particolare, nel trattamento di seconda linea, *pembrolizumab* ha migliorato la sopravvivenza globale rispetto alla chemioterapia, con 10,3 mesi vs 7,4 mesi e, in prima linea, il farmaco ha fatto registrare un tasso di risposta globale del 29%. Nel **melanoma**, sempre grazie a *pembrolizumab*, sono stati confermati i benefici a lungo termine dell'immunoterapia in base ai risultati dello studio di fase III *Keynote-006*. La ricerca ha coinvolto 834 pazienti affetti da melanoma in stadio III inoperabile o in stadio IV avanzato non trattati in precedenza o che avevano già ricevuto una terapia in prima linea. Dopo circa tre anni il 50% dei pazienti trattati con *pembrolizumab* è vivo rispetto al 39% dei pazienti trattati con *ipilimumab*. Inoltre *pembrolizumab* ha raddoppiato il tasso di sopravvivenza libera da progressione (31% rispetto al 14%) e le risposte obiettive hanno raggiunto il 42% rispetto al 16% di quelle ottenute con *ipilimumab*. È stata anche condotta una sottoanalisi per valutare l'*outcome* dei pazienti che avevano completato i due anni di trattamento: in questa sottopopolazione, dopo un follow-up mediano di 10 mesi dalla sospensione, il 91% dei pazienti non presenta progressione di malattia. È l'unico dato di sopravvivenza a lungo termine anche dopo l'interruzione di un trattamento con un farmaco immunoncologico anti PD-1 in questa patologia.

Nel mese di settembre 2017 sono stati presentati all'ESMO (*European Society for Medical Oncology*) i dati preliminari aggiornati dello studio clinico per la valutazione di *epacadostat* (inibitore enzimatico IDO1 selettivo) in combinazione con *pembrolizumab* (anti PD-1) nei pazienti affetti da melanoma avanzato. Questa associazione ha dato luogo a tassi di risposta più duratura e a una migliore sopravvivenza libera da progressione rispetto ai risultati ottenuti con il solo anticorpo anti PD-1. IDO1 (*indoleamina-2-3-diossigenasi*) è un enzima che degrada il triptofano in chinurenina e rappresenta il principale meccanismo impiegato dalle cellule neoplastiche per eludere la risposta immunitaria inattivando le cellule T. Nel 2017 la *Food and Drug Administration* (FDA) ha approvato la prima terapia genica per il trattamento della **leucemia linfoblastica acuta a cellule B**, refrattaria o recidiva, in pazienti pediatrici e in giovani adulti.

Il composto *tisagenlecleucel* è un recettore antigenico chimerico (CAR-T) che utilizza le cellule del sistema immunitario del paziente, geneticamente modificate con un recettore che ha per target l'antigene CD19 (molecola espressa sulla superficie delle cellule tumorali), per trattare la propria neoplasia. Nei primi mesi di cura è stato ottenuto l'83% di remissioni globali in un trial multicentrico attuato su 63 pazienti. Il trattamento tuttavia è associato a marcati effetti collaterali. Sempre nel 2017 sono in corso studi clinici atti a valutare strategie destinate a inibire, ridurre e reindirizzare cellule progenitrici mieloidi che rappresentano una componente attiva del microambiente tumorale, per ottenere un beneficio terapeutico. L'infiltrazione delle cellule mieloidi esercita infatti un forte impatto nei meccanismi di resistenza alle terapie antitumorali (chemioterapia, immunoterapia).

L'immunoterapia oncologica ha rivoluzionato la terapia del cancro e gli inibitori dei checkpoint immunitari hanno determinato tassi di risposte durature in alcuni dei tumori di più difficile trattamento. Tuttavia sono ancora numerosi i pazienti che non rispondono a queste terapie ed esistono potenziali effetti avversi. Di conseguenza è necessario identificare biomarkers che possano migliorare la selezione dei pazienti che risponderanno positivamente a queste cure anche per evitare la possibile tossicità ed i notevoli costi di queste terapie. Esempi di biomarkers che possono essere utilizzati includono fattori solubili come proteine sieriche, lo studio dell'espressione di recettori tumore specifici, fattori presenti nel microambiente tumorale, cellule tumorali ed immunitarie circolanti. A questo proposito sono necessari trials prospettici che possano validare l'impiego dei biomarcatori. Fra questi sono sicuramente utili lo studio dei linfociti infiltranti il tumore nel microambiente tumorale ma anche la determinazione dell'espressione in esso di PD-1 e PD-L1 tumorale che sembrano associati ad una più favorevole risposta terapeutica ed ancora l'entità delle mutazioni presenti. Altri fattori che si correlano con la risposta terapeutica sono le cellule T helper 1 (Th1), numerose citochine, chemochine, altri. Fra gli elementi a disposizione per una valutazione della risposta clinica va considerato anche il grado di linfocitosi che risulta immediatamente dopo terapia. Un suo valore elevato si associa ad un maggior controllo della neoplasia e al miglioramento della sopravvivenza (*Spencer K.R. et al. Biomarkers for immunotherapy: current developments and challenges. ASCO, 2016.*).

The background of the image is an abstract, marbled pattern in shades of blue and white. The pattern consists of intricate, swirling, and branching lines that resemble a complex network or a microscopic view of a material. The colors range from deep navy blue to bright, almost white highlights, creating a high-contrast, textured effect. In the center of the image, the word "APPROFONDIMENTI" is written in a bold, serif font. The letters are a vibrant orange-yellow color with a thin black outline, making them stand out prominently against the busy, blue background.

APPROFONDIMENTI

Sistema immunitario

Il **sistema immunitario** è un sistema molto complesso che opera tramite decine e decine di differenti componenti molecolari e cellulari che cooperano per la difesa e il mantenimento dell'integrità dell'organismo.

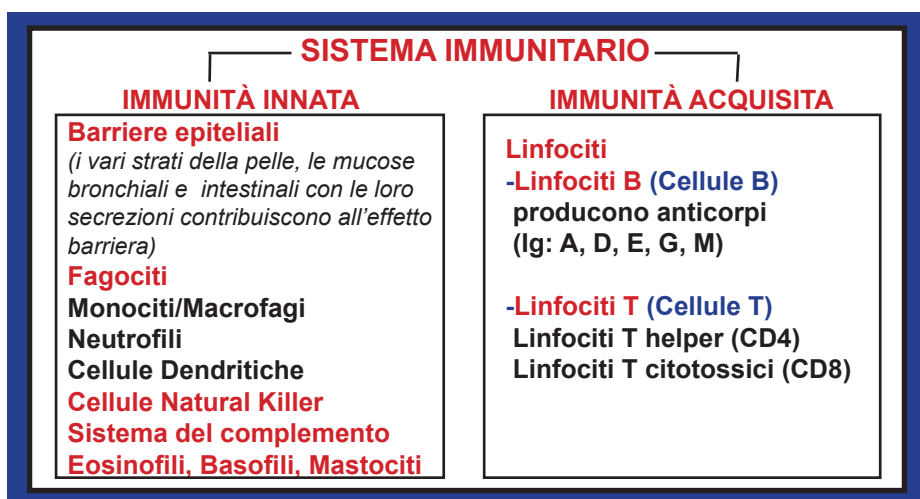
Si distinguono due tipi di immunità: l'**immunità innata** o **naturale**, sempre attiva ma non specializzata e l'**immunità acquisita** (**specifico** o **adattativa**) che entra in azione in presenza di elementi estranei, potenzialmente nocivi.

Sistema immunitario: riconoscimento e comunicazione

L'immunità innata ed acquisita cooperano tra loro e sono caratterizzate dalla capacità di riconoscimento, comunicazione ed eliminazione degli agenti estranei. Le normali componenti dell'organismo sono salvaguardate dall'attività immunitaria ma possono essere attaccate in caso di rottura dell'equilibrio come si verifica nelle malattie autoimmuni. Il sistema immunitario ha la capacità di comunicare e trasmettere le informazioni sia per contatto diretto, con molecole dette di adesione, sia mediante segnali molecolari rappresentati dalle citochine. Quest'ultime sono in grado di avviare o bloccare le risposte immunitarie e di richiamare i globuli bianchi là dove è necessario. La scoperta di queste modalità di comunicazione ha aperto la strada allo sviluppo di terapie in grado di intervenire sul sistema immunitario.

Immunità naturale o innata

L'immunità innata è la prima linea di difesa contro gli agenti estranei (batteri, virus, parassiti). Essa è caratterizzata da un particolare tipo di globuli bianchi noti come **fagociti** che sono in grado di neutralizzare gli agenti nocivi inglobandoli nel loro interno (fagocitosi). Si calcola che ogni giorno 100 miliardi di essi muoiano per neutralizzare agenti estranei con cui vengono in contatto. L'infiammazione che scaturisce da un danno tissutale di qualsiasi tipo è caratterizzata dai classici segni (*rubor, calor, dolor, tumor*) descritti dall'enciclopedista e medico romano Aulo Cornelio Celso (I secolo d.C.) nel trattato "*De Medicina*". Essa rappresenta la manifestazione in grado di attivare l'immunità innata attraverso segnali molecolari rilasciati nel sito infiammatorio. L'infiammazione si sviluppa nelle malattie infettive, metaboliche, cardiovascolari e nei tumori sia come fattore predisponente che nella progressione della malattia. Elementi di spicco dell'immunità innata sono i **macrofagi** (*grandi fagociti*). Queste cellule sono particolari globuli bianchi originati dai monociti circolanti



che nei siti infiammatori si differenziano in macrofagi, elementi fondamentali della reazione infiammatoria presenti in grande quantità nei tumori. Nei diversi tessuti assumono forme morfologiche differenti (microglia nel SNC, cellule di Kupffer nel fegato, macrofagi alveolari nei polmoni). Sono presenti anche nella pelle e nell'intestino. La loro funzione è la fagocitosi e la distruzione di agenti estranei. I macrofagi secernono citochine che promuovono il reclutamento di leucociti dal sangue circolante ai siti di infiammazione. Possono uccidere cellule tumorali sia attraverso i loro recettori *Fc* che legano anticorpi sulla superficie delle cellule neoplastiche, sia attraverso l'ossido nitrico prodotto e il TNF (*Tumor Necrosis Factor*). Sorprendentemente i macrofagi possono tuttavia partecipare anche allo sviluppo tumorale. Altri fagociti sono rappresentati dai granulociti **neutrofili** (piccoli globuli bianchi circolanti) e dalle **cellule dendritiche**. I **neutrofili** sono presenti in alta percentuale (50-70% di tutti i leucociti) nel sangue periferico. Entrano in azione nelle infezioni in fase iniziale e giocano un ruolo nelle risposte infiammatorie conseguenti ad alterazioni tissutali e all'attività di patogeni. Hanno azione fagocitaria nei confronti degli agenti estranei e generano specie reattive (ROS e NOS), enzimi proteolitici e peptidi dai granuli citoplasmatici. Le **cellule dendritiche** appartengono alla famiglia dei globuli bianchi ed hanno funzioni diverse a seconda dei tessuti in cui risiedono: pelle (*cellule di Langerhans*), intestino. Sono dotate di lunghe braccia, simili a rami di albero (dal greco *dendron*=albero), che si muovono, come tentacoli di una piovra, alla ricerca di possibili aggressori in organi e tessuti. Vere e proprie sentinelle in grado di dare l'allarme in presenza di agenti estranei, sono infatti specializzate

nella cattura e nella presentazione dell'antigene e rappresentano l'anello di congiunzione fra immunità innata e adattativa. Attraverso la linfa si spostano dal tessuto in cui risiedono ai linfonodi vicini. Specifici recettori posti sulle cellule dendritiche, noti come **TLR** (*Toll-like receptors*), trasmettono ad esse il segnale di attivazione per dirigersi ai linfonodi. A questo livello attivano la risposta immunitaria specifica dei linfociti T e B. Una volta fagocitato l'agente esterno infatti, lo decompongono e ne espongono campioni o frammenti (antigeni) in superficie in modo da presentarli alle cellule dell'immunità adattativa per il loro riconoscimento e l'eliminazione (i linfociti T riconoscono gli antigeni e i linfociti B producono gli anticorpi contro gli antigeni). Le cellule T riconoscono gli antigeni mediante il cosiddetto "recettore dei linfociti T" (*T Cell Receptor*=TCR) che consente di accedere al codice **MHC** (*Major Histocompatibility Complex* = *Complesso Maggiore di Istocompatibilità*) cioè a molecole su cui le cellule dendritiche montano gli antigeni una volta catturati (frammenti di proteine, peptidi provenienti dal metabolismo interno o dal mondo esterno). Gli antigeni vengono presentati sulla superficie cellulare e ne definiscono l'identità. Il complesso MHC, in pratica, è il codice entro il quale i linfociti T sono in grado di distinguere il cosiddetto *self* (*se stesso*) dal *non self* (*il mondo esterno*). È quindi una sorta di carta di identità immunologica che entra in gioco anche nel rigetto dei trapianti e che porta all'eliminazione di tutto ciò che non è *self*. Insieme ai fagociti fanno parte dell'immunità innata le cellule linfoide fra le quali un posto di rilievo è occupato dalle **cellule Natural Killer (NK)**. Sono linfociti "*naturalmente capaci di uccidere*" che costituiscono un sistema di difesa complementare a quello dei linfociti T dell'immunità acquisita e sono in grado di eliminare le cellule che hanno perso l'identità immunologica, ovvero il codice MHC. Nei pazienti con tumori avanzati si ha una ridotta attività NK e una diminuita produzione di ossido nitrico da parte dei macrofagi.

Immunità acquisita o adattativa o specifica

Immunità adattativa è così denominata in quanto capace di adattarsi al mondo esterno. È specifica perchè è in grado di riconoscere e reagire contro un determinato antigene e non altri e di conservarne la memoria (*memoria immunologica*) anche a distanza di tempo. Questa caratteristica viene sfruttata per la prevenzione utilizzando i vaccini. L'immunità adattativa entra in gioco quando le cellule dell'immunità

Linfociti

I linfociti sono cellule dell'immunità acquisita. Si distinguono in Linfociti B e T.

a) **Linfociti B (cellule B)** sono cellule del sistema immunitario che alla fine della loro vita si trasformano in **plasmacellule** e producono gli anticorpi o immunoglobuline (Ig). Esse sono particolari proteine che si legano agli antigeni (proteine e sostanze estranee all'organismo), in modo specifico, per distruggerli rendendoli suscettibili all'azione di altre cellule del sistema immunitario ed in particolare dei macrofagi.

Esistono diverse classi di immunoglobuline (Ig: **A, D, E, G, M**).

Le gammaglobuline IgM intervengono per prime al contatto con un nuovo antigene mentre le IgG entrano in azione quando è già avvenuto l'incontro con l'antigene.

Le IgA costituiscono un mezzo di difesa contro le infezioni delle mucose e sono presenti nelle secrezioni esterne (muco, lacrime, latte materno).

Le IgE sono associate a reazioni allergiche; ad esse si legano allergeni che scatenano l'attivazione dei mastociti (cellule altamente infiammatorie che derivano dal midollo osseo e sono presenti in tutti i tessuti) che liberano granuli contenenti molecole quali l'istamina. Il ruolo delle IgD non è del tutto chiarito.

b) **Linfociti T (cellule T)**, così chiamati in quanto originano nel timo, si suddividono in due sottoclassi: **Linfociti CD4 (T helper e TReg Cells)** e **CD8 (Linfociti T citotossici)**.

I **Linfociti T helper (Th) CD4** avviano tutto il meccanismo difensivo quando entrano in contatto con un antigene. Dirigono l'azione dei linfociti B, T e dei macrofagi attraverso il rilascio di citochine fra cui l'interferone e l'interleuchina-2. Le cellule CD4 sono i regolatori delle risposte immunitarie adattative e delle malattie infiammatorie e allergiche. Partendo dalle cellule T indifferenziate (*naive*) si sviluppano negli organi linfatici secondari, per stimolazione di differenti segnali e attivazione da parte di cellule che presentano l'antigene (APC), vari tipi di cellule T helper. Si tratta di sottopopolazioni di cellule effettrici che sono specializzate nella produzione di citochine specifiche.

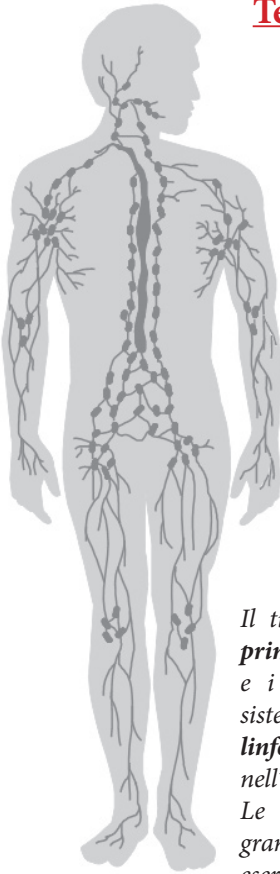
Si distinguono in **Th1** e **Th2**. Il **circuito Th1** attiva una risposta cellulo-mediata protettiva a cui partecipano i macrofagi. È orientato in senso citotossico e risulta attivo nei confronti dei patogeni endocellulari (infezioni virali, *Mycobacterium tuberculosis*), stimola le cellule NK e l'immunità antitumorale (interferone gamma). Il **circuito Th2** (IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e TNF) è attivo nelle infezioni extracellulari e parassitarie; è predominante nelle patologie infiammatorie e allergiche e in presenza di stress. Quando è eccessivamente stimolato determina iperattività allergica e facilita la progressione di una patologia tumorale in atto. Se i circuiti Th1 e Th2 sono in equilibrio dinamico il sistema immunitario è bilanciato. Un'ulteriore sottopopolazione di cellule Th CD4 è rappresentata da **Th17** (secernenti la citochina pro-infiammatoria IL-17 attivatrice di NF-kB), fortemente implicata nell'immunità innata contro le infezioni batteriche extracellulari oltre che nei fenomeni infiammatori autoimmuni (artrite reumatoide, morbo di Crohn, psoriasi).

TReg cells (Regulatory T cells) sono popolazioni di linfociti T regolatori, sia naturali che inducibili, che possono sopprimere attività potenzialmente nocive dei linfociti T helper e prevengono risposte inappropriate e malattie autoimmuni.

I **Linfociti T citotossici CD8** riconoscono gli antigeni e comunicano con tutte le altre cellule che hanno carattere di difesa. Sono in grado di distruggere in modo mirato gli agenti considerati nocivi e le cellule tumorali una volta attivati negli organi linfoidi secondari (linfonodi, etc).

Ormoni, neuropeptidi e neurotrasmettitori hanno influenza sulle cellule immunitarie: ad esempio il cortisolo sposta l'equilibrio immunitario verso Th2.

Tessuti linfoidi



Adenoidi e Tonsille

Timo

Vasi linfatici

Linfonodi

Milza

Placche di Peyer

Appendice

Midollo osseo

Tessuti Linfoidi

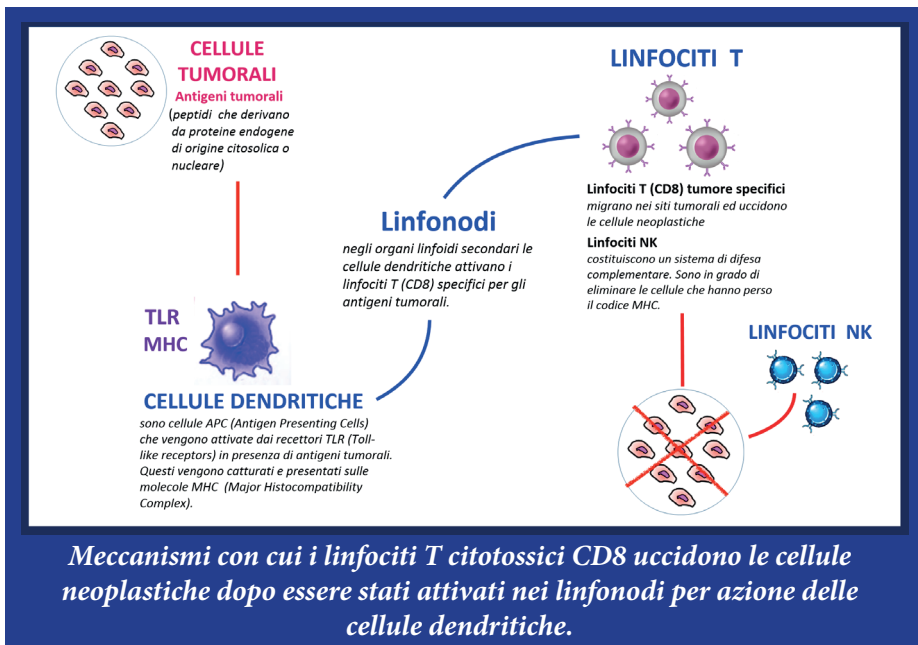
*Il timo ed il midollo osseo sono **tessuti linfoidi primari** nei quali maturano i linfociti T (nel Timo) e i linfociti B (nel midollo osseo). Attraverso il sistema circolatorio i linfociti migrano nei **tessuti linfoidi secondari** (milza, linfonodi, placche di Peyer nell'intestino) dove vengono attivati.*

Le cellule dendritiche ed i macrofagi presenti in gran numero nei linfonodi, in quanto cellule APC, esercitano un ruolo chiave nell'attivazione dei linfociti.

innata non riescono a neutralizzare gli agenti patogeni. Gli elementi chiave dell'immunità acquisita sono rappresentati dai **linfociti** (vedi Box). Per riconoscere e attaccare il bersaglio i linfociti T devono essere attivati da cellule specializzate denominate **APC** (*Antigen Presenting Cells*). Tali sono le cellule dendritiche e i macrofagi che, in presenza di tumori, dopo aver fagocitato cellule tumorali, o loro antigeni, li espongono in superficie. Nello stesso momento le cellule dendritiche esprimono molecole costimolatorie che permettono l'attivazione dei linfociti e quindi lo scatenamento della risposta immunitaria antitumorale.

Se i linfociti T non riescono a distruggere gli agenti estranei entrano in gioco i **linfociti Natural Killer (NK)** che completano il lavoro.

I linfociti T hanno un diverso comportamento di fronte a cellule tumorali



rispetto ad altri agenti (batteri, virus, etc.): infatti le cellule neoplastiche possono non essere riconosciute come elementi estranei. Un meccanismo con cui le cellule tumorali evadono le difese immunitarie è quello dei checkpoint. Sulla membrana delle cellule T sono infatti presenti checkpoint immunitari (recettori CTLA-4, PD-1, ed altri) che si legano a specifici ligandi sulla superficie delle cellule tumorali quando presenti. Tale legame disattiva il linfocita T che non può più attaccare le cellule tumorali. I checkpoint esercitano un'azione di freno sulle cellule T la cui riattivazione è resa possibile solo utilizzando anticorpi monoclonali inibitori dei checkpoint (anti CTLA-4, anti PD-1, etc.). Questi anticorpi sono oggi impiegati con successo nell'immunoterapia oncologica.

Meccanismi con cui i tumori evadono il sistema immunitario

Il rilevante tasso di mitosi delle cellule tumorali, l'instabilità genetica, le continue mutazioni determinano la formazione di neoantigeni che possono costituire punti di attacco delle difese immunitarie. Queste però possono svilupparsi solo quando le cellule T sono in grado di riconoscere antigeni tumorali e vengono attivate. Il sistema immunitario tuttavia può non fermare la crescita neoplastica perchè i tumori evolvendo sono capaci di eludere il loro riconoscimento e acquisiscono immunoresistenza.

Alcune condizioni possono favorire l'immuno-evasione:

- a)** la crescita neoplastica può essere di entità superiore alle difese immunitarie che possono risultare insufficienti (immunodeficienza);
- b)** i tumori inducono una modesta reazione infiammatoria e non esprimono una sufficiente quantità di antigeni in grado di attivare la risposta immunitaria;
- c)** le cellule tumorali non esprimono il codice di identificazione MHC e quindi non presentano gli antigeni che permettono il loro riconoscimento da parte dei linfociti T citotossici CD8;
- d)** le cellule tumorali esprimono ligandi per i recettori che inibiscono le cellule T. Ad esempio il ligando PD-L1 che è in grado di legarsi al recettore PD-1 dei linfociti T bloccandone l'azione;
- e)** il tumore maligno crea un microambiente infiammatorio che sopprime l'attività immunitaria antitumorale e promuove la crescita neoplastica utilizzando le cellule immunitarie presenti, quali i macrofagi;
- f)** la riduzione dell'attività citotossica delle cellule NK e della produzione di ossido nitrico da parte dei macrofagi.

Il Microbiota/Microbioma

Il **Microbiota** è la totalità dei microrganismi simbiotici (batteri, virus, archaea, funghi) che convivono e cooperano con l'organismo umano senza danneggiarlo. Questi ospiti esistono in un preciso equilibrio immunologico e mutualistico con l'organismo che, pur essendo molto sensibile a distinguere *self* da *nonself*, ne permette la presenza. Essi sono presenti, in massima parte, nel tratto gastrointestinale ma si ritrovano anche nelle mucose di tutto l'organismo: nasale, orale, vaginale, dell'apparato respiratorio, apparato uro-genitale, oculare, nella pelle e nella placenta. Si tratta di specie autoctone acquisite alla nascita e di origine ambientale. Il loro numero è dell'ordine di 100 trilioni di cellule, cioè 10 volte di più del numero delle cellule che compongono il nostro organismo tanto che, a ragione, possiamo considerarci "ospiti dei batteri". Corrispondentemente il **Microbioma**, che è l'insieme del patrimonio genetico (genoma) di questi microrganismi, acquisito mediante le moderne tecniche di sequenziamento, risulta 100 volte maggiore del nostro. Per questo motivo l'organismo umano può essere considerato un *superorganismo* composto da cellule umane e microbiche e dalla somma dei geni del genoma umano e del microbioma. Oggi si tende ad utilizzare indifferentemente il termine microbiota e microbioma. Il **microbioma intestinale** rappresenta il 99% del microbiota totale: il 70% è presente nel colon; la sua composizione differisce nei vari tratti dell'apparato gastro-intestinale. Esso produce dal 70 all'80% delle cellule immunitarie dell'organismo tanto che può essere considerato il primo organo immunitario perchè contiene il GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*=tessuto linfoide associato all'intestino) composto da ammassi linfoidi contenenti cellule immature rappresentati dalle placche di Peyer (siti di induzione delle risposte immunitarie da parte delle cellule mature presenti nella lamina propria e nell'epitelio dei villi intestinali).

La colonizzazione microbica dell'intestino inizia al momento della nascita a formare un microbiota che varia da individuo a individuo. La colonizzazione definitiva avviene fra i 12 ed i 18 mesi. Nelle fasi ulteriori della vita il numero dei microrganismi è mantenuto costante, mentre la composizione degli stessi evolve continuamente. Un microbioma corretto aiuta l'organismo nelle funzioni metaboliche, digestive, nel metabolismo degli acidi biliari, nella detossificazione, nella sintesi di vitamine (B12, K, altre), nella modulazione del sistema immunitario, nella protezione da microrganismi patogeni.

Questa avviene anche per la presenza del muco che riveste la parete intestinale ed evita il contatto con i microrganismi. Il microbioma ha effetti sul metabolismo dei lipidi, di sostanze tossiche e farmaci, produce gas e sostanze odorose. Inoltre fornisce materiale genetico nel DNA umano. Queste parti di DNA, che sono capaci di traslocare nella sequenza della molecola, sono sede elettiva di marcatura epigenetica (*Bottaccioli F. Epigenetica (...). Ed. Edra S.p.A., 2016.*). Il microbioma provvede alla sintesi di quattro acidi grassi fondamentali: l'acido propionico, lattico, acetico e butirrico. Fra questi l'**acido butirrico** svolge attività protettive e inibitorie della proliferazione di cellule tumorali a livello del colon e non solo. Si riconoscono numerose ed importanti azioni del butirrato (vedi BOX).

Il Butirrato: azioni

Il butirrato deriva dalla fermentazione batterica di sostanze zuccherine e dal metabolismo delle fibre vegetali. Una dieta ricca di verdure permette di ottenere una concentrazione intestinale ottimale di acido butirrico che, insieme all'aminoacido glutammina, è un normale metabolita delle cellule della mucosa del colon che lo possono utilizzare al posto del glucosio.

Il butirrato esercita numerose azioni:

a) azione antinfiammatoria per inibizione del fattore di trascrizione NF-kB insieme ad altri grassi a catena corta sintetizzati dal microbioma.

Il butirrato riduce anche lo stress ossidativo;

b) aumento delle cellule T regolatrici e riduzione della sottopopolazione di cellule Th17;

c) inibizione di CD44 che è una molecola importante perchè entra in gioco nelle metastasi;

d) aumento dell'attività trascrizionale del DNA per inibizione dell'istone-deacetilasi favorendo, in tal modo, l'acetilazione degli aminoacidi degli istoni. L'inibizione dell'istone-deacetilasi determina l'attivazione di geni oncosoppressori che contrastano lo sviluppo del cancro;

e) permette la distruzione dei mitocondri e l'apoptosi di cellule tumorali che proliferano a basso consumo di ossigeno. Infatti, una volta metabolizzato entra nei mitocondri sotto forma di acetil-coenzima A favorendo questa azione;

f) è in grado di modulare i *miRNA* (piccole molecole di RNA non codificanti che regolano l'espressione genica post trascrizionale) e determina un aumento di miR-22;

g) rinforza i meccanismi di difesa della barriera intestinale aumentando la produzione di mucine e di peptidi antimicrobici.

La **composizione della flora batterica commensale del colon** è influenzata da: a) *fattori genetici*; b) *condizioni di stress e infiammatorie*: lo stress, ad esempio, può determinare il cambiamento nella composizione del microbioma paragonabile ad una dieta ad alto contenuto di grassi. È anche possibile che alterazioni del microbioma influenzino il comportamento e inducano stati ansiosi non motivati; c) *condizioni igieniche*; d) *la nutrizione materna*: la diminuzione dell'assunzione di carboidrati complessi è associata ad una riduzione dell' apporto di fibre e di amido resistente che porta ad una diminuzione della concentrazione di microrganismi favorevoli per la salute; e) *la modalità con cui avviene il parto* (via naturale o parto cesareo). Durante il parto per via vaginale la madre trasmette in maniera naturale batteri al neonato; con il parto cesareo invece il neonato eredita batteri provenienti dalla pelle e dall'ambiente. Alcuni studi dimostrano come già durante la gravidanza può iniziare la colonizzazione batterica: infatti alcune specie batteriche presenti nel microbioma intestinale materno sono state isolate nel sangue del cordone ombelicale, nel liquido amniotico, nel meconio e nella placenta; f) *l'ambiente e il luogo geografico di nascita*: si può avere, ad esempio, la prevalenza di specie batteriche che degradano la cellulosa o i carboidrati, come osservato da *De Filippo (Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. PNAS, 2010.)*; g) *il tipo di allattamento*: la grande quantità di oligosaccaridi presenti nel latte materno è un fattore determinante nella colonizzazione del colon da parte dei bifidobatteri che sono microrganismi anaerobi deputati alla decomposizione degli zuccheri non digeribili, come le fibre alimentari; h) *le abitudini alimentari*: il regime alimentare può modificare il microbioma intestinale a seconda della composizione della dieta. Una dieta ricca di fibre esercita azioni proficue favorendo la produzione di butirrato. Una dieta monotematica può ridurre il numero di popolazioni batteriche nell'intestino che passano da 400-500 famiglie diverse a 100-150 che sono in grado di orientare le nostre scelte alimentari aumentando il rischio di obesità. Un eccesso di grassi e di zuccheri raffinati nella dieta fa aumentare le popolazioni intestinali di batteri Gram negativi che sono in grado di liberare il liposaccaride LPS (componente della membrana cellulare dei Gram negativi che è costituito da una porzione lipidica ed una polisaccaridica in grado di scatenare risposte immunitarie). LPS è altamente infiammatorio e responsabile di infiammazione

cronica. Altri fattori alimentari e i conservanti danneggiano il microbiota. Anche l'eccesso di proteine animali selezionano ceppi batterici ricchi in decarbossilasi che trasformano alcuni aminoacidi in sostanze infiammatorie e cancerogene. Un eccesso di glutine e caseina nella dieta seleziona ceppi intestinali in grado di sintetizzare gluteomorfina e caseomorfina che, oltre a creare dipendenza verso quel preciso alimento, attivano i recettori TLR4 dei mastociti scatenando infiammazione. Metaboliti tossici sviluppati nell'intestino tenue e nel cieco possono essere assorbiti e provocare reazioni infiammatorie e vasomotorie sistemiche; i) *il trattamento antibiotico*: la terapia antibiotica attacca non solo i germi patogeni, ma anche i batteri simbiotici tanto che dopo un trattamento protratto la flora batterica intestinale può non ritrovare il suo equilibrio e può favorire infezioni da *Clostridium difficile* talora di grave entità.

I rapporti fra microbioma e sistema immunitario risultano molto complessi e bidirezionali. Le popolazioni microbiche simbiotiche producono infatti fattori neuroattivi quali acido gamma-amminobutirrico (GABA), noradrenalina, serotonina, dopamina, acetilcolina capaci di comunicare con il SNC.

L'enorme complessità del microbioma ha effetto su numerosi eventi patologici (malattie infiammatorie dell'intestino, obesità, morbo celiaco, malattie reumatiche, neurologiche, disturbi psichiatrici) fra cui il cancro. Una parte dei tumori è legata alla composizione del microbioma e alla sua capacità di generare uno stato infiammatorio che ne favorisce la comparsa. Un esempio è offerto dallo sviluppo del cancro gastrico legato all'*Helicobacter pylori*, ma anche il cancro al colon. Uno stato infiammatorio può derivare dall'azione degli acidi biliari sulla mucosa intestinale e sul microbiota che può contribuire alla insorgenza del carcinoma del colon-retto e dell'epatocarcinoma. In alcuni casi il microbiota può influenzare tumori lontani dall'intestino producendo molecole dette MAMP (*Microbe Associated Molecular Pattern*) che servono proprio ad attivare una risposta immunitaria o altre molecole che favoriscono la formazione di nuovi vasi sanguigni. Inoltre la composizione del microbioma influenza il microambiente tumorale e le risposte all'immunoterapia e alla chemioterapia contro il cancro. È quindi evidente che agendo sul microbioma, ad esempio modulandolo con l'alimentazione o con supplementi ad hoc, è possibile modificare le risposte immunitarie e aumentare l'efficacia delle terapie immunoncologiche (inibitori dei checkpoint) (*Fulbright et al. The microbiome and the hallmarks of cancer. PLOS, 2017.*).

Microambiente tumorale

Un tumore maligno ha peculiari caratteristiche che sono state formulate da *Hanahan* e *Weinberg* (vedi BOX). Fra queste risulta la capacità di creare intorno a sé un microambiente infiammatorio in grado di sopprimere l'immunità antitumorale e promuovere la crescita neoplastica. Il microambiente è costituito non solo da cellule tumorali ma anche da tessuti fisiologici che comprendono lo stroma (impalcatura di sostegno) con i fibroblasti, i vasi sanguigni ed i globuli bianchi, soprattutto linfociti T e macrofagi, i cui precursori sono monociti derivanti dalla linea mieloide. Alcuni tumori presentano una ricca infiltrazione di linfociti T. Si ritrovano anche, in quantità diverse, cellule dell'immunità innata quali macrofagi, granulociti e cellule mieloidi immature da cui derivano i monociti/macrofagi. In alcuni tumori la risposta infiammatoria derivante dall'immunità innata può essere anche di grado marcato e costituire, addirittura, la maggior parte della massa tumorale. Risulta oggi sempre più chiaro che il sistema immunitario può avere una doppia valenza, e cioè manifestare attività antitumorale oppure offrire un notevole contributo allo sviluppo di un tumore e costituire una barriera che si oppone all'efficacia dei farmaci antitumorali creando chemioresistenza. Il ruolo paradossale che riveste il sistema immunitario nel cancro può essere spiegato con la sua plasticità che gli permette di manifestare proprietà pro o antitumorali (*Beatty G.L. Overcoming therapeutic resistance by targeting cancer inflammation. ASCO, 2016.*). Il **Microambiente infiammatorio** che circonda le cellule tumorali è quindi una complessa *network* in cui l'infiltrazione immunitaria è stata a lungo considerata un meccanismo di difesa nei confronti del tumore maligno. In realtà essa può contribuire allo sviluppo, alla diffusione della neoplasia, alla metastatizzazione e all'insorgenza di resistenza alle terapie antitumorali. Il microambiente tumorale, di conseguenza, diventa parte attiva nello sviluppo e nella diffusione del cancro (vedi BOX). Abbiamo visto come i macrofagi rappresentano un costituente importante del microambiente infiammatorio e facilitano l'evoluzione della malattia. L'attivazione dei macrofagi si manifesta in due diversi stati di polarizzazione, noti come M1 ed M2, che sono caratterizzati da differenti recettori e dalla diversa produzione di citochine. I macrofagi tumore associati (M2) contribuiscono alla crescita tumorale. Nel microambiente infiammatorio macrofagi e fibroblasti sono attivati rispettivamente a TAM (*Tumor Associated Macrophages*) ed a CAF

Caratteristiche che contraddistinguono un tumore maligno

(Douglas Hanahan e Robert Weinberg: *Cell* 2000; *Cell* 2011.)

- 1-Capacità di crescita illimitata;
- 2-autonomia di sviluppo grazie a fattori di crescita propri;
- 3-abilità a sfuggire a segnali dell'organismo che bloccano la proliferazione cellulare;
- 4-capacità di sfuggire ai naturali segnali di morte cellulare (apoptosi) che sono necessari per il ricambio cellulare e mantenere in equilibrio l'organismo;
- 5-elevata attività angiogenetica che favorisce la crescita tumorale;
- 6-capacità di dare metastasi;
- 7-capacità di sfuggire alle difese immunitarie e di creare intorno a sé un microambiente infiammatorio che favorisce la proliferazione neoplastica. Il microambiente è costituito da una complessa network di elementi e da cellule immunitarie (soprattutto macrofagi e linfociti T) che sostengono la progressione neoplastica, favorendo la formazione di nuovi vasi sanguigni, inibendo la funzione dei linfociti T, promuovendo le metastasi;
- 8-alterazione del metabolismo con capacità di utilizzare poco ossigeno per produrre energia (*glicolisi anaerobica*) e favorire la moltiplicazione cellulare;
- 9-instabilità genetica: le cellule tumorali sono in grado di mutare e dare origine a varianti adatte a sopravvivere all'ambiente anche in condizioni avverse ed in risposta alla terapia (chemio e radioterapia) divenendo resistenti alle cure.

Microambiente tumorale infiammatorio

Il microambiente tumorale è una complessa Network costituita da:

- cellule normali
- cellule tumorali
- cellule stromali multipotenti/cellule staminali mesenchimali
- Fibroblasti --> CAF
- vasi sanguigni precursori delle cellule endoteliali, periciti (cellule mesenchimali con funzioni contrattili che circondano le cellule endoteliali)
- cellule del sistema immunitario (Macrofagi-->TAM, cellule T, cellule NK)
- citochine infiammatorie (interleuchine, TNF-alfa, altre)
- radicali liberi (ROS= Reactive Oxygen Species; RNS= Reactive Nitrogen Species)

Macrofagi

I macrofagi in base allo stato di attivazione sono in grado di inibire o promuovere la crescita tumorale.

Macrofagi attivati - tipo M1 possono uccidere le cellule tumorali:

- a) mediante il riconoscimento, da parte di recettori dei macrofagi, di strutture molecolari derivanti dalla morte di cellule tumorali;
- b) ad opera dell'interferone gamma prodotto da linfociti specifici Th1 o dai linfociti T citotossici;
- c) mediante la produzione di ossido nitrico (NO).

Macrofagi tumore associati - tipo M2 contribuiscono alla crescita tumorale:

- a) producono VEGF (fattore di crescita che promuove l'angiogenesi);
- b) producono enzimi metalloproteinasi della matrice che modificano i tessuti extracellulari;
- c) secernono fattori di trascrizione quali NF-kB che gioca un ruolo di primo piano nell'infiammazione cronica e nella progressione tumorale;
- d) generano radicali liberi che danneggiano il DNA e determinano mutazioni nei geni soppressori tumorali e negli oncogeni;
- e) possono promuovere la crescita tumorale indirettamente inibendo la immunità antitumorale.

(Abbas e al. *Cellular and molecular immunology*. 9a Edition. Elsevier, 2017.)

(*Cancer Associated Fibroblast*) e vengono attratti nel compartimento stromale del microambiente tumorale già nelle fasi precoci della neoplasia per azione di chemochine derivanti da cellule infiammatorie e tumorali. TAM e CAF facilitano la comunicazione e l'interazione fra le cellule, ne regolano la proliferazione, stimolano la moltiplicazione incrementando l'angiogenesi e contribuiscono allo sviluppo e alla diffusione neoplastica. Le cellule dell'immunità innata agiscono anche generando radicali liberi che causano un danno del DNA e facilitano la mutazione dei geni soppressori tumorali e degli oncogeni. Considerando il ruolo del microambiente tumorale nella malattia neoplastica risulta chiaro come nella cura di numerosi tumori è necessario non solo colpire le cellule tumorali, ma controllare anche il microambiente infiammatorio che è causa di resistenza alle terapie antitumorali. A questo proposito sono in corso studi clinici che:

- a) mirano a bloccare il reclutamento di cellule infiammatorie mieloidi nell'ambiente tumorale neutralizzando le chemochine attraenti con anticorpi specifici;
- b) sfruttano strategie idonee ad inibire l'attività di cellule mieloidi

(componente attiva dell'infiltrato cellulare) nell'ambiente tumorale. In modelli preclinici è stato osservato che l'inibizione dell'enzima indoleammina-diossigenasi, espresso dalle cellule mieloidi e importante per il metabolismo del triptofano nei tumori, promuove l'attività antitumorale delle cellule T;

c) mirano a reindirizzare le cellule mieloidi da pro ad antitumorali, o anche da immunosoppressive ad immunostimolanti.

Una possibile strategia terapeutica antitumorale ha quindi come target il microambiente infiammatorio in combinazione con il blocco dei checkpoint immunitari.

Gli studi attuali sono rivolti anche al blocco dell'attività dei macrofagi avendo come bersaglio il fattore di crescita che sostiene la loro sopravvivenza in molti tumori (anticorpo anti-CSF1).

La ricerca valuta anche composti che inibiscono la produzione di mediatori infiammatori e angiogenici quali il *lenalidomide* che è un derivato del *talidomide* (tristemente noto per i numerosi casi di focomelia osservati nei bambini nati da donne che avevano assunto il farmaco durante la gravidanza). Il lenalidomide ha aperto nuove speranze nel trattamento del mieloma multiplo (*Mantovani Alberto. Immunità e vaccini. Ed. Mondadori, 2016.*).

Più in generale occorre avere **il controllo dell'infiammazione cronica** che entra in gioco nella patogenesi tumorale ed al tempo stesso rappresenta anche uno stimolo proliferativo e di progressione in presenza di una neoplasia. L'infiammazione cronica può essere in parte controllata anche con un idoneo regime alimentare (Dieta Mediterranea), l'esercizio fisico eseguito quotidianamente e con farmaci e fitocomposti quali la Curcuma con le sue molecole attive e altre sostanze che inibiscono le citochine infiammatorie, il fattore di trascrizione NF-kB (*Nuclear Factor-kB*), le ciclossigenasi COX-2.

Fattori che influenzano l'attività del Sistema Immunitario

Numerosi sono i fattori e le condizioni che influenzano la funzione e l'efficienza del sistema immunitario (vedi BOX):

-fattori genetici: immunodeficienze primitive su base genetica compaiono in età pediatrica e predispongono allo sviluppo di linfomi.

-genere: il sesso maschile e femminile presentano marcate differenze nello stato immunitario. Le femmine infatti sono naturalmente più resistenti alle infezioni (batteriche, virali e parassitarie) come conseguenza di una più potente risposta immunitaria dell'immunità innata e acquisita; tuttavia sono più suscettibili alle malattie autoimmuni quali l'artrite reumatoide e la sclerosi multipla. Le cause di ciò appaiono correlate con influenze ormonali e genetiche: gli ormoni estrogeni esercitano la loro attività attraverso i recettori estrogenici presenti sui macrofagi, le cellule NK, i linfociti T e B; all'opposto il progesterone sembra ridurre le funzioni immunitarie. Nel sesso femminile inoltre la presenza di due cromosomi X sembra influenzare lo stato immunitario. Un cromosoma X infatti è composto da almeno 1000 geni, molti dei quali sono responsabili di funzioni immunitarie (*Fish E.N. Nature Reviews Immunology, 2008.*). Nel sesso femminile lo stato immunitario è influenzato anche dal ciclo mestruale e dalla gravidanza.

Fattori che influenzano l'attività del Sistema Immunitario

Immunità

- Fattori genetici*
- Genere*
- Età*
- Ritmo del sonno*
- Regime dietetico, fattori nutrizionali, idratazione*
- Microbioma intestinale*
- Obesità*
- Alcol e fumo*
- Fattori neuroendocrini*
- Attività fisica*
- Stress fisico e psichico*
- Agenti patogeni: HIV/AIDS*
- Tumori*
- Radiazioni*
- Farmaci immunosoppressori*
- Composti naturali*

Nel sesso maschile gli androgeni, compreso il testosterone, possono avere un modesto effetto o determinare la riduzione delle funzioni immunitarie (Bishop N.C. *Exercise, infection risk, immune function and inflammation(...).In: Exercise immunology*, 2013.).

-età: l'invecchiamento è una condizione che può associarsi ad indebolimento delle funzioni immunitarie (*immunosenescenza*) con ridotta proliferazione delle cellule T e B e della loro funzione e ad incremento di malattie autoimmuni, ma è possibile avere livelli di proliferazione come nei soggetti giovani. Si assiste tuttavia ad un aumento della suscettibilità a sviluppare malattie infettive e patologia tumorale che è rappresentata, in prevalenza, da carcinomi gastrici e del colon, epiteliomi e neoplasie del sistema linfo-ematopoietico (linfomi, leucemie).

-ritmo del sonno: il ritmo del sonno ed i ritmi circadiani hanno una forte influenza sui processi immunitari. Esiste infatti una comunicazione bidirezionale tra il sistema nervoso centrale e il sistema immunitario che è controllata da neurotrasmettitori, ormoni, citochine ed anche dall'innervazione diretta del sistema immunitario da parte del sistema nervoso autonomo. La scarsa qualità del sonno e la veglia prolungata determinano una risposta da stress che è caratterizzata dalla produzione di citochine proinfiammatorie, induzione di infiammazione cronica di basso grado, immunodeficienza.

Al contrario il sonno profondo (fasi 3-4 del sonno in cui prevalgono le onde lente delta), caratterizzato da un'attività metabolica cerebrale notevolmente ridotta, ha un effetto antinfiammatorio e migliora l'efficienza del sistema immunitario riducendo il rischio di infezioni. Inoltre migliora la fissazione delle conoscenze acquisite durante il giorno, il consolidamento della memoria a lungo termine per inibizione dell'attività dopaminergica dei neuroni, e previene la demenza favorendo l'eliminazione di metaboliti tossici accumulati durante il giorno (Berrino e Fontana. *La grande via*. Ed. Mondadori, 2017.).

-regime dietetico, fattori nutrizionali, idratazione: il regime alimentare con variazioni nell'apporto di macronutrienti e micronutrienti, l'idratazione, la supplementazione con multivitaminici e minerali esercitano una significativa influenza sulle funzioni immunitarie. Si parla di immunonutrizione riferendoci alle proprietà di determinati nutrienti di modulare lo stato immunitario se assunti in un'ideale percentuale maggiore di quella richiesta. L'**ipernutrizione**, causa di sovrappeso e obesità alimentare, ma anche la

denutrizione esercitano effetti negativi sulla funzione immunitaria.

Numerosi studi dimostrano invece che la **restrizione calorica senza malnutrizione** (25-30% di calorie in meno) ma caratterizzata da un equilibrato apporto di macro e micronutrienti e dalla loro varietà, per garantire la presenza di quelli essenziali, prolunga la vita, riduce l'incidenza del cancro negli animali e contrasta lo sviluppo di malattie autoimmuni. La restrizione calorica aumenta la sorveglianza immunitaria, la riparazione del DNA, degli enzimi detossificanti, dell'autofagia e della apoptosi, riduce le citochine pro-infiammatorie, lo stress ossidativo e migliora lo stato infiammatorio, la glicemia, l'insulinemia, il bilancio ormonale. Vi sono sempre più evidenze che brevi periodi di digiuno (un paio di giorni alla settimana) riducono il glucosio, l'insulina, l'IGF-1 e possono aumentare l'efficacia delle terapie oncologiche. Il digiuno infatti attiva la proteina AMPK (*Activated Protein Kinase*) che inibisce la via di segnale PI3K/Akt/mTOR che regola la crescita, la proliferazione, la motilità, la sopravvivenza cellulare ed è iperespressa nei tumori (*Berrino F. Dieta adiuvante le terapie oncologiche. Arte Medica No 42 - Estate 2016.*). In presenza di malnutrizione la carenza di macronutrienti e l'**insufficiente apporto di liquidi**, specie in corso di attività fisica, determinano immunodepressione. Infatti elevati livelli di cortisolo plasmatico si ritrovano in presenza di disidratazione e nell'attività fisica intensa e protratta in cui sussista una ridotta assunzione di liquidi: l'incremento del cortisolo può associarsi ad effetti immunodepressivi. Il **regime dietetico** quando è caratterizzato da un inadeguato apporto proteico (l'apporto minimo di proteine per un'attività sedentaria è di 0,8 g/kg e passa a 1,2 g/kg ed oltre in caso di attività fisica ed atletica) determina un deficit del sistema immunitario che include l'atrofia del tessuto linfatico, la diminuzione dei linfociti T e dell'attività dei macrofagi. Un'alimentazione ricca di carboidrati complessi è utile nell'attività fisica moderata e intensa e può ridurre l'effetto immunosoppressivo degli ormoni da stress. Numerosi studi mettono in evidenza che l'assunzione di carboidrati prima e durante l'attività fisica è importante per il mantenimento di una idonea funzione immunitaria. Nei soggetti che eseguono esercizi fisici e seguono una dieta con un apporto energetico derivante dai carboidrati minore del 10% si ha un incremento degli ormoni da stress (cortisolo e adrenalina) e di citochine plasmatiche (IL-1, IL-6, IL-10) rispetto ai soggetti che seguono un regime dietetico normale o con un maggiore contenuto di carboidrati.

Di conseguenza per i soggetti che eseguono attività fisica regolare è consigliabile una dieta bilanciata che assicuri un idoneo apporto di nutrienti e valori energetici adeguati. La quantità di carboidrati assunti prima degli esercizi è probabilmente il fattore più importante nel modificare la risposta immunitaria in quanto si riscontra un minor numero di leucociti circolanti, di neutrofili e linfociti T subito dopo l'esercizio ed anche una ridotta elevazione plasmatica di IL-6. Riguardo all'apporto di grassi nella dieta, risulta che la funzione immunitaria è compromessa in presenza di un elevato consumo di alimenti ricchi di lipidi. Se prendiamo in considerazione la qualità degli alimenti risulta che cibi ricchi di poliamine (succhi di arancia, solanacee quali pomodori, melanzane, peperoni ed anche banane, kiwi, frutti tropicali, alimenti di origine animale) svolgono un'azione negativa nella prevenzione neoplastica e nella nutrizione dei pazienti oncologici. Molti studi dimostrano infatti che nei tumori è alta la concentrazione di poliamine e che le cellule tumorali ne sono avidi; inoltre i malati di tumore hanno maggiori concentrazioni plasmatiche e urinarie di poliamine rispetto ai soggetti sani e coloro che presentano concentrazioni elevate hanno anche una prognosi peggiore. La concentrazione ematica di poliamine dipende dalla sintesi delle cellule tumorali e dall'assorbimento intestinale. Questi composti stimolano la proliferazione cellulare, riducono le difese immunitarie contro i tumori e incrementano la capacità di metastatizzazione. Si ha infatti un decremento della produzione di citochine con attività tumoricida, del tasso di molecole di adesione e una diminuzione dell'attività citotossica delle cellule immunitarie (Soda K. *The mechanisms by which polyamines accelerate tumore spread. J Exp Clin Cancer Res, 2011.*). Prendendo in esame gli **oligoelementi** ed in particolare minerali come il *ferro*, il *selenio* e lo *zinco*, essi hanno un ruolo nel mantenimento del bilancio antiossidanti/ossidanti nelle cellule immunitarie e nel proteggere l'organismo dallo stress ossidativo. Il *selenio* è necessario alla sintesi della glutatione perossidasi e favorisce la produzione di linfociti T. Anche lo *zinco* è essenziale per lo sviluppo del sistema immunitario. Un centinaio di metalloenzimi dipendono infatti da questo metallo inclusi quelli coinvolti nella trascrizione del DNA e nella sintesi proteica. L'elemento è in gioco nei segnali molecolari intracellulari delle cellule immunitarie tanto che la sua carenza si ripercuote sulla funzione del sistema immunitario ed in particolare dei linfociti T e delle cellule NK. I vegetariani presentano il rischio di carenza di zinco in quanto

possono assorbirne una quantità minore per l'alto contenuto in fibre della dieta. Lo stesso accade per i soggetti che seguono attività atletica in quanto lo zinco viene eliminato primariamente con il sudore e con le urine, quindi in questo caso la perdita dell'elemento aumenta. Il consumo di proteine animali (pollame, pesce, latticini) è utile per evitare la carenza di zinco mentre la supplementazione con alte dosi di zinco non è raccomandata per possibili effetti collaterali: infatti ferro e zinco in eccesso esercitano un'azione negativa sulla funzione immunitaria e incrementano la suscettibilità alle infezioni. Per molti nutrienti e oligoelementi esiste dunque un range limitato per un consumo idoneo favorevole (*Calder e Kew. The immune system: a target for functional foods? Br J Nutr, 2002.*). Fra gli oligoelementi anche il *magnesio* ha una relazione con il sistema immunitario ed un suo deficit è correlato con una riduzione delle sue funzioni. Gli esercizi fisici, se intensi e protratti si accompagnano a ipomagnesiemia che a sua volta è causa d' infiammazione per attivazione di monociti/macrofagi e produzione di citochine pro-infiammatorie, radicali liberi, eicosanoidi e aumento della PCR. La deficienza di magnesio è quindi causa di uno stato pro-infiammatorio sistemico e pro-ossidante. La supplementazione con magnesio determina un incremento della forza e potenza muscolare e dei livelli di emoglobina (*Laires e Monteiro. Exercise, magnesium and immune function. Magnesium Research, 2008; Brilla L.R. Magnesium influence on stress and immune function in exercise. Sport Medicine, 2012.*). Passando a considerare l'apporto di **vitamine** risulta che il consumo di alimenti ricchi di *vitamina C* (acido ascorbico) esercita azioni favorevoli in quanto essa è presente nei leucociti in alte concentrazioni, promuove la proliferazione dei linfociti T, la produzione di interferone, inibisce la replicazione virale ed ha azione antiossidante e *scavenger* dei ROS. È stato osservato che la supplementazione con vitamina C nei podisti determina un incremento di linfociti alla fine della corsa, riduce il cortisolo e le citochine infiammatorie. La vitamina C inoltre risulta avere azione antitumorale occupando il trasportatore di glucosio GLUT1 per giungere alle cellule, impedendo quindi alle cellule tumorali di utilizzare il glucosio di cui necessitano in grande quantità. Anche la *vitamina D* contribuisce alla regolazione del sistema immunitario e ha potere antinfiammatorio. La maggior sorgente di questa vitamina è legata alla esposizione alla luce solare (90%) mentre solo una piccola parte (10%) proviene dagli alimenti (olio di pesce, uova, cereali arricchiti). A livello cutaneo la vitamina viene sintetizzata a partire dal colesterolo ed è convertita nel suo metabolita attivo (colecalfiferolo o vit. D3) nel fegato e nei reni, ma anche in cellule del sistema immunitario. La vitamina D promuove l'omeostasi del

calcio e la salute delle ossa e recettori della vitamina sono espressi sulle cellule immunitarie (cellule B, T e cellule APC rappresentate dai macrofagi e dalle cellule dendritiche) che sono in grado di sintetizzare il suo metabolita attivo. La vitamina di conseguenza può modulare le risposte del sistema immunitario innato e adattativo. La sua carenza è associata ad un aumento delle malattie autoimmuni (sclerosi multipla, artrite reumatoide, etc.) e ad un incremento della suscettibilità alle infezioni (Aranow C. *Vitamin D and the immune system. J Investig Med*, 2011.). Riguardo alla *vitamina A* la sua carenza è associata ad una ridotta resistenza alle infezioni. Questa vitamina infatti ha un elevato potere antiossidante dovuto al betacarotene; inoltre è necessaria alla crescita e differenziazione dei globuli bianchi e la sua carenza determina una ridotta produzione di linfociti B e T. Infine favorisce la sintesi di glicoproteine tra cui quelle coinvolte nella produzione di muco

da parte delle mucose dell'apparato respiratorio, digeritivo e urinario che rappresentano la prima barriera di difesa immunitaria. Per la salute occorre assicurarsi un sufficiente apporto di nutrienti essenziali, vitamine e oligoelementi con gli alimenti evitando gli integratori. Questo vale soprattutto per i malati di tumore che non devono assumere integratori con alte dosi di vitamine o minerali antiossidanti in quanto questi possono avere effetti negativi sulla funzione immunitaria: è il caso della *vitamina E* che è un ottimo antiossidante e ha un ruolo nella differenziazione delle cellule T immature nel timo. Questa vitamina va assunta con gli alimenti (frutta secca, semi, cereali integrali) in quanto il suo apporto in eccesso con gli integratori non è scevro da rischi.

-microbioma intestinale: il microbioma intestinale protegge l'organismo da fenomeni infiammatori e lo difende da potenziali patogeni. Numerose condizioni fra cui lo stress, le infezioni, etc. possono interferire sul microbioma intestinale e innescare una reazione infiammatoria sostenuta da varie cellule immunitarie tra cui i macrofagi, i mastociti, i natural killer. Il consumo regolare di **probiotici** può modificare la popolazione batterica del microbioma ed influenzarne le funzioni immunitarie. Gli effetti immunitari dei probiotici sono caratterizzati da:

- a) riduzione della secrezione di citochine pro-infiammatorie;
- b) incremento della secrezione di citochine antinfiammatorie;
- c) attivazione dei macrofagi locali atti ad aumentare la presentazione

dell'antigene ai linfociti B con incremento della produzione di IgA;

d) induzione di linfociti T regolatori;

e) effetto *scavenger* dei radicali superossidi (*Takahaschi e Rindfleisch. Prescribing probiotics. In: Integrative Medicine. Elsevier, 2018.*).

I probiotici riducono la crescita e gli effetti nocivi di altri batteri, antigeni, tossine e carcinogeni intestinali. Inoltre interagiscono con il tessuto linfatico con effetti favorevoli sul sistema immunitario innato e acquisito ed effetti salutari sull'intero organismo. Vari studi dimostrano che il consumo di probiotici può incrementare la resistenza a patogeni intestinali e svolgere un'azione antitumorale.

-obesità: l'obesità addominale o viscerale, rilevabile semplicemente con la misurazione del girovita, è probabilmente più pericolosa rispetto all'obesità complessiva perchè determina un quadro di infiammazione cronica di basso grado. Essa porta ad un aumento delle adipocitochine infiammatorie, che promuovono la produzione di radicali liberi (ROS) e quindi dello stress ossidativo, dei livelli di cortisolo, della PCR (dovuto ad incremento dei GB) e favorisce l'insorgenza di numerose patologie (metaboliche, cardiovascolari, degenerative e tumorali).

Nel tessuto adiposo addominale si verifica infatti infiltrazione di cellule immunitarie (macrofagi e cellule T). I macrofagi sono presenti a decine di milioni per ogni Kg di grasso in eccesso richiamati dalla scarsa ossigenazione tissutale e dalla morte di cellule adipose. Si ha così il rilascio di citochine infiammatorie fra cui la leptina capace di stimolare la secrezione di IL-1 e TNF-alfa che è un potente attivatore del fattore di trascrizione NF-kB. TNF inoltre favorisce il rilascio di molecole proinfiammatorie come IL-6 e riduce molecole antinfiammatorie quali l'adiponectina. L'infiltrazione immunitaria porta ad una diffusa espressione dei TLR (*Toll-like receptors*) che inducono un quadro infiammatorio persistente. Esso può essere incrementato dalla contemporanea alterazione del microbioma intestinale caratterizzato dalla prevalenza di batteri del genere *Clostridium* rispetto ai *Bifidobacterium* che traslocando nel tessuto adiposo sono processati dai TLR e contribuiscono alla risposta infiammatoria. Chi esegue un regolare esercizio fisico può ridurre la circonferenza vita ed il grasso addominale e i livelli di infiammazione sistemica.

-alcol: la frequenza e la gravità delle infezioni negli **alcolisti** risulta aumentata. Il fenomeno è da attribuire in parte ad un danno del sistema immunitario. Le alterazioni responsabili dello stato immunodepressivo nell'alcolista

possono essere: a) *di tipo nutrizionale* (malnutrizione proteica ed energetica con ripercussioni negative sul sistema immunitario perchè la maggior parte dei mediatori sono sostanze a componente proteica, ed anche carenza di vitamine, bassi livelli di vitamina B12 e di minerali); b) dovute ad *alterazioni della prima barriera immunologica* (cute, mucosa orale, gastrointestinale e respiratoria); *della seconda barriera immunologica* (alterazione della funzione fagocitaria causata prevalentemente da neutropenia ed anche dalla soppressione della funzione dei macrofagi); *della terza barriera immunologica* (alterazione dell'immunità specifica umorale e cellulare con riduzione dei livelli dei linfociti CD8+, dei linfociti B, delle cellule natural killer) (Caremani M. *Alcol: immunità ed infezioni. Manuale di alcolologia, 2015.*).

-fumo: l'**abitudine al fumo** ha un' influenza negativa sul sistema immunitario e incrementa la suscettibilità alle infezioni. Esso determina la perdita della funzione della barriera epiteliale a livello della mucosa bronchiale. La produzione di surfattante viene danneggiata e così pure la funzione fagocitaria dei macrofagi e dei neutrofili ed il rilascio di ROS. L'esposizione in modo continuativo al fumo di sigaretta determina un'alterazione della funzione dei linfociti T, riduce l'attività delle cellule NK e la produzione di interferone gamma (Mehta H et al. *Cigarette smoking and innate immunity. Inflamm Res, 2008; Shiels et al. Cigarette smoking and variations in systemic immune and inflammation markers. JNCL, 2014.*).

-fattori neuroendocrini: è ampiamente dimostrata la **connessione fra sistema immunitario e sistema nervoso** tanto che citochine infiammatorie (IL-1, IL-6, TNF-alfa) sono in grado di raggiungere il cervello per via umorale, nervosa e linfatica e possono determinare modificazioni a carico dei principali assi neuroendocrini (in particolare IL-1 è in grado di attivare l'asse dello stress: ipotalamo-ipofisi-surrene con produzione finale di cortisolo) e dei sistemi di neurotrasmissione cerebrale. **A livello cerebrale è inoltre presente un sistema immunitario** composto da cellule microgliali che si comportano come macrofagi, cellule natural killer, mastociti, sistema del complemento e negli spazi meningei si ritrovano macrofagi, linfociti T, B, mastociti. Inoltre vengono normalmente prodotte citochine. Anche gli **ormoni esercitano effetti sul sistema immunitario** che possono essere di regolazione, di stimolo, o inibitori. Sulle cellule immunitarie si trovano recettori per prodotti del SNC; ad esempio sulla membrana dei linfociti sono presenti recettori per ormoni e neurotrasmettitori originati dal cervello. L'azione degli ormoni risulta diversa a seconda dei circuiti immunitari su cui agiscono, la loro

concentrazione plasmatica e le condizioni del sistema immunitario. È il caso della melatonina che, in condizioni normali, ha un ruolo di stimolo sul circuito immunitario di tipo 1 e quindi di sorveglianza verso i tumori mentre in presenza di malattie autoimmuni può esacerbare l'infiammazione. Le cellule immunitarie sono anche in grado di produrre composti analoghi a quelli del cervello. Si dimostra così la presenza nell'organismo di una comunicazione bidirezionale sistema nervoso-immunità che ha ripercussioni su patologie di vario tipo: si entra qui nel campo della Psiconeuroendocrinoimmunologia (PNEI).

-attività fisica: l'**attività fisica** esercitata in modo regolare e con moderazione ha un ruolo favorevole sulla funzionalità del sistema immunitario, nella prevenzione oncologica e nel ritardare l'invecchiamento. L'attività fisica inoltre riduce la glicemia, l'insulinemia, l'infiammazione cronica. Gli individui che fanno esercizio fisico moderato e regolare si ammalano di meno di tumori e chi ha un cancro del colon, della mammella e della prostata se fa esercizio fisico ha una prognosi migliore. Inoltre chi segue una moderata attività fisica durante i cicli di chemioterapia ne migliora l'efficacia (*Berrino F. Dieta adiuvante le terapie oncologiche. Arte Medica n. 42, 2016.*).

-stress fisico e psichico: lo **stress** può interferire sulle funzioni immunitarie attraverso segnali neuroendocrini. Uno dei principali meccanismi con i quali il cervello controlla il sistema immunitario è l'attivazione dell'asse ipotalamo-pituitario-surrenalico attraverso il *Corticotrophin Releasing Hormone*, l'ACTH (ghiandola pituitaria), ormoni glicocorticoidi (surrene). Lo stress di conseguenza incrementa la produzione di ormoni neuroendocrini ed in particolare di cortisolo e di catecolamine, ma anche di prolattina, di *Growth hormone* e dell'ormone neurotrofico NGF (*Nerve Growth Factor*). Per l'azione di questi ormoni si hanno effetti sulle funzioni immunitarie quali: modificazioni dell'attività delle cellule NK, della composizione dei linfociti nel sangue e della loro proliferazione, ma anche della produzione di anticorpi. Le modificazioni possono essere responsabili della riattivazione di infezioni virali latenti. Lo stress acuto appare stimolare più che sopprimere l'attività del sistema immunitario. Lo stress a carattere prolungato o cronico, al contrario, riduce l'attività del sistema immunitario ed è associato anche ad aumento del tasso dei markers infiammatori plasmatici quali IL-6, TNF-alfa, PCR, fibrinogeno. Se prendiamo in esame lo **stress fisico** (attività fisica) risulta un incremento dei livelli degli ormoni

dello stress, quali cortisolo e catecolamine, e una temporanea riduzione della funzione del sistema immunitario che varia da poche ore a 24 ore a seconda dell'intensità e della durata degli esercizi fisici (Gleeson e Bosh in: *Exercise immunology*. Ed. 2013.). In corso di attività fisica i valori del cortisolo tornano in un range normale dopo alcune ore dalla fine dello sforzo e la contrazione muscolare rilascia cannabinoidi endogeni che passano dal sangue periferico al cervello dove inducono il rilascio di dopamina, serotonina e del fattore nervoso di derivazione cerebrale BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*). L'incremento di questo fattore è correlato con la capacità di recupero dei ricordi (salute mentale) in rapporto all'attività fisica. In conclusione i cambiamenti molecolari e dei circuiti cerebrali che sono indotti dall'attività fisica spiegano gli effetti positivi sia sui disordini motori sia su quelli emozionali che si verificano, ad esempio, nei pazienti con m. di Parkinson, malattia del sistema motorio dei gangli della base. L'attività fisica costituisce pertanto, entro certi limiti, uno stress positivo che tuttavia deve essere regolato.

Se prendiamo in considerazione lo **stress psichico o emozionale** esso determina un incremento di neurotrasmettitori e ormoni dello stress con aumento dei fattori di crescita per azione delle catecolamine. In condizioni di stress l'eccesso di cortisolo ha come effetto secondario quello di squilibrare il sistema immunitario. L'ormone ha anche un effetto proliferativo in quanto stimola la produzione di insulina e di IGF-1 e riduce l'espressione di proteine (p53, BRCA-1) che hanno un ruolo antiproliferativo. Inoltre determina la disregolazione della risposta immunitaria con indebolimento del circuito Th1 e potenziamento del circuito Th2 che è causa di infiammazione. Nei soggetti affetti da depressione si ha sovrapproduzione di cortisolo che determina la riduzione della telomerasi che è un enzima in grado di riparare e riallungare i telomeri. Ne consegue un accorciamento degli stessi e la presenza di minore telomerasi nei linfociti T con indebolimento del sistema immunitario (Blackburn e Epel. *La scienza che allunga la vita. La rivoluzione dei telomeri*. Ed. Mondadori, 2017.).

Le **Tecniche antistress e la meditazione** incrementano l'attività citotossica delle cellule NK e il profilo anticancro Th1 che viene assunto dal sistema immunitario che è caratterizzato da alti livelli di interferone gamma e bassi livelli di IL-10 e IL-4. Inoltre la meditazione determina un aumento di attività della telomerasi. Lo **yoga** ha effetti benefici fisici e di ordine generale su cuore, cervello, apparato respiratorio e digerente.

La disciplina agisce attraverso un meccanismo epigenetico intervenendo sull'espressione dei geni. Da una metanalisi pubblicata sulla rivista *Frontiers in Immunology* gli Autori sostengono che lo yoga modula l'espressione del fattore di trascrizione NF-kB, regolatore dell'insieme degli eventi che portano ad infiammazione cronica e all'iperattivazione del sistema immunitario. Risulta anche che tecniche yoga aumentano la produzione di telomerasi ed il processo di ricostruzione dei telomeri (Buric I. et al. *What is the molecular signature of mind-body interventions? A systematic review of gene expression changes induced by meditation and related practises.* Front Immunol, 2017.).

Anche la **musica rilassante** quando è associata a **respirazione lenta** può determinare un riequilibrio del sistema nervoso autonomo attraverso l'incremento dell'attività parasimpatica e produrre una migliore risposta allo stress, cui può seguire anche un cambiamento della funzione immunitaria. Tra le risposte alla musicoterapia risultano la diminuzione del cortisolo, dell'adrenalina e noradrenalina e l'incremento delle immunoglobuline A.

Si può concludere che l'inserimento nel quotidiano di una sana alimentazione, dell'attività fisica, di tecniche antistress, di meditazione e la socializzazione aumentano la sopravvivenza nei malati con tumore e riducono l'incidenza di recidive tumorali (Bottaccioli F. e Bottaccioli A.G. Psiconeuroendocrinoimmunologia (...). Ed. Edra, 2017.).

-agenti patogeni: il **virus HIV/AIDS** dell'immunodeficienza umana acquisita è un Retrovirus (cioè un virus a RNA) che una volta penetrato nell'organismo raggiunge gli organi bersaglio (sistema linfematopoietico, SNC) dove inizia a replicarsi attivamente. Le cellule più colpite sono i linfociti T helper (CD4). Il graduale depauperamento della riserva dei linfociti CD4 porta ad un indebolimento delle difese immunitarie che predispone all'azione di altri agenti infettivi e a virus oncogeni.

-tumori: nelle malattie tumorali si riscontra immunodeficienza.

-radiazioni determinano immunosoppressione, anergia e tolleranza immunologica.

-farmaci immunosoppressori: i **corticosteroidi** e alcuni **farmaci chemioterapici** possono determinare immunodeficienza secondaria. La neutropenia rappresenta spesso una seria tossicità ematologica da chemioterapia che può associarsi a processi infettivi. I livelli dei linfociti T, NK, B risultano significativamente ridotti dopo due settimane dal trattamento.

Il deficit immunitario può risultare alterato per almeno nove mesi dalla terapia (Verma et al. *Lymphocyte depletion and repopulation after chemotherapy for primary breast cancer. Breast Cancer Research*, 2016.).

-composti naturali possono stimolare il sistema immunitario ed essere efficacemente impiegati in patologie tumorali per la possibilità di migliorare la risposta terapeutica. Fra questi il **Viscum album fermentatum**, l'**Astragalus membranaceus**, **funghi medicinali**, MGN-3. Fra i fitocomposti il **curcumin**, derivato dalla *Curcuma longa*, ha dimostrato, oltre alle azioni ben conosciute fra cui l'inibizione dell'attivazione del fattore di trascrizione NF-κB e delle ciclossigenasi COX-2, l'interazione con il sistema immunitario (Benelli e Gavazzi. *Curcuma e Curcuminoidi (...). Ed. Partner-Graf*, 2017.). Sebbene alcuni studi abbiano messo in evidenza un ruolo immunosoppressivo del composto, altri studi hanno dimostrato che il curcumin incrementa l'attività immunitaria antitumorale con vari meccanismi fra cui l'aumento della popolazione delle cellule T (CD4) e (CD8), la riduzione dell'apoptosi dei linfociti T, l'incremento dell'interferone gamma, la riduzione dei livelli delle cellule regolatorie *Treg cells* (cellule T CD4) in grado di sopprimere attività potenzialmente deleterie delle cellule T con effetto inibitorio sul sistema immunitario (Corthay A. *How do regulatory T cells work? SJI*, 2009.). Il curcumin, di conseguenza, ha la capacità di spostare l'equilibrio immunitario in senso antitumorale (Bose et al. *Curcumin and tumor immune-editing: resurrecting the immune system. Cell Div*, 2015.).

I numeri del sistema immunitario: “la regola 0-5-30”

Secondo il Prof. Alberto Mantovani, la migliore raccomandazione per garantire una buona funzionalità del sistema immunitario è seguire la semplice regola “**zero-cinque-trenta**”: **zero sigarette**, perchè il fumo attiva l'infiammazione; **cinque porzioni di frutta e verdura al giorno**, perchè i vegetali hanno effetti positivi sulla funzione delle cellule immunitarie di prima difesa, che si trovano nelle mucose; **trenta minuti di esercizio fisico quotidiano**, perchè il movimento migliora l'attività del sistema immunitario. Inoltre occorre **moderazione** sia a tavola che nel comportamento, evitando l'obesità addominale che attiva risposte immunitarie inappropriate, e nello sport, perchè allenarsi intensamente attiva citochine specifiche che frenano la risposta immunitaria.

Attività fisica e immunità

Negli anni 2000 si è avuta la conferma dei benefici effetti sulla salute correlati con una regolare, ma moderata attività fisica (vedi BOX). Quale sia il suo ruolo sulle funzioni immunitarie è tuttavia ancor oggi oggetto di studio anche perché occorre valutare l'influenza esercitata da numerosi fattori quali la modalità, l'intensità, la durata, la frequenza con cui è esercitata l'attività fisica e il regime alimentare adottato. In linea generale l'esercizio fisico intenso riduce l'attività e il numero di numerose cellule immunitarie. Al contrario le funzioni immunitarie sono stimulate da un'attività fisica moderata che svolge anche un'azione antinfiammatoria. L'esecuzione regolare di esercizi fisici ed un corretto regime alimentare possono migliorare la salute della popolazione in generale ed anche dei soggetti anziani. In questi ultimi un'attività fisica leggera, o moderata, contrasta l'immunosenescenza, è associata a riduzione della mortalità, ad un minor rischio di infezioni dell'apparato respiratorio superiore e di sviluppare un tumore. Gli esercizi ad alta intensità invece causano un incremento della produzione di radicali liberi, l'alterazione dell'equilibrio fra ossidanti ed antiossidanti ed un

Attività fisica: aerobica e anaerobica

*L'**attività aerobica** è caratterizzata da uno sforzo moderato per un tempo prolungato: la camminata a passo veloce, il nuoto, la bicicletta, gli esercizi che si eseguono in palestra senza affanno, il nord walking, la danza.*

*L'**attività anaerobica**, o di potenza, è caratterizzata da sforzi intensi di breve durata quali: la corsa veloce, i salti, l'allenamento con pesi.*

.....

L'attività fisica quando è esercitata con regolarità e con moderazione concorre a migliorare lo stato di salute e permette di ottenere effetti benefici anche nei soggetti affetti da patologia tumorale.

Contribuisce al calo ponderale nei soggetti sovrappeso e obesi, al controllo del diabete di tipo 2 e al miglioramento della dislipidemia (diminuzione dei trigliceridi ematici ed incremento del colesterolo HDL), al controllo della pressione arteriosa, delle malattie cardio-respiratorie e, negli individui più anziani, al miglioramento della postura, della forza e della potenza muscolare e della sintomatologia dolorosa legata a patologia osteoarticolare. Sono sufficienti trenta minuti di attività fisica quotidiana (ad esempio una camminata a passo svelto, o almeno 10.000 passi al giorno) per ottenere effetti salutari.

Attività fisica: effetti favorevoli

L'attività fisica esercita effetti favorevoli sull'organismo mediante numerosi meccanismi:

- a) diminuzione dei livelli sierici di insulina e di IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) ed incremento del trasportatore del glucosio GLUT4 (GLUT4 è posto sulla membrana delle cellule muscolari e favorisce il passaggio dello zucchero nelle cellule per produrre energia) con effetti favorevoli sulla glicemia e sul diabete;*
- b) riduzione del grasso viscerale con diminuzione dei lipidi sierici, del livello di adipochine (leptina) e di altre citochine infiammatorie, della produzione nelle cellule adipose di ormoni estrogeni e dei markers dell'infiammazione;*
- c) rilascio di miochine nella contrazione muscolare con azione antinfiammatoria. Incremento dei livelli di adiponectina, che ha attività antinfiammatoria e antimitogena;*
- d) effetti benefici sulla memoria, sull'attenzione e sulla capacità di elaborare i dati. Durante il movimento si ha infatti la produzione di catepsina B da parte del muscolo che stimola il fattore neurotrofico cerebrale BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) che migliora le funzioni cognitive ed i processi di memorizzazione;*
- e) stimolo alla produzione di endorfine con miglioramento del tono dell'umore;*
- f) influenza favorevole sul patrimonio genetico con aumento di lunghezza dei telomeri;*
- g) produzione di vitamina D quando l'attività fisica è esercitata all'aperto con esposizione alla luce solare.*

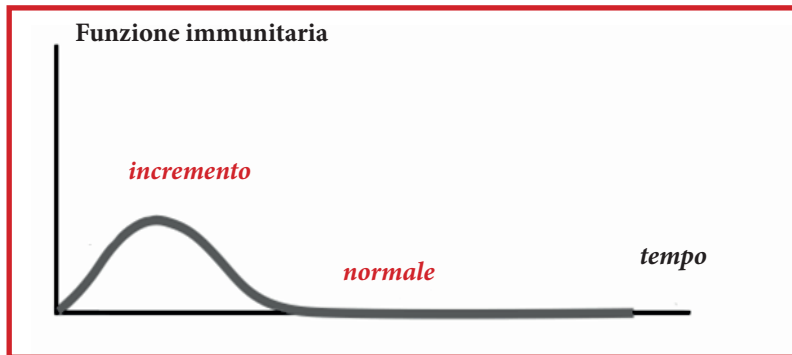
coinvolgimento del sistema immunitario con un aumento dei leucociti nel sangue, soprattutto granulociti neutrofili e cellule natural killer (NK), ed anche una marcata mobilitazione dei linfociti. Ci sono anche evidenze che durante gli esercizi fisici viene stimolata l'attività dei macrofagi. Dopo esercizi intensi si assiste spesso ad un periodo di caduta delle funzioni immunitarie con diminuzione dell'attività delle cellule NK e della proliferazione dei linfociti. Tale fenomeno è presente in numerosi organi (pelle, membrane mucose dell'apparato respiratorio superiore, polmoni, sangue, muscoli) e costituisce una finestra di ridotta attività immunitaria ("open window") che favorisce la penetrazione nell'organismo di virus e batteri ed un aumento del rischio di infezioni respiratorie.

L'immunosoppressione può durare da 3 a 72 ore dopo l'esercizio. Di conseguenza gli atleti e gli sportivi sono più soggetti al rischio di sviluppare infezioni soprattutto dell'apparato respiratorio superiore. Come risultato dell'attività fisica intensa si verifica anche la diminuzione di espressione dei *Toll-like receptors* (TLR) sui monociti/macrofagi che, come sappiamo sono proteine transmembrana che hanno il compito di individuare gli agenti patogeni. Inoltre si può avere la diminuzione di espressione del complesso maggiore di istocompatibilità MHC. Tali modificazioni possono contribuire al rischio di infezioni. Sempre a questo proposito è stata dimostrata una riduzione delle IgA e delle IgM nella saliva immediatamente dopo esercizi intensi che tornano a normali livelli entro 24 ore, mentre persistono se gli esercizi sono prolungati (Henriksson e Sundberg. *General effects of physical activity. In: Physical*

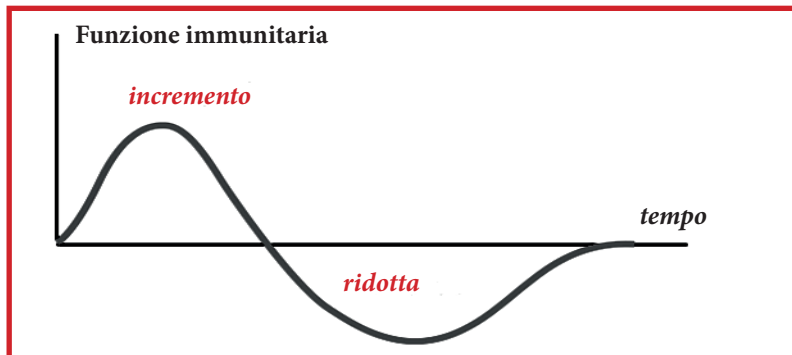
ATTIVITÀ FISICA E IMMUNITÀ	
Attività fisica moderata	 Aumento dei linfociti T, B, immunoglobuline
	 Diminuzione delle citochine infiammatorie e dei biomarkers dell'infiammazione
Attività fisica intensa (90 minuti o più)	 Aumento del numero di cellule NK circolanti
	 Diminuzione dell'attività delle cellule NK e del loro numero dopo esercizio
	 Aumento del numero dei monociti, dei neutrofili circolanti e della loro attività fagocitaria
	 Riduzione dell'espressione dei TLR sui monociti/macrofagi e del complesso MHC
	 Aumento della produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF, IL-1, IL-6) seguita dal rilascio di citochine antinfiammatorie
	 Aumento della PCR
	 Aumento della produzione di cortisolo e di catecolamine dalle ghiandole surrenali
	 Diminuzione dei linfociti, delle cellule T circolanti, di IgA e IgM

ATTIVITÀ FISICA E FUNZIONE IMMUNITARIA

Attività fisica moderata



Attività fisica intensa



da: Friman et al. *Infections and sports*. In: *Physical activity in the prevention and treatment of disease*. SNIPH, 2010.

activity in the prevention and treatment of disease. SNIPH, 2010.). Uno studio condotto su 1002 individui adulti di entrambi i sessi e di età compresa fra 18 e 85 anni che si sottoponevano a moderati esercizi aerobici di 1-2 ore al giorno per 12 settimane ha dimostrato una diminuzione della durata di infezioni dell'apparato respiratorio e della gravità dei sintomi accusati rispetto a soggetti sedentari. Esiste quindi una relazione inversa fra attività fisica/livelli di fitness e infezioni del tratto respiratorio superiore (Nieman et al. *Upper respiratory tract infection is reduced in physically fit and active adults*. *Br J Sports Med*, 2011.). Durante l'attività fisica si ha anche un aumento di citochine antinfiammatorie e pro-infiammatorie. Nell'attività prolungata ed intensa aumentano le citochine pro-infiammatorie (IL-1 beta, TNF-alfa, altre) e si verifica

un incremento del rilascio di cortisolo e di catecolamine dalle ghiandole surrenali. La depressione immunitaria dopo attività fisica è più marcata quando essa è continua, prolungata (>90 minuti), di alta intensità ed esercitata senza un idoneo consumo di alimenti (Romeo et al. *Role of physical activity, immunity and infection. Proc Nutr Soc, 2010; Gleeson e Bosh. In: Exercise immunology. Ed. 2013.*). Durante l'attività fisica vengono generate specie ossigenoreattive (ROS) soprattutto come risultato del metabolismo aerobico nei mitocondri durante o dopo esercizi di intensa attività. Anche numerose cellule del sistema immunitario (macrofagi, neutrofili, altre) contribuiscono alla produzione di ROS soprattutto in presenza di danni tissutali. È noto che le ROS hanno un ruolo importante nel regolare l'attività contrattile del muscolo, ma sono anche coinvolte nel promuovere la rigenerazione muscolare in presenza di un danno. Sostanziosi sistemi enzimatici (superossido-dismutasi, catalasi, perossidasi, etc.) e non enzimatici (vitamina C, vitamina E, polifenoli, etc.) sono deputati alla regolazione delle ROS per poter mantenere adeguati livelli necessari per l'organismo. In corso di attività fisica si possono produrre differenti livelli di specie ossigenoreattive a bassa o ad alta intensità. Nel primo caso avremo una condizione di stress favorevole, mentre nel secondo caso ci troveremo in una condizione di *distress* che determina una compromissione dell'attività muscolare ma anche un'accelerazione dei processi di invecchiamento e delle malattie età correlate qualora l'anomala condizione persista nel tempo (Guolin Li. *The positive and negative aspects of reactive oxygen species in sports performance. In: Physical activity in the prevention and treatment of disease. SNIPH, 2010.*). Il regolare esercizio fisico, ed in particolare l'attività aerobica, esercita azione protettiva nei confronti di malattie associate con l'infiammazione sistemica di basso grado. Un effetto protettivo è stato rilevato anche per alcuni tumori (colon, mammella nella post menopausa, endometrio, polmone e pancreas). È stato ipotizzato che la mobilitazione di cellule immunitarie antitumorali, come i linfociti NK ed i macrofagi, durante gli esercizi fisici favorisca la sorveglianza antitumorale e l'eliminazione di cellule neoplastiche. L'attività fisica e la corretta alimentazione hanno influenza sulle malattie tumorali anche attraverso la stimolazione dell'attività mitocondriale che ottimizza l'ossigenazione cellulare in quanto le cellule tumorali "amano lo zucchero e soffrono l'ossigeno". È possibile anche che la diminuzione dell'infiammazione cronica derivante

da una regolare e moderata attività fisica e da un corretto regime alimentare riduca il rischio di cancro (*Bishop N.C. Exercise , infection risk, immune function and inflammation in special populations. In: Exercise immunology, 2013.*). Nell'animale da esperimento sono state osservate anche : a) la riduzione della proliferazione cellulare dovuta all'attivazione del gene oncosoppressore p53 e alla riduzione della produzione del fattore di crescita IGF-1; b) la sensibilizzazione delle cellule tumorali che esprimono una maggiore quantità di ligandi per le cellule NK e ciò determina un aumento della loro attività (*Bottaccioli F e Bottaccioli AG. Psiconeuroendocrinoimmunologia (...). Ed. Edra, 2017.*). L' esercizio fisico è associato ad una significativa riduzione dei tassi di ricorrenza, mortalità e sviluppo di nuovi tumori. Per ottenere un effetto protettivo è sufficiente esercitare un'attività moderata (una camminata di 30 minuti al giorno a 4 Km/h). L' *American College of Sports Medicine* riporta che l' esercizio fisico è generalmente sicuro per i sopravvissuti per cancro e che l'inattività deve essere evitata. Secondo le linee guida proposte sono indicati 150 minuti di attività moderata o 75 minuti di attività aerobica vigorosa a settimana e due giorni a settimana di "allenamento di forza o di resistenza" (*Strength training*), ad esempio con pesi leggeri. Un programma di esercizi eseguiti in modo graduale e progressivo può migliorare alcuni effetti legati alla patologia tumorale ed alle terapie effettuate. Si può avere un miglioramento della sensazione di affaticamento, della debolezza e potenza muscolare, della nausea, della depressione, dell'ansia, dei linfedemi e può migliorare la qualità della vita anche se è necessario osservare alcune precauzioni in pazienti con neuropatia periferica e con linfedemi. Si può anche ridurre il rischio di patologia cardiovascolare (*Schwartz A.L. et al. Initiating exercise interventions to promote wellness in cancer patients and survivors. Oncology, 2017.*). L'attività fisica regolare riduce il rischio di malattie metaboliche e cardiorespiratorie che è dovuto in parte agli effetti antinfiammatori a cui contribuiscono vari meccanismi; fra questi la riduzione del grasso viscerale e la conseguente riduzione dell'infiltrazione dei monociti/macrofagi nel tessuto adiposo addominale e la diminuzione di adipochine infiammatorie. L' attività fisica, quando è associata ad un sano regime alimentare (dieta mediterranea), determina una riduzione della mortalità che è risultata significativa in un campione di 1700 soggetti di età compresa fra i 40 ed i 70 anni seguiti per 20 anni; quanto detto è attribuibile ad attività antinfiammatoria (*Prinelli et al. Mediterranean*

diet and other lifestyle factors (...).Br J Nutr, 2015.). Fra gli effetti noti dell'attività fisica risulta l'aumento di interleuchina-6 che ha azioni infiammatorie ma anche antinfiammatorie stimolando la sintesi di interleuchina 10 e di IL-1ra (antagonista di IL-1). Essa svolge un ruolo complesso a livello metabolico comportandosi come un ormone. Durante l'attività fisica la citochina viene rilasciata per contrazione della muscolatura scheletrica che rappresenta la prima fonte di produzione della molecola a cui è stato dato il nome di *miocina*. Il rilascio dal muscolo si realizza quando si verifica una riduzione di glicogeno muscolare. IL-6 determina un aumento del rilascio di glucosio dal fegato e di acidi grassi da parte del tessuto adiposo. Nell'esercizio prolungato le sue concentrazioni plasmatiche aumentano gradualmente nelle fasi iniziali, raggiungendo un livello massimo alla cessazione dell'attività. L'elevazione dei valori persiste per diversi giorni ed è dovuta all'attività muscolare e all'attività dei macrofagi come risposta infiammatoria. IL-6 viene rilasciata anche a livello cerebrale e induce anche la secrezione di cortisolo, IL-1, IL-10 e di PCR. Studi recenti dimostrano che IL-6 promuove l'assorbimento del glucosio e l'ossidazione degli acidi grassi nel muscolo scheletrico. Inoltre la citochina stimola direttamente la secrezione di insulina da parte delle cellule beta pancreatiche dimostrando un'azione complessa nella regolazione del metabolismo (*Averna et al. Principi di obesologia. Ed. Parma Project Group, 2014.*).

L'attività fisica, moderata e intensa, determina una significativa **alterazione del bilancio del ferro**. Questo elemento è indispensabile perchè partecipa a numerose funzioni biologiche inclusi la regolazione genica, il legame ed il trasporto dell'ossigeno, la regolazione della crescita e della differenziazione cellulare. Nel corpo umano il ferro partecipa alle reazioni per la formazione dell'emoglobina, della mioglobina e per la corretta funzione di molti enzimi che entrano in gioco nel metabolismo cellulare. Risulta che la concentrazione di mioglobina nella muscolatura scheletrica si riduce drasticamente in presenza di deficit di ferro con conseguente compromissione della funzionalità soprattutto nell'esecuzione dell'attività fisica in cui c'è una maggiore necessità di ossigeno. La riduzione dei livelli sierici di ferro può essere dovuta ad una modificazione del suo assorbimento, alla perdita dell'elemento attraverso il tratto gastroenterico o con il sudore e ad emolisi intravascolare. Negli atleti viene comunemente riportato un deficit di ferro senza anemia e solo occasionalmente associato ad essa; in questa evenienza è necessaria

la supplementazione con ferro (*Deli et al. Iron supplementation and physical performance. In: Current issues in sports and exercise medicine. Intech, 2013.*). L'attività fisica determina anche l'attivazione di peptidi oppioidi endogeni che esercitano effetti pleiotropici sulla funzione immunitaria. Recettori oppioidi sono infatti presenti sulle cellule immunitarie e rappresentano i target per il controllo del dolore (*Sharp BM. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. Brain Behav Immun, 2006; Melih et al. Leukocyte opioid receptors mediate analgesia (...). Brain Behavior Immun, 2016.*). Pochi sono gli studi di epigenetica e attività fisica. A questo proposito occorre citare lo studio di *Nakajima et al.* in soggetti giovani, anziani praticanti attività fisica e anziani sedentari (*Exercise effects on methylation of ASC gene. Int J Sport Med, 2010.*). Da esso risulta che l'attività aerobica alternata (tre minuti di attività a basso regime, cioè una camminata a passo svelto, alternata a tre minuti di corsa) induce la metilazione del gene ASC che codifica IL-1beta e IL-18 che sono citochine rilevanti nella risposta infiammatoria. La metilazione del gene risulta più evidente nei giovani e negli anziani praticanti attività fisica rispetto al gruppo di anziani sedentari a significare il maggior controllo dell'infiammazione nei soggetti sportivi a qualsiasi età.

Immunità e composti naturali

Numerosi composti naturali sono in grado di esercitare attività immunostimolante e possono essere impiegati in pazienti con tumore.

Fra essi meritano attenzione il *Viscum album fermentatum*, l'*Astragalus membranaceus*, i funghi medicinali e l' MGN-3.

Viscum album fermentatum

La terapia antroposofica con *vischio* è un trattamento comunemente prescritto nella terapia oncologica complementare in Paesi quali la Germania e la Svizzera in cui il composto, dispensato dal Sistema Sanitario, è stato ed è utilizzato in alta percentuale di casi. Il vischio dinamizzato in modo opportuno è impiegato per il trattamento adiuvante delle malattie tumorali. L'impiego del *Viscum album fermentatum* è dovuto alle intuizioni di *Rudolf Steiner* che, con la collaborazione della dottoressa *Wegman*, mise a punto, agli inizi del 1900, una formulazione farmaceutica.

L'estratto di vischio elaborato agisce sia direttamente sulle cellule tumorali provocandone la morte (effetto antiproliferativo), sia indirettamente sul tumore migliorando la capacità di controllo della malattia da parte del sistema immunitario. L'effetto del vischio è quello di stimolare e modulare il sistema immunitario e favorire la riparazione del DNA. Nel determinare l'efficacia terapeutica riveste importanza il tipo di pianta che ha accolto il vischio (albero ospite) grazie alla quale, nella filosofia di Steiner, è possibile sviluppare una relazione con determinati organi. Nel trattamento di adenocarcinomi sono indicate tipologie di vischio provenienti da latifoglie (quercia e melo) mentre nei tumori epiteliali sono preferiti i derivati delle conifere (abete e pino). Nel carcinoma della mammella sono indicati il vischio di pino e quello di melo.

I più importanti componenti attivi del vischio sono rappresentati dalle lectine: esse esercitano effetti apoptotici sulle cellule neoplastiche, di immunomodulazione e di contrasto all'immunosoppressione causata dal tumore. Preparati di vischio stimolano sia la maturazione di cellule dendritiche a cui contribuiscono le lectine, sia la proliferazione di cellule T ed il rilascio di interferone gamma. Esso ha un ruolo importante nel promuovere risposte immunitarie protettive antitumorali a causa dell' aumento dell' espressione di MHC sulle cellule dendritiche e tumorali (*Steinborn et al. Viscum album neutralizes tumor-induced immunosuppression in a human in vitro cell model. PLoS ONE, 2017.*).

Viscum album fermentatum

È un estratto acquoso fermentato di pianta di vischio fresca proveniente da diversi alberi ospiti (melo, quercia, pino, abete, olmo).

Il prodotto viene iniettato con una siringa sotto la pelle in prossimità dell'area tumorale o, ogni volta, in zone differenti. I linfonodi regionali possono aumentare di volume.

Fra gli effetti collaterali risultano:

- a) aumento della temperatura corporea e infiammazioni localizzate nel sito di iniezione, soprattutto all'inizio della terapia;
- b) reazioni allergiche, affezioni croniche granulomatose (pseudonodulari) e malattie autoimmuni.

Il composto esercita anche un'azione protettiva riducendo gli effetti collaterali dovuti alla chemio e alla radioterapia. Secondo il Dr. Emilio Zavattaro (membro della SIMA= *Società Italiana di Medicina Antroposofica*) la prescrizione del *Viscum*, sebbene orientata da linee guida generali, non è rigidamente legata ad uno specifico protocollo e viene affinata sulla base delle reazioni riferite dal paziente. Il trattamento può essere associato alle terapie convenzionali, migliora la qualità di vita, riduce il dolore se è presente e non manifesta particolari effetti collaterali. Il vischio può essere utilizzato anche come composto preventivo. Uno degli aspetti della terapia immunologica che utilizza il vischio è che esso permette il riconoscimento delle cellule tumorali da parte del sistema immunitario e ricrea una corrispondenza fra il sistema immunitario e l'IO e ciò porta alla riattivazione dei macrofagi che vengono così direzionati in senso favorevole. Il risultato dell'attività del vischio è l'incapsulamento del tumore ed il blocco della sua crescita e diffusione (*Fintelmann Volker. In: Arte Medica - Antroposofia oggi, 2016.*). Il procedimento si colloca nella visione psico-oncologica dei tumori che sostiene che il cancro è una malattia fisica ma rivela un nesso con l'elemento animico umano, che cioè attribuisce anima e sensibilità alle cose del mondo esterno, tanto che ad ammalarsi spesso sono soggetti in cui si verifica una regressione della vita di sentimento. Il vischio per agire deve essere inserito in un programma complessivo che mira alla riattivazione del sistema immunitario attraverso l'impegno personale del paziente (arte di vivere sottesa anche ad elementi animici e spirituali), il regime alimentare ed il colloquio (psiconcologia).

Astragalus membranaceus

L'*Astragalus membranaceus* (*Huang-qi*) è una delle più importanti erbe toniche tanto che, nella medicina tradizionale cinese (TCM), è considerato un'erba superiore. Nelle radici della pianta sono presenti saponine triterpeniche, flavonoidi, polisaccaridi, amine. La pianta è nota per le sue proprietà di accumulare selenio. Essa incrementa le difese immunitarie, la produzione di anticorpi e di interferone. Tali proprietà sono da attribuire ai polisaccaridi che contiene: questi potenziano anche l'attività antitumorale di interleuchina-2, migliorano la risposta linfocitaria, innalzano l'attività delle cellule NK, potenziano l'attività monocitica. Le saponine dell'astragalo modulano il segnale mTOR e riducono le ciclossigenasi COX-2. Astragalo è stato impiegato nelle malattie infettive e nelle neoplasie come supporto alla chemioterapia; ha azione epatoprotettiva e cardiotonica, riduce la fatica ed anche la tossicità da chemioterapici quali il cisplatino. Non sono noti effetti avversi di rilievo (Benelli e Gavazzi. *Prostata: terapia medica convenzionale e complementare*. Ed. Partner-Ship, 2004; Wang et al. *Astragalus-containing TCM, with and without prescription based on syndrome differentiation, combined with chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer*. *Curr Oncol*, 2016.).

Funghi medicinali e Immunità

I funghi medicinali possono essere utilizzati per stimolare il sistema immunitario e nelle terapie antitumorali. Ciò è reso possibile dal loro contenuto in polisaccaridi e in beta-glucani. I primi stimolano i macrofagi, i granulociti neutrofili e i linfociti NK. I secondi sono potenti immunomodulatori con effetti sia sull'immunità innata sia su quella adattativa, fra cui un incremento ematico significativo di cellule NK. I beta-glucani agiscono anche a livello metabolico riducendo il colesterolo totale e LDL. Fra le specie fungine con attività immunostimolante e antitumorale risultano: ***Agaricus blazei Murriel*** (ABM), ***Cordyceps sinensis***, ***Coriolus versicolor*** (Kawaratake, Yun zhi), ***Ganoderma lucidum*** (Reishi), ***Grifola frondosa*** (Maitake), ***Lentinula edodes*** (Shiitake), ***Polyporus umbrellatus*** (Zhu ling). L'associazione Reishi, Shiitake e Maitake induce il migliore stimolo immunitario (Bianchi I. *Guarire con i funghi medicinali*. Editoriale Programma, 2016.).

Agaricus blazei Murriel (ABM)

È un fungo commestibile del Brasile. Ha un altissimo contenuto in beta-glucani con effetto antitumorale (polmone, ovaio, prostata, mammella) e potente attività

stimolante il sistema immunitario: stimola la produzione di cellule NK, determina l'attivazione del complemento, dei macrofagi e dei linfociti T helper. Ha anche spiccate proprietà disintossicanti e di depurazione dell'organismo da sostanze tossiche. Inoltre ha azione antidislipidemica, antidiabetica, antipertensiva. Può essere associato a chemioterapici e alla radioterapia e ne riduce gli effetti collaterali. Ha azione antiallergica spostando l'equilibrio linfocitario nella direzione Th1 e quindi risulta utile negli individui allergici che hanno un assetto immunologico Th2. Questo atteggiamento immunologico è utile nella prevenzione della patologia neoplastica. Può essere utilizzato in numerose patologie allergiche (asma bronchiale, dermatite atopica, rinite allergica).

Cordyceps sinensis

È un fungo dell'altopiano tibetano noto per le sue azioni rigeneranti e rinvigorenti a livello psicofisico, sessuale e anti-aging. È un potente antiossidante e immunostimolante. Stimola la funzione dei macrofagi e la produzione da parte di essi di ossido nitrico. Ha effetti antitumorali (prostata, mammella, colon). Ha inoltre azione ipotensiva e di protezione della funzione renale. È indicato nei pazienti con cardiopatia ed aritmia.

Ha infine effetti favorevoli sul metabolismo glicidico e lipidico.

***Coriolus versicolor* (Kawaratake, Yun zhi)**

È un fungo estremamente diffuso. Caratteristica è la variabilità del suo colore da cui il nome *versicolor*. Ha azioni antiossidanti, antibatteriche, antivirali, antitumorali e stimolanti il sistema immunitario.

È un componente fondamentale dell'armamentario terapeutico dei Paesi orientali. In Giappone è usato in pazienti oncologici in associazione alle comuni terapie, ad interleuchina-2, tamoxifene e ne riduce gli effetti tossici. Componenti principali del *Coriolus* sono i polisaccaridi PSP e PSK che sono molto studiati per le proprietà immunostimolanti. PSK agisce sui monociti/macrofagi, sui linfociti T, sulle cellule natural killer, cellule LAK (*Lymphokine Activated Killer cells*) e ne potenzia l'attività citotossica. Promuove la maturazione delle cellule dendritiche e regola la produzione di citochine. Ha inoltre un'azione protettiva del DNA nei confronti dei carcinogeni. Il suo impiego può aumentare i tempi di sopravvivenza in molte neoplasie. Anche PSP è un potente immunostimolante antitumorale. Stimola la proliferazione e l'attivazione delle cellule NK e delle cellule LAK con aumento dell'attività citotossica. Stimola la proliferazione di linfociti T e

B e permette il riequilibrio del sistema immunitario spostandolo verso lo stato Th1. Determina un incremento di interferone gamma e di interleuchina 2. Il Coriolus presenta anche altri meccanismi di azione nei confronti delle cellule tumorali quali l'inibizione della neoangiogenesi e l'induzione di apoptosi. Inoltre è in grado di contrastare citochine pro-infiammatorie e composti immunosoppressori prodotti dal tumore, di aumentare la massa grassa corporea nei soggetti trattati e di ridurre il dolore neoplastico. L'assenza di effetti collaterali e la possibilità di associarlo alla chemioterapia ne permette un suo impiego clinico. Coriolus ha dimostrato anche azioni antivirali; in particolare PSK è stato utilizzato come supporto alla terapia nell'HIV, nelle infezioni da virus Herpes simplex e da papillomavirus umano (HPV).

Ganoderma lucidum (Reishi)

È un fungo non commestibile noto da millenni come “fungo dell'immortalità” in Cina ed in Giappone. Ha effetti immunoregolatori ed antitumorali. Il fungo stimola le difese immunitarie quando sono deficitarie e riduce l'iperstimolo immunitario che caratterizza le patologie autoimmuni e allergiche: esercita quindi un'azione di bilanciamento del sistema immunitario. I polisaccaridi del Ganoderma agendo sul TNF-alfa regolano il processo infiammatorio riducendolo in caso di infiammazione e incrementandolo in assenza di stimoli pro-infiammatori. Il fungo aumenta il numero e l'attività dei linfociti NK, la capacità di fagocitosi dei macrofagi e la loro produzione di citochine e di ossido nitrico. Influenza l'attività delle cellule dendritiche, incrementa la popolazione dei linfociti T citotossici e Th1 e stimola la produzione di interferone. Il fungo esercita attività antineoplastica ad ampio spettro dovuta ai costituenti triterpeni e ai polisaccaridi. Reishi ha anche azioni antivirali, effetti cardioprotettivi, epatoprotettivi spiccati, antidiabetici, anti-aging, inibitori della 5-alfa-reductasi (utile nella iperplasia prostatica benigna) con possibile inibizione del PSA. Reishi determina anche un miglioramento nei pazienti con bronchite cronica ed impronta asmatiforme. Inoltre ha azioni rilassanti ed è utile nei disturbi del sonno, magari associandolo a valeriana e/o melatonina.

Grifola frondosa (Maitake)

È un fungo commestibile considerato, in Giappone, il “*Re dei funghi*”. Maitake è ricco di beta-glucani; determina l'attivazione dei macrofagi e ha azione stimolante delle cellule T (specialmente le cellule CD4). Aumenta il numero e l'efficacia delle cellule NK, delle cellule T citotossiche e incrementa l'espressione

di IL-1 e IL-2. I composti attivi determinano inoltre lo spostamento della risposta immunitaria verso la fase Th1 con incremento dell'espressione di IL-12. I polisaccaridi che costituiscono il fungo hanno attività citotossica sulle cellule neoplastiche per inibizione della glicosilasi-1 che è un enzima detossificante. Il blocco dell'enzima porta ad accumulo di metilglicosale che ha un effetto citotossico sulle cellule neoplastiche che utilizzano la glicolisi anaerobica per produrre energia. L'utilizzo del fungo in ambito oncologico ha portato al miglioramento dei pazienti affetti da tumori (mammella, polmone non a piccole cellule, fegato). Sono riportati risultati favorevoli anche nella profilassi delle ricorrenze del cancro alla vescica. Maitake riduce anche gli effetti collaterali della chemioterapia ed il dolore. Inoltre ha azioni antipertensive ed è efficace nella sindrome metabolica, nell'obesità e nel diabete. Ha dimostrato proprietà anti HIV (inibizione del virus e stimolazione dei linfociti CD4). L'associazione con vitamina C potenzia gli effetti terapeutici del fungo. Non sono documentati effetti collaterali di rilievo.

Lentinula edodes (Shiitake)

È un fungo commestibile originario dell'estremo Oriente utilizzato per le sue azioni energetiche. Ha attività antitumorali dovute alla presenza di grandi quantità di polisaccaridi tra cui il *Lentinano* (Beta-glucano). Il composto agisce con un meccanismo di stimolo immunitario. L'azione si manifesta prevalentemente per via iniettiva e intratumorale e porta allo sviluppo di necrosi emorragica nella massa neoplastica. In presenza di interleuchina 2 si verifica l'attivazione dei linfociti T e un incremento dell'attività dei macrofagi. Lo shiitake contrasta gli effetti di TNF-alfa a livello centrale e periferico ed ha azioni favorevoli nella cachessia neoplastica. Inoltre presenta attività antivirali (HIV, epatite), è attivo nelle affezioni da *Candida albicans*, manifesta azione ipotensiva ed è efficace nell'impotenza da cause vascolari.

Polyporus umbrellatus (Zhu ling)

È un fungo commestibile che cresce in Europa e in Asia. È strutturalmente simile al Maitake al quale viene associato. Ha azioni immunostimolanti ed antitumorali, attività diuretica anti aldosteronica (stimola l'escrezione urinaria di sodio e cloro senza perdita di potassio) e drenante. Ha un particolare tropismo per il sistema linfatico e quindi risulta utile quando è presente un suo coinvolgimento (linfedemi, malattie linfoproliferative). Ha effetti favorevoli nel prevenire la ricorrenza di tumori alla vescica e nella cachessia neoplastica.

MGN-3

MGN-3 è un integratore alimentare elaborato in Giappone nel 1992.

Deriva dalla crusca di riso attivata con enzimi provenienti da colture dei funghi shiitake (*Lentinula edodes*), kawaratake (*Coriolus versicolor*) e suehiritake (*Schizophyllum commune*). I costituenti attivi sono rappresentati da polisaccaridi e in particolare dall'arabinossilano. Il composto attiva il sistema immunitario e stimola l'attività delle cellule Natural Killer, dei macrofagi e la produzione di linfociti T, B, di interferone-gamma e di TNF-alfa. Inoltre ha azione antiossidante e migliora la funzionalità epatica, come si evince dalle numerose ricerche del Dr. Ghoneum e del Dr. Jewett dell'Università della California. MGN-3 è stato impiegato in associazione con la chemioterapia (cisplatino, adriamicina) e la radioterapia per ridurre gli effetti tossici dei chemioterapici e per contrastare l'immunosoppressione e la diminuzione del tasso di linfociti NK (Spenser Bright. *Biobran. Ed JAFRA*, 2006.). Il composto è stato associato anche ad ormonoterapia nel cancro della prostata alla dose di 3 g/die ottenendo un potenziamento degli effetti e la riduzione dei valori del PSA (Benelli e Gavazzi. *La via di segnale IKK/NF-kB. Ed. Partner-Ship*, 2007.). In pazienti con mieloma MGN-3 incrementa l'attività delle cellule NK ed il numero delle cellule mieloidi dendritiche nel sangue periferico e anche la concentrazione di linfociti T helper tipo 1 (Cholujova D. et al. *MGN-3 arabinoxylan rice bran modulates innate immunity in multiple myeloma patients. Cancer Immunol Immunother*, 2013.). MGN-3, in associazione alla chemioembolizzazione o a trattamenti percutanei, in pazienti con epatocarcinoma, ha dimostrato una migliore risposta terapeutica, la riduzione dei livelli di alfa-feto-proteina (AFP) ed un incremento della sopravvivenza (Bang MH et al. *MGN-3 enhances the effects of interventional therapies for the treatment of hepatocellular carcinoma (...). Anticancer Res*, 2010.). Non sono riportati effetti collaterali.



GLOSSARIO

Glossario

Anticorpi monoclonali

Sono anticorpi prodotti da un singolo clone cellulare dotati di grande specificità e quindi diretti contro un unico bersaglio. Sono utilizzati in campo diagnostico, per la tipizzazione dei tumori ma anche per la cura di linfomi, di tumori solidi e nelle malattie autoimmuni.

APC (*Antigen Presenting Cells* = Cellule che presentano l'antigene)

Le cellule APC sono elementi specializzati nella cattura degli antigeni. Si ritrovano nella cute, nel tratto gastrointestinale, nell'apparato respiratorio e cioè nell'epitelio delle vie più comuni di accesso dei microrganismi. Una volta catturato l'antigene lo trasportano agli organi linfoidei secondari e li presentano ai linfociti T. Le cellule dendritiche sono le APC più efficienti. Esse trasportano gli antigeni proteici ai linfonodi regionali ed espongono frammenti di antigene sulla membrana in modo che siano riconosciuti dai linfociti. Altre cellule APC sono i macrofagi ed i linfociti B.

Archaea

Microrganismi simili ai batteri, ne differiscono nell'organizzazione molecolare. Costituiscono un gruppo intermedio fra batteri e eucarioti.

Cellule Natural Killer (NK) o Linfociti NK

Sono cellule naturalmente capaci di uccidere che entrano in azione solo contro le cellule prive di identità immunologica o irriconoscibili al sistema immunitario (*Non Self*) per mancanza del complesso MHC. Le cellule *Self* sono invece riconosciute e non attaccate in quanto trasmettono un segnale di riconoscimento alle cellule NK. I linfociti NK sono in grado di uccidere cellule tumorali. Risultati incoraggianti, ancora sperimentali, sono stati ottenuti nei linfomi con l'impiego di cellule T ed NK.

Chemochine

Le **chemochine** sono una grande famiglia di citochine chemotattiche che sono prodotte dai macrofagi, dalle cellule endoteliali e da altri tipi di cellule in risposta a prodotti microbici, all'interleuchina-1 ed al TNF. Le chemochine sono capaci di guidare selettivamente, e quindi non in modo casuale, i globuli bianchi in aree determinate. I leucociti infatti per esercitare la loro funzione devono fuoriuscire dai vasi, penetrare e circolare liberamente nei diversi organi e tessuti sino a raggiungere una precisa destinazione. Il flusso

dei leucociti è guidato dalle **chemochine** e da **molecole adesive**, che si trovano sulle membrane delle cellule che compongono il rivestimento dei vasi (endotelio vascolare). Le chemochine guidano le cellule immunitarie dentro i linfonodi dove avviene l'incontro fra i linfociti e le cellule APC che presentano l'antigene. Per lasciare il torrente circolatorio i leucociti rotolano sulla parete del vaso, quindi vi aderiscono e successivamente fuoriescono da esso. Le chemochine guidano i globuli bianchi attivando i recettori presenti sulla loro superficie che sono di tipo diverso a seconda della funzione svolta. Quindi anche l'endotelio, considerato a lungo come substrato inerte, rappresenta un elemento centrale del processo immunologico ed in particolare nei processi infiammatori, nell'emostasi e nella trombosi. Gli studi sugli inibitori di chemochine, come quello che blocca il recettore CXCR4, hanno dimostrato effetti benefici per i malati di cancro. Anche gli studi sulle molecole adesive hanno portato allo sviluppo di anticorpi monoclonali in grado di bloccarne l'azione. Questi composti sono impiegati per il controllo di malattie infiammatorie quali la sclerodermia.

Citochine

Sono peptidi o proteine prodotte e rilasciate da cellule del sistema immunitario. Fanno parte della rete di comunicazione all'interno del sistema e fra questo, i vasi sanguigni e le cellule di vari organi (cervello, fegato). Sono i segnali con cui le cellule del sistema immunitario comunicano fra loro e con l'ambiente interno: segnali di attivazione, disattivazione, differenziazione. Appartengono a famiglie molecolari differenti e permettono al sistema immunitario di adempiere alla propria funzione regolandone la risposta.

Chemochine e Citochine possono originare anche da cellule non immunitarie e dalla gran parte dei tessuti dell'organismo. Ad esempio l'interleuchina-6 può essere rilasciata dai muscoli e dal cervello durante l'attività fisica. Al gruppo delle citochine appartengono: *interleuchine* (numerate da 1 a 36), *interferoni*, *chemochine*, il *Tumor Necrosis Factor* (TNF), *fattori di crescita ematopoietici*. Le citochine sono in grado di accendere o spegnere l'interruttore dell'infiammazione. La prima interleuchina identificata fu denominata interleuchina-1 quale segnale di comunicazione fra i leucociti (*inter-leuco*).

Complemento

Il sistema del complemento è un elemento essenziale dell'immunità innata. È costituito da oltre 30 proteine effettrici circolanti e di membrana che svolgono azioni di difesa, di lisi cellulare nei confronti di

microrganismi, per deposito di frammenti soprattutto C3 sui patogeni, e di reclutamento di cellule immunocompetenti (fagociti, linfociti T e B).

Costimolazione - molecola di costimolazione

La costimolazione è un processo fondamentale per l'attivazione, la proliferazione e differenziazione delle cellule T e quindi per la risposta immunitaria. La stimolazione dei linfociti T senza costimolazione può infatti avere come conseguenza l'inattivazione funzionale o la morte cellulare. La costimolazione avviene attraverso l'interazione fra linfociti T e molecole presenti sulla superficie delle cellule APC (*Antigen Presenting Cells*). Un'importante molecola di costimolazione è la CD28, una proteina di superficie dei linfociti T che fa da recettore per le proteine B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) presenti sulle APC fra le quali le più efficienti sono le cellule dendritiche.

Epigenetica

L'epigenetica è lo studio dei cambiamenti nell'espressione genica non causati da mutazioni genetiche. Si tratta di cambiamenti adattativi in seguito a stimoli ambientali, cioè di una vera "segnatura" (*segnatura epigenetica sul DNA cellulare*) che può anche essere ereditabile ma è reversibile. Tre sono i meccanismi di regolazione epigenetica ad oggi identificati: a) la metilazione del DNA (deposizione di un metile sul nucleotide citosina che si trasforma in metilcitosina): essa ha effetti opposti (attivazione o repressione dell'espressione genica) a seconda della localizzazione delle citosine metilate; b) la modificazione degli istoni (ad es. acetilazione/deacetilazione, metilazione/demetilazione, fosforilazione/defosforilazione, etc.) con rimodellamento della cromatina e modificazione dell'espressione genica; c) l'azione dei microRNA (RNA non codificanti che possono però modulare l'espressione genica bloccando l'RNA messaggero e quindi impedendo la sintesi proteica). I fattori che incidono sul genoma (fattori epigenetici) sono rappresentati da: lo sviluppo fetale, il regime dietetico, l'esposizione a sostanze chimiche, il fumo, l'attività fisica, lo stress, la meditazione, il trattamento farmacologico con composti epigenetici. Quest'ultimi fanno sì che le cellule neoplastiche possano essere attaccate in modo più efficace dal sistema immunitario. Alcuni composti quali il butirrato e gli acidi grassi a catena corta prodotti dal microbioma intestinale contrastano la segnatura epigenetica di tipo infiammatorio. Anche la curcumina ed il resveratrolo manifestano la stessa azione.

Fagociti

I fagociti sono cellule del sistema immunitario in grado di fagocitare, ossia inglobare agenti estranei (patogeni) potenzialmente dannosi. Sono rappresentati da globuli bianchi quali: macrofagi, neutrofili, cellule dendritiche. Il riconoscimento degli agenti estranei avviene attraverso recettori in grado di identificare proteine microbiche o liberate dai mitocondri al momento della morte cellulare. I fagociti neutralizzano gli agenti nocivi con alcuni meccanismi:

- a) “*burst ossidativo*”: i fagociti trasformano l'ossigeno che consumano in composti tossici per i microrganismi fra cui l'ipoclorito di sodio;
- b) produzione di enzimi proteasi e di composti antimicrobici;
- c) formazione di reti di DNA che derivano dai fagociti alla loro morte e sono in grado di intrappolare i microrganismi. Sulle loro maglie sono presenti composti tossici e molecole simili ad anticorpi, quali la pentrassina, studiata dall'equipe del Prof. Mantovani.

Fibroblasti

Sono cellule del tessuto connettivo che producono la matrice extracellulare o connettivale costituita da un insieme di molecole di sostegno.

Glicolisi anaerobica

Le cellule dell'organismo producono l'energia necessaria per il loro metabolismo sotto forma di ATP (adenosintrifosfato) bruciando glucosio (*glicolisi aerobica*). Le cellule tumorali, in attiva moltiplicazione, hanno bisogno di molto più glucosio per produrre energia. Per tale scopo sfruttano la *glicolisi anaerobica* che prevede la combustione del glucosio anche in assenza di ossigeno (*effetto Warburg*); questa tuttavia produce meno ATP e in più porta alla formazione di sostanze acide (acido lattico) che devono essere tamponate dall'organismo.

Immunoterapia

L'immunoterapia è una pratica terapeutica che agisce sul sistema immunitario potenziandolo, in modo da sfruttare le difese naturali dell'organismo nei confronti delle malattie, fra cui i tumori.

Infiammazione

È una risposta dell'immunità innata ad agenti biologici, chimici e fisici che determinano un danno dei tessuti. Ha lo scopo di eliminare il fattore causale che ha determinato il danno, riparare i tessuti colpiti, ripristinare le normali funzioni dell'organismo. I classici segni dell'infiammazione sono

rubor, calor, dolor, tumor, functio laesa. Tali fenomeni sono la conseguenza di un complesso di reazioni caratterizzate dal reclutamento dei globuli bianchi nell'area colpita, dalla produzione di mediatori dell'infiammazione, da vasodilatazione. L'interleuchina-1 è il mediatore centrale dell'infiammazione. L'infiammazione cronica può promuovere la trasformazione maligna delle cellule e lo sviluppo del cancro. In presenza di una neoplasia si crea spesso un microambiente tumorale che determina immunosoppressione e promuove la crescita neoplastica e la progressione della malattia. Sono allo studio i meccanismi di inattivazione dell'immunità innata che si esprime con l'infiammazione. Un gruppo di proteine note come *pentrassine* fra cui la pentrassina lunga PTX3, scoperta dall'immunologo Alberto Mantovani, interagisce nella fase infiammatoria con la P-selettina espressa dalle cellule endoteliali. Con questo meccanismo rallenta e limita l'infiltrazione dei globuli bianchi nel sito infiammatorio regolando in tal modo la risposta infiammatoria. Recentemente è stato osservato che PTX3 è un oncosoppressore. L'infiammazione cronica, oltre a contribuire alla cancerogenesi, può attivare affezioni quali l'infarto del miocardio e malattie neurodegenerative.

Istoni

Gli istoni sono polipeptidi costituiti da aminoacidi basici in abbondanza. Essi svolgono funzioni strutturali avvolgendo, organizzando e compattando il DNA all'interno del nucleo. Hanno inoltre funzioni regolatorie dell'attività trascrizionale. Sono quindi strutture dinamiche capaci di regolare l'espressione genica in maniera epigenetica.

Malattie autoimmuni

Patologie dovute ad una reazione sbagliata del sistema immunitario (immunità innata) che dà luogo ad una risposta infiammatoria che attacca l'organismo non riconoscendolo più come parte di sé. Fra le malattie autoimmuni rientrano l'artrite reumatoide, le malattie infiammatorie dell'intestino, etc. e le malattie "auto-infiammatorie" che colpiscono i bambini. Quest'ultime riconoscono cause genetiche in grado di scatenare reazioni infiammatorie incontrollate che determinano problemi cerebrali e febbre ricorrente.

Memoria immunologica

La memoria immunologica è la capacità dell'organismo di ricordare gli antigeni che hanno indotto la risposta immunitaria e reagire nel caso si ripresentino. È alla base della preparazione dei vaccini.

MHC (*Major Histocompatibility Complex* = Complesso Maggiore di Istocompatibilità)

MHC è un complesso di geni le cui molecole rappresentano un sistema di riconoscimento dell'antigene in grado di controllare la risposta immunitaria. Tali molecole sono denominate HLA (*Human Leucocyte Antigens*). Questi geni di istocompatibilità presentano sulla superficie delle cellule frammenti di proteine (*peptidi*), provenienti dal mondo interno o esterno, che sono state digerite dal proteasoma.

I peptidi possono essere riconosciuti (*Self*) o meno (*Non-Self*) dal sistema immunitario (linfociti T); il riconoscimento avviene attraverso il recettore dei linfociti T (TCR = *T Cell Receptor*). Il complesso MHC è quindi una sorta di carta di identità immunologica che viene letta dalle cellule dell'immunità e governa la compatibilità dei tessuti. È coinvolto nel rigetto dei trapianti di cellule estranee (*Non-Self*) all'organismo.

microRNA (miRNA)

Sono piccole molecole di RNA non codificante che hanno la capacità di reprimere la traduzione dei segnali del DNA. Sono responsabili del silenziamento di uno o più geni.

Mitocondri

I mitocondri sono organelli che rappresentano le centrali energetiche della cellula. Originariamente erano batteri che furono inglobati da una primordiale cellula eucariote (cioè provvista di nucleo) che assunse parte delle informazioni genetiche del batterio nel proprio nucleo cellulare. Perciò i mitocondri contengono un loro DNA che ha però una struttura particolare essendo organizzato in forma circolare come quello dei batteri, ed è di trasmissione materna. I mitocondri hanno inoltre un sistema immunitario autonomo simile a quello dei batteri chiamato sistema chaperonico che è formato da un elevato numero di proteine che svolgono il ruolo di *folding* delle nuove proteine e di *refolding* delle proteine danneggiate. Occorre sottolineare che le nostre cellule eucariote non hanno la capacità di “dare forma” alle proteine lineari che producono. È il mitocondrio che sintetizza questi “stampini” e li libera nel citoplasma. Dato che questo sistema chaperonico è presente anche nei batteri intestinali è evidente che mitocondri e microbioma parlano la stessa lingua e sono in grado di scambiarsi informazioni e “favori”. Queste proteine (chaperoniche) sono però riconosciute anche dai recettori

TLR del nostro sistema immunitario ed esercitano un'azione di contrasto sugli effetti dei chemioterapici vanificandone l'azione.

Monociti/Macrofagi

I monociti sono globuli bianchi prodotti nel midollo osseo da cellule staminali ematopoietiche (monoblasti). Fanno parte dei fagociti che dal sangue circolante si portano nei tessuti sedi di infiammazione dove si differenziano in macrofagi. Quest'ultimi sono cellule con grande nucleo, abbondante citoplasma e numerose vescicole interne atte a processare materiale estraneo.

NF-kB (Nuclear Factor - kappaB)

NF-kB è un fattore di trascrizione che ha un ruolo primario nel regolare la risposta immunitaria nell'infiammazione, nella proliferazione cellulare e nel cancro. È presente nel citoplasma cellulare in forma inattiva, associato a IκB. Quando è attivato trasloca nel nucleo, dove legandosi con il DNA, dà luogo alla trascrizione di oltre 500 prodotti genici: citochine, chemochine, molecole di adesione, enzimi (COX-2, iNOS), regolatori del ciclo cellulare, proteine antiapoptotiche. NF-kB può essere attivato da citochine pro-infiammatorie come TNF-alfa (potente attivatore), IL-1, ROS, eccesso di ossido nitrico (NO), ma anche da altri fattori quali lo stress, fattori ambientali e dietetici (zuccheri raffinati, grassi, eccessi dietetici), fumo, alcol, radiazioni, virus, batteri. NF-kB stimola macrofagi, neutrofili, basofili eosinofili a produrre specie reattive dell'ossigeno (ROS) e derivate dall'azoto (RNS) a scopo di difesa contro agenti estranei (microrganismi, etc). Per le sue peculiari caratteristiche rappresenta uno dei composti più attivi nel *link* "infiammazione-cancro".

Ossido nitrico (NO)

Ossido nitrico è una molecola effettrice che ha effetti di modulazione immunologica e stimola l'attività antimicrobica e antitumorale dei macrofagi.

Peptidi

I peptidi sono frammenti delle proteine, componenti essenziali di ogni cellula. Per stimolare una risposta immunitaria le proteine extracellulari devono essere endocizzate e spezzate in peptidi da una cellula che presenta l'antigene. I peptidi si legano quindi a molecole MHC che sono espresse sulla superficie cellulare come un complesso (Complesso Maggiore di Istocompatibilità=MHC) che viene riconosciuto dai linfociti T. L'insieme dei peptidi che vengono associati a MHC costituisce una specie di

carta di identità immunologica che viene vagliata e riconosciuta dalle cellule dell'immunità (linfociti T).

Probiotici - Prebiotici - Simbiotici

I **Probiotici** sono microorganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguata, esercitano un'azione benefica sulla salute dell'ospite (Definizione della FAO e dell'OMS). Nei probiotici in commercio possono essere presenti ceppi di lattobacilli e di bifidobatteri. Possono essere impiegati anche altri batteri lattici (lattococchi, leuconostoc, streptococchi), propionibatteri e lieviti. I probiotici svolgono un ruolo fondamentale nell'equilibrio e stabilità del microbioma intestinale. Possono essere consumati come alimenti oppure assunti come preparazioni.

I **Prebiotici** sono nutrienti (polisaccaridi, oligosaccaridi) che stimolano selettivamente la crescita e l'attività di colonie di microrganismi. Fra i più studiati rientrano il lattulosio (disaccaride di sintesi), l'inulina (glucide presente nei vegetali), i frutto-oligosaccaridi (glucidi di sintesi o naturali).

I **Simbiotici** sono prodotti che contengono sia i probiotici che i prebiotici.

Proteina C reattiva (PCR)

La proteina C reattiva fa parte delle pentrassine. Sono queste un gruppo di proteine pentameriche che hanno un ruolo importante nelle risposte infiammatorie al pari di PTX3 e nel sistema immunitario innato. È un marker di infiammazione scoperto nel 1930 da Tillet e Francis in pazienti affetti da polmonite da pneumococco. La proteina, in tali pazienti, ha un comportamento simile ad un anticorpo poichè si lega con l'antigene polisaccaridico C dello pneumococco. La PCR è impiegata anche come marker di rischio vascolare e di infarto.

Sistema immunitario

Il sistema immunitario è un sistema molto complesso che opera tramite componenti molecolari e cellulari diverse che collaborano per la difesa e il mantenimento dell'integrità dell'organismo. È un sistema dinamico, interconnesso e non compartimentale. Inoltre è sempre attivo e alla continua ricerca dell'equilibrio fra i vari circuiti in un'alternanza di attivazione/inibizione. È caratterizzato da due meccanismi: il *riconoscimento* di agenti estranei (capacità di distinguere i "buoni" dai "cattivi") e la *comunicazione* cioè un'efficiente trasmissione delle informazioni fra sistema nervoso centrale e sistema immunitario. Se l'equilibrio fra i vari circuiti

si rompe si verifica un quadro di disregolazione immunitaria che può portare a numerose patologie. Le ricerche più recenti indicano il sistema immunitario non più come semplice sistema di difesa, ma come un sistema di regolazione che entra in gioco in tutti gli eventi patologici: malattie infettive, infiammatorie, autoimmuni, cerebrovascolari, tumorali. La risposta immunitaria nei tumori è caratterizzata dalla partecipazione dei linfociti T, dei linfociti B, dei macrofagi e delle cellule NK. Tutti questi elementi costituiscono una vera orchestra immunologica il cui direttore è rappresentato dai linfociti T. Le cellule dendritiche costituiscono l'anello di congiunzione fra immunità innata e acquisita.

Telomeri

I telomeri sono minuscole porzioni di DNA che formano la parte terminale dei cromosomi. Rappresentano l'orologio della cellula in quanto si accorciano ogni volta che la cellula si divide e con essa si dividono i cromosomi. Quando i telomeri divengono troppo corti la cellula non può più dividersi e inizia il processo di invecchiamento cellulare. Oggi sappiamo che l'accorciamento dei telomeri non è un processo irreversibile.

TLR (*Toll-like receptors*)

I TLR sono recettori localizzati su molte cellule dell'immunità, ma in particolare sulle cellule dendritiche e sui linfociti B.

Sono proteine transmembrana che, come dei sensori, rilevano la presenza di microrganismi o di cellule estranee là dove non dovrebbero esserci. Il loro compito è di attivare le cellule dendritiche dell'immunità innata che a loro volta inducono la risposta dell'immunità specifica sostenuta dai linfociti T e B. L'attivazione inappropriata dei TLR porta allo sviluppo di numerose malattie. Il blocco di questi recettori può essere utile in malattie autoimmuni e per il controllo di malattie infiammatorie croniche. Al contrario l'attivazione programmata dei TLR può essere utilizzata per la cura di alcuni tumori.

TNF (*Tumor Necrosis Factor*)

Il Fattore di Necrosi Tumorale (TNF) è una citochina infiammatoria descritta per la prima volta dall'immunologo *Lloyd Old* e dai suoi collaboratori al *Memorial Center di New York* e isolata dal Prof. *Bruce Beutler* che ne ha scoperto il ruolo di grande importanza nei processi infiammatori. Questa proteina è in grado di indurre necrosi emorragica in alcuni tumori tanto che su di essa era

stata riposta la speranza di creare un nuovo farmaco antitumorale. In realtà gli studi successivi hanno dimostrato che questa citochina è un potente mediatore infiammatorio ed è un attivatore del fattore di trascrizione NF-kB. TNF è la causa del danno articolare ed osseo (erosione ossea), caratteristici dell'artrite reumatoide, tanto che farmaci anti TNF sono impiegati per la cura di questa ed altre malattie autoimmuni (patologie infiammatorie croniche intestinali come il morbo di Crohn, l'artrite psoriasica, etc.) ed hanno aperto la strada allo studio di composti rivolti verso altre citochine quali IL-1, IL-6 (importante per il passaggio dall'infiammazione acuta a quella cronica), etc.

Tolleranza immunitaria

La tolleranza immunitaria è l'incapacità di rispondere, con una risposta immunitaria specifica, in presenza di un dato antigene al quale l'organismo è stato esposto in precedenza. ^{possono essere:} a) di tipo *nutrizionale* (malnutrizione)

Trapianto fecale

Infusione di sospensione liquida di feci da donatore sano (enteroclisma, gastroscopia, sondino naso-digiunale) per ristabilire la composizione e la funzionalità del microbioma intestinale in paziente con patologie gastro-intestinali.

Vaccino

È un preparato che viene utilizzato per indurre una risposta immunitaria. È in genere costituito da una piccola quantità di microrganismi inattivati, o da parti di essi, o da tossine da loro prodotte. Il vaccino è allestito in modo da renderlo incapace di causare una malattia ma idoneo a scatenare una risposta immunitaria specifica, mirata, quando l'organismo viene a contatto con l'agente estraneo di cui mantiene la memoria immunologica. Perché il vaccino funzioni è tuttavia necessario che sia composto anche da un *adiuvante* che, attraverso differenti recettori fra cui i TLR (*Toll-like receptors*), invia un segnale di attivazione alle cellule dendritiche dell'immunità innata. Quest'ultime, una volta attivate, raggiungono, attraverso la linfa, i linfonodi e a questo livello inducono l'attivazione dei linfociti T e quindi si innesca la risposta immunitaria. I vaccini utilizzati in immunoncologia sono sia preventivi (ad es. vaccino per il virus dell'epatite B, il virus HPV), sia terapeutici quali *Sipuleucel-T* per il trattamento del carcinoma della prostata ormonorefrattario e metastatico e il vaccino BCG (*Bacillo di Calmette-Guerin*) per la terapia delle ricorrenze del cancro della vescica.