SOCIETÀ ITALIANA DELLE SCIENZE VETERINARIE
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE

ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA SU:

IMMUNOLOGIA COMPARATA DELLA MALATTIA NEOPLASTICA

FORLÌ - 14 SETTEMBRE 1984

16

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA

ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA SU:

IMMUNOLOGIA COMPARATA DELLA MALATTIA NEOPLASTICA

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1979 - Infezioni Respiratorie del Bovino

1980 - L'oggi e il domani della Sulfamidoterapia Veterinaria

1980 - Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria

1980 - Gli antibiotici nella pratica veterinaria

1981 - La Leucosi Bovina Enzootica

1981 - La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia

1982 - Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale

1982 - Le Elmintiasi nell'allevamento intensivo del Bovino

1983 - Zoonosi ed Animali da compagnia

1983 - Le infezioni da «Escherichia coli» degli animali

1983 - Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria

1983 - 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale

1984 - Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo

1984 - 1° Simposio internazionale di medicina veterinaria sul cavallo da competizione

1985 - La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino

FONDAZIONE
INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE

SOCIETÀ ITALIANA
DELLE SCIENZE VETERINARIE

SOCIETÀ ITALIANA
DI PATOLOGIA AVIARE

ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA SU:

IMMUNOLOGIA COMPARATA DELLA MALATTIA NEOPLASTICA

Forlì: 14 settembre 1984

Edito a cura della

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

© Copyright Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia - Marzo 1986

Stampa: La Nuova Cartografica S.p.A. - Brescia

INDICE

Presentazione . . . . . pag. 9

G. Poli: La sorveglianza immunitaria ai tumori . . . » 11

E. Clerici: La compromissione del sistema immunitario nel portatore di tumore . . . . . » 31

A. Clivio: Le basi genetiche e molecolari della neoplasia . » 45

P.C. Powell: L'immunità nelle neoplasie - Il contributo reso dalla ricerca sui polli . . . . . » 73

MODERATORE

S. Pascucci

Presidente della Società Italiana di Patologia Aviare
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia - Sez. di Forlì

RELATORI

E. Clerici

Cattedra di Immunologia dell'Università di Milano
Istituto Nazionale per lo studio e la cura dei Tumori - Milano

A. Clivio

Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia

G. Poli

Istituto di Microbiologia e Immunologia
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Milano

P.C. Powel

Houghton Poultry Research Station - Gran Bretagna

PRESENTAZIONE

Il convegno annuale per il 1984 della Società Italiana di Patologia Aviare, svoltosi nella sala Zambelli della Camera di Commercio I.A.A. di Forlì il 13 settembre di quell'anno, in via eccezionale è stato prolungato di un giorno per permettere lo svolgimento di una tavola rotonda su «Immunologia comparata della malattia neoplastica». Essa ha voluto rappresentare il contributo della nostra Società ai festeggiamenti per il bicentenario della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna ed è stata organizzata in collaborazione con la Società Italiana delle Scienze Veterinarie.

Per la realizzazione di questa manifestazione la Camera di Commercio di Forlì, a cui va il nostro vivo ringraziamento, ha contribuito in modo determinante dal lato economico e organizzativo. Presentiamo solo ora gli Atti della tavola rotonda e ci scusiamo per il ritardo dovuto alla nostra ferma intenzione di non cedere relazioni di così alto valore scientifico alle riviste di carattere divulgativo e di non accettare la pubblicazione frazionata delle singole relazioni proposta da alcune riviste scientifiche. La soluzione ideale ci è stata offerta dalla Fondazione Iniziative Zooprofilattiche, che con l'usuale sensibilità per tutto ciò che riguarda l'aggiornamento professionale della classe veterinaria ha acconsentito di farne oggetto di pubblicazione in uno dei suoi tanto apprezzati «quaderni». Alla Fondazione e al suo Segretario Generale Dott. Pecorelli desideriamo esprimere un particolare ringraziamento.

Un grazie di cuore rivolgiamo inoltre al Prof. Poli, sempre così vicino alla nostra Società, che oltre ad essere stato l'ideatore del convegno si è assunto l'onere di fare un'introduzione di aggiornamento sull'argomento risultata necessaria per un tema tanto complesso e nuovo almeno per gran parte dell'uditorio.

Le conoscenze di immunologia dei tumori in campo umano e aviare sono state poi messe a confronto dai Proff. Clerici, Clivio e Powell. Per molti aspetti la patologia umana è molto distante da quella dei mammiferi domestici ed ancora di più dalla patologia aviare perché diversi sono negli uccelli la costituzione anatomica e la fisiologia di molti apparati.

Anche i campi di intervento e le finalità delle professioni medica e veterinaria sono distinti. L'attività del medico è rivolta alla salute dell'uomo, quella del veterinario prevalentemente alle produzioni animali. È vero che il veterinario quale igienista ha anche compiti importanti nella difesa della salute umana, ma è altrettanto vero che la sua azione sanitaria deve trasformarsi in operazione zooeconomica per avere ragione di esistere.

Siamo grati ai brillanti relatori perché durante il convegno ci hanno fatto capire che, nonostante queste sostanziali differenze, la ricerca tende a riunire le due medicine in una sola. In effetti l'immunologia in generale e quella delle malattie tumorali in particolare si basano su meccanismi sostanzialmente simili in tutti gli animali superiori, uomo compreso.

La natura ci ha fornito una nomenclatura unica che permette il dialogo anche tra campi della scienza tanto distanti e da esso non possono che scaturire vantaggi reciproci per l'uomo e per l'animale da reddito.

La tavola rotonda ne è stato un valido esempio.

Il Consiglio Direttivo
della Società Italiana
di Patologia Aviare

G. Poli *

LA SORVEGLIANZA IMMUNITARIA AI TUMORI

L'immunologia dei tumori si è sviluppata, come disciplina indipendente, da quando è stato dimostrato che le cellule neoplastiche esprimono determinanti antigenici, che non si trovano invece su cellule autologhe normali, e che il sistema immunitario dell'ospite è capace di rispondere a questi peculiari antigeni (7,12,13,17). È così stata proposta la teoria della sorveglianza immunitaria ai tumori (5,6,7,8, 10,13,18,20), il cui principale assunto è che in condizioni normali le cellule linfoidi immunocompetenti, tumore-specifiche, possono venire indotte dalle cellule neoplastiche a differenziarsi in cellule effettrici capaci di distruggere il tumore. Sebbene i dati sperimentali dimostrino questa possibilità sia *in vitro* (3,23), sia *in vivo* (2), la maggior parte delle osservazioni sui tumori spontanei ha imposto invece la formulazione di un paradosso basilare nell'immunologia dei tumori: «la progressiva e inarrestabile crescita di un tumore immunogenico nel suo ospite immunocompetente». Per un qualche motivo, cioè, la cellula neoplastica è in grado di attivare dei meccanismi che le permettono di sfuggire al sistema difensivo immunitario dell'ospite. In effetti, ad eccezione di alcuni rari esempi, i numerosi tentativi di indurre, mediante immunoterapia, la regressione di tumori già sviluppati hanno sempre portato a deprimenti insuccessi.

Per meglio chiarire i fenomeni biologici che presiedono, da un lato, ai meccanismi immunitari anti-tumore per mimetizzarsi e quindi sfuggire a tali difese, ritengo opportuno rivedere brevemente alcune caratteristiche del sistema immune e nel contempo aggiornare le conoscenze relative al complesso maggiore di istocompatibilità, in quanto coinvolto nei fenomeni dell'immunologia oncologica.

* Istituto di Microbiologia e Immunologia della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Milano.

Il sistema immunitario. Il sistema immunitario è organizzato in due compartimenti: quello dell'immunità umorale, basato sulla proprietà di proteine dette anticorpi, e quello della immunità cellulo-mediata, che utilizza elementi cellulari addestrati ad intervenire direttamente nei processi di difesa.

La cellula cardine che è predisposta a svolgere il ruolo principale nella risposta immunitaria è il linfocita. Questa cellula, che è mobile e circola in tutti i tessuti ed organi dell'organismo, è pronta ad intervenire in difesa dell'ospite contro infezioni ovunque si realizzino. Non è però la cellula più aggressiva (i neutrofili e i macrofagi sono infatti gli elementi più efficienti nell'eliminare gli antigeni), ma d'altra parte è l'unico elemento che ha la capacità intrinseca di riconoscere specificamente un antigene come «estraneo» (*not self*), cioè come qualcosa non appartenente all'ospite ed è quindi in grado di innescare quei meccanismi che porteranno poi alla eliminazione dell'elemento invasore o della cellula trasformata.

Per queste stesse caratteristiche, il linfocita è in grado di riconoscere le componenti dei tessuti dell'ospite come «*self*» o «proprie» e quindi fa sì che tutti i meccanismi del sistema immunitario rimangano sempre funzionanti, ma areattivi verso l'ospite stesso. Questa abilità a distinguere il «*not self*» dal «*self*» e cioè le sostanze estranee e potenzialmente pericolose dalle componenti tissutali dell'organismo stesso è una caratteristica essenziale ed esclusiva del linfocita; è cioè il punto di partenza per ogni tipo di reattività immunologica.

Il riconoscimento dell'antigene ad opera del linfocita innesca una serie di eventi che conducono alla distruzione e/o alla rimozione dell'agente patogeno. Inizialmente il linfocita va incontro ad alcune imponenti alterazioni morfologiche: la sua dimensione aumenta marcatamente, quale diretta conseguenza dell'aumento della massa citoplasmatica. Il linfocita attivato, denominato immunoblasto, può svolgere molte funzioni immunitarie, ma in genere necessita un'ulteriore differenziazione per realizzare la massima e completa risposta immunologica.

Le funzioni che tale cellula può svolgere, dopo attivazione, sono molteplici ed indirizzate a mettere in moto i due sopra menzionati compartimenti del sistema immunitario.

La compartimentazione del sistema immunitario è sia anatomica sia funzionale; si riconoscono cioè due distinte famiglie di linfociti

presenti nel sangue, nei linfonodi, nella milza e nei tessuti linfoidi: gli uni che derivano dalla borsa di Fabrizio o da struttura borsa-equivalente e per questo denominati linfociti B e gli altri che derivano dal timo e quindi denominati linfociti T. I linfociti B, che presiedono all'immunità umorale, esprimono sulla loro superficie un campione delle molecole anticorpali che sono in grado di produrre; per sintetizzarle in grande quantità e secernerle devono subire però un differenziamento terminale in plasmacellule. I linfociti T presiedono invece all'immunità cellulo-mediata e intervengono inoltre sulla linea B con funzione di modulatori della risposta anticorpale.

Nell'ambito della linea T si riconoscono delle sottopopolazioni cellulari e più precisamente: 1) i linfociti T *helper*, che sono in grado di aiutare i linfociti B nella loro funzione di produrre gli anticorpi; 2) i linfociti T *suppressor*, che hanno invece la capacità di inibire specificamente o aspecificamente la risposta anticorpale e sono pertanto coinvolti nei numerosi femoneni di immunotolleranza; 3) i linfociti T citotossici, che sono addestrati a distruggere una cellula bersaglio sulla cui superficie sia presente una sufficiente quantità di antigiene specifico.

Accanto alle due popolazioni di linfociti B e T, esiste una terza popolazione linfocitaria che non possiede quei *markers* di superficie che consentono di identificare una cellula come B o T; pertanto queste cellule vengono denominate linfociti «nulli» o linfociti «non B, non T».

Questa frazione cellulare manifesta una marcata citotossicità cellulare anticorpo-dipendente, essendo capace di distruggere qualunque cellula bersaglio su cui abbiano aderito anticorpi di tipo IgG, diretti contro antigeni di superficie. Per questo loro intervento «cieco» sono state denominate cellule «*killer*» (K). Tra le cellule nulle è stata identificata anche una classe di elementi denominati «*natural killer*» (NK), in quanto capaci di espletare fenomeni di citotossicità spontanea, cioè capaci di distruggere cellule neoplastiche in assenza di una precedente sensibilizzazione antigenica specifica e con un meccanismo non anticorpo-dipendente.

Il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC)

Le diverse popolazioni di cellule immunocompetenti, coinvolte nella risposta immunitaria, interagiscono tra loro e con le altre cellule dell'organismo mediante strutture di superficie, o recettori di membrana, attraverso cui vengono trasmessi i «segnali». Se, per una qualche ragione, una cellula diviene anormale e, di conseguenza, la sua struttura di superficie si modifica, è possibile che attraverso questi cambiamenti venga riconosciuta dalle altre cellule. In particolare il sistema immunitario cellulo-mediato sembra essere programmato in modo che le cellule modificate a livello di membrana possano venire identificate e prontamente eliminate. Le strutture di superficie che funzionano nelle cellule come «elementi di riconoscimento» sono note col termine di antigeni di istocompatibilità: questi antigeni, sebbene siano distribuiti in maniera non uniforme nell'organismo, sono caratteristici del singolo individuo piuttosto che di particolari organi o tipi cellulari.

I linfociti T sono le cellule specializzate nel riconoscere e nel reagire verso gli antigeni di istocompatibilità di cellule eterologhe, oppure di cellule autologhe in qualche modo alterate (trasformazione neoplastica, infezioni virali, invecchiamento).

Queste strutture di superficie, coinvolte nella risposta immunitaria e che sono responsabili della «restrizione» della specificità del riconoscimento degli antigeni da parte dei linfociti T, sono codificate da un gruppo di geni, localizzati in un'ampia regione di un singolo cromosoma, detto complesso maggiore di istocompatibilità: la parola «istocompatibilità» si riferisce al fatto che il riconoscimento delle molecole MHC da parte dei linfociti T determina la compatibilità o incompatibilità dei tessuti; «maggiore» sta ad indicare che ci sono molti loci che presiedono alla istocompatibilità, ma che tra questi i loci MHC occupano una posizione speciale e sono di primaria importanza immunologica; il termine «complesso» sta ad indicare che sono coinvolti più loci.

Si riconoscono due classi principali di geni: quelli della classe I, che codificano gli antigeni di istocompatibilità responsabili del rigetto dei trapianti (restrizione della ricognizione antigenica da parte dei linfociti T citotossici) e quelli della classe II, che codificano le strutture di superficie che intervengono invece nella cooperazione tra linfociti

B, T e macrofagi (restrizione della ricognizione antigenica da parte dei linfociti T a funzione regolatrice).

Oltre a queste differenze funzionali, i prodotti di queste due classi differiscono anche nelle loro proprietà sierologiche, nella distribuzione nei diversi tessuti e nella composizione biochimica.

Caratteristiche degli antigeni di istocompatibilità della classe I. Le molecole della classe I sono ubiquitarie nei nei tessuti somatici; non v'è cellula dell'organismo che non possegga tali antigeni, anche se la loro distribuzione è differente: le cellule muscolari, i fibroblasti e le cellule del sistema nervoso sono a basso contenuto, mentre le cellule del sistema immunitario (linfociti B, T e macrofagi) ne posseggono elevate concentrazioni. La struttura di questi antigeni è caratterizzata da una molecola glicoproteica transmembrana, di peso molecolare 45.000, associata ad una molecola di β-2 microglobulina, di peso molecolare 12.000 (fig. 1).

Per quanto riguarda la funzione di questi antigeni è già stato ricordato che sono in grado di «restringere» la specificità dell'azione dei linfociti T citotossici, cioè una cellula bersaglio che presenta un antigene convenzionale (ad esempio virus-indotto) può essere riconosciuta e distrutta solo se la cellula bersaglio e il linfocita T citotossico veicolano le stesse molecole di classe I. Il linfocita T per agire deve cioè effettuare contemporaneamente un «doppio» riconoscimento: l'antigene virale e l'antigene di istocompatibilità della classe I. Lo stesso fenomeno si osserva con le cellule neoplastiche autologhe. Nel caso invece di trapianto e rigetto di tessuti, cioè in una condizione innaturale, il linfocita T citotossico riconosce la molecola di classe I da sola (alloreattività).

Caratteristiche degli antigeni di istocompatibilità della classe II. Le molecole della classe II hanno una distribuzione piuttosto ristretta nei tessuti dell'organismo, essendo limitate soprattutto alle cellule del sistema linforeticolare. Per ora sono infatti state identificate sui linfociti B, sui linfociti T attivati, sui macrofagi e su alcune cellule dell'epidermide (cellule dendritiche o di Langerhans), che paiono possedere attività fagocitaria ed essere coinvolte nella stimolazione dei linfociti T. La struttura di questi antigeni è caratterizzata da glicoproteine transmembrana composte da una catena

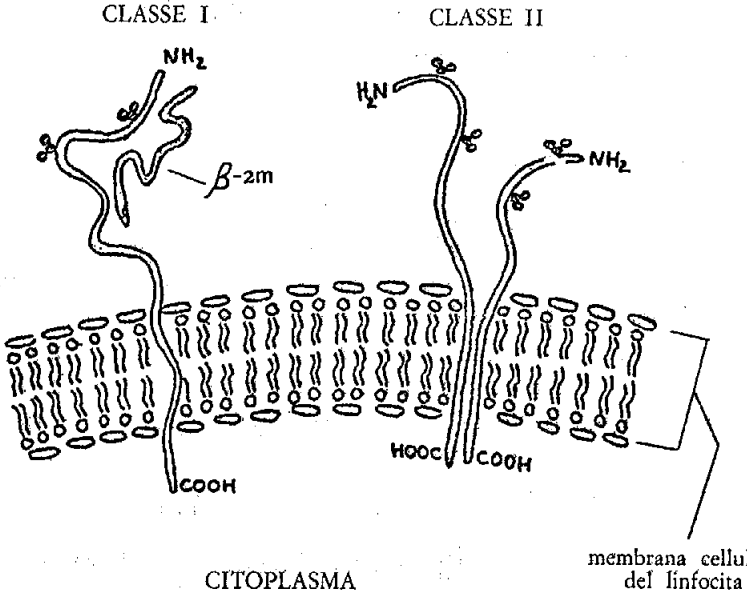

Fig. 1 - Rappresentazione schematica degli antigeni di istocompatibilità di classe I e II. Si tratta di glicoproteine trasmembrana (⁘ = carboidrati) con l'estremità amino-terminale (NH_2), che protunde dalla cellula. La molecola della classe I è associata non covalentemente ad una molecola di β-2 microglobulina (β-2m). Le molecole della classe II sono dimeri con una catena α, più grande, ed una catena β, più piccola.

α di peso molecolare 32.000 e di una catena β, più piccola, di peso molecolare 28.000 (fig. 1).

La funzione degli antigeni di classe II è quella di «restringere» la specificità della collaborazione tra le diverse cellule immunocompetenti. Per esempio, il macrofago, che presenta un antigene sulla sua superficie, può trasmettere il segnale di attivazione a un linfocita T *helper* solo se le due cellule veicolano le stesse molecole di classe II. Lo stesso requisito devono avere le cellule T *helper* ed i linfociti B per poter collaborare tra loro.

Il complesso maggiore di istocompatibilità è stato descritto nella maggior parte delle specie domestiche (1,14,22) ad eccezione del gatto; la nomenclatura deriva da quella usata per il sistema umano (HLA = *human lymphocyte antigen*) e quindi: BoLA (*bovine lymphocyte antigen*) per il bovino; ELA (*equine lymphocyte antigen*) per l'equino; SLA per il suino; DLA per il cane e così via. Un'eccezione è rappre-

sentata dal pollo, nel quale il complesso maggiore di istocompatibilità è indicato semplicemente con B (da *blood group system*).

Gli antigeni del tumore

È ormai acquisito, attraverso molteplici dati sperimentali, che la cellula tumorale veicola effettivamente degli antigeni che non sono presenti su cellule normali dello stesso tipo. Questi antigeni «tumore-associati» possono venire generati da meccanismi diversi: 1) Sintesi di nuove molecole; virtualmente, tutti i tumori virus-indotti contengono nuovi antigeni e, in effetti, la comparsa di antigeni tumore-associati è considerata la spia dell'avvenuta trasformazione neoplastica da parte del virus. Alcuni di questi antigeni sono codificati da geni virali, altri da geni dell'ospite, attivati durante la trasformazione. È verosimile che una simile attivazione di geni normalmente repressi si realizzi anche in altri tipi di tumore indotti da cause diverse da quelle virali. 2) Smascheramento di antigeni normalmente non esposti; la trasformazione neoplastica indotta da determinati virus, porta alla comparsa di antigeni che non possono essere rilevati sulla superficie di cellule normali, a meno che le cellule non vengano prima trattate con enzimi proteolitici. Verosimilmente, questi antigeni sono normali componenti della membrana cellulare, che sono mascherati da altre molecole. Entrambi, l'infezione virale o il trattamento enzimatico asportano le molecole di copertura e scoprono tali antigeni. 3) Perdita di molecole; la scomparsa di alcune molecole della membrana cellulare può alterare il profilo di molecole adiacenti in una determinata regione della membrana e pertanto, come conseguenza, si può generare un nuovo profilo che può essere immunogeno per l'ospite. 4) Modificazione di molecole esistenti; una alterazione della membrana, causata dalla trasformazione neoplastica, può determinare, in una molecola, l'esposizione di regioni normalmente mascherate oppure può modificarne la struttura chimica. Le regioni modificate della molecola possono pertanto venire riconosciute dall'ospite come determinanti antigenici nuovi. 5) Rilascio di molecole intracellulari; la disgregazione delle cellule tumorali può esporre al sistema immune componenti nucleari, nucleolari o citoplasmatiche, che sono normalmente interne alla cellula e che non ve-

nendo mai a contatto con le cellule immunocompetenti non sono, in condizioni normali, immunogene.

Tipi di antigeni tumore-associati

I diversi antigeni tumore-associati, comunque generati, vengono classificati in due ampie categorie e precisamente: a) veri antigeni tumore-associati, che sono antigeni che non possono venire rilevati su cellule normali e b) antigeni tumore-associati, che vengono anche espressi da alcune cellule normali durante alcuni stadi della loro differenziazione, ma che non si manifestano in cellule normali dello stesso tipo da cui deriva il tumore.

A) *Veri antigeni tumore-associati.* Questi antigeni, che compaiono esclusivamente sulle cellule tumorali, vengono anche indicati come «antigeni tumore-specifici». Per la loro evidenziazione si può usare la tecnica del trapianto di tumore, *in vivo*, osservando cioè se il tumore viene rigettato da un ospite singenico rispetto al donatore, oppure può essere impiegata la prova di linfocitotossicità; *in vitro*, osservando se linfociti immuni sono in grado di lisare le cellule tumorali. Gli antigeni rilevati con il metodo *in vivo* sono anche indicati come «antigeni tumore-associati, da trapianto» o TATA (*tumor-associated transplantation antigens*). Comunque, per ottenere il rigetto, l'ospite singenico deve prima venire immunizzato con gli antigeni del tumore, dal momento che lo stimolo antigenico fornito dal tumore trapiantato è debole e pertanto il tumore avrebbe rapidamente il sopravvento sull'immunità che esso stesso induce (questa è la ragione per cui non viene eliminato in primo luogo dall'ospite originale).

Per quanto riguarda invece la prova *in vitro*, è importante che le cellule tumorali bersaglio veicolino gli stessi antigeni di istocompatibilità dei linfociti immuni, dal momento che, come già ricordato, gli antigeni tumore-associati vengono riconosciuti dai linfociti T citotossici nel contesto delle molecole MHC della classe I.

Se il tumore è in grado di indurre anche un'immunità umorale, gli antigeni tumore-associati possono essere svelati impiegando classiche procedure sierologiche.

Gli antigeni tumore-associati hanno caratteristiche diverse in fun-

zione dell'origine del tumore che li veicola. Per esempio, gli antigeni di tumori indotti da carcinogeni chimici sono individualmente distinti, così che ciascun tumore presenta un antigene o un set di antigeni unici: le indagini su oltre 30 tumori diversi, ma provocati dalla stessa sostanza chimica, hanno dimostrato che nessun tumore manifestava antigeni simili ad un altro. Anche il grado di immunogenicità di questi antigeni varia ampiamente e pare essere influenzato dal tipo e dalla dose del carcinogeno usato per indurre il tumore.

Al contrario si comportano invece i tumori indotti da virus oncogeni: in questo caso tumori indotti dallo stesso virus manifestano antigeni tumore-associati in comune, anche se possono di volta in volta presentare, in aggiunta, altri antigeni specifici. Gli antigeni comuni sono quasi sempre correlati al virus, cioè codificati dal genoma virale. Infine, gli antigeni tumore-associati dei tumori spontanei, soprattutto umani, sono spesso difficili da dimostrare, probabilmente a causa del mascheramento dovuto a reazioni tra la superficie della cellula neoplastica e la risposta immunitaria dell'ospite. Pertanto, nei casi in cui non si riesce ad evidenziare gli antigeni, non è chiaro se questi manchino effettivamente, oppure siano mascherati, modulati o bloccati.

Ad eccezione di alcuni tumori indotti da virus oncogeni noti, non si conosce la natura e l'origine dei veri antigeni tumore-associati. Alcuni ricercatori ritengono che alcuni di questi antigeni, anche nel caso di tumori chimicamente indotti o di tumori spontanei, siano direttamente o indirettamente correlati a virus latenti, attivati dalla trasformazione neoplastica della cellula. Un candidato particolarmente attraente, per il ruolo di antigene tumore-associato, è rappresentato dalla molecola gp 70 (glicoproteina di peso molecolare 70.000), codificata dai virus oncogeni di tipo C, che sembra variare considerevolmente da virus a virus.

B) *Antigeni tumore-associati, espressi anche da cellule normali.* I due gruppi principali di questi antigeni sono rappresentati dagli antigeni oncofetali e dagli antigeni di differenziazione.

1 - Gli antigeni oncofetali sono normalmente sintetizzati durante determinati stadi dell'embriogenesi, ma sono assenti nelle cellule adulte normali o sono espressi a concentrazioni molto basse. Ricompaiono invece nelle cellule tumorali o in connessione con la crescita

tumorale, probabilmente come conseguenza della derepressione di determinati geni dell'ospite. Tra i numerosi antigeni di questo tipo i più importanti sono: a) l'α-fetoproteina (α-FP), glicoproteina di peso molecolare 70.000 la cui funzione è ancora sconosciuta, che viene secreta nel siero dalle cellule epatiche normali dell'embrione dove rappresenta, nel primo trimestre, il 90% delle sieroglobuline totali; dopo la nascita il suo livello declina molto rapidamente. L'antigene riappare invece in pazienti con carcinomi embrionali, pancreatici o epatici, mentre nella maggior parte degli altri tumori rimane a livelli molto bassi. b) l'antigene carcinoembrionario (CEA): si tratta di una glicoproteina di peso molecolare da 200.000 a 300.000, esposta sulla membrana delle cellule cancerose del colon umano e presente normalmente anche sulla mucosa intestinale, sulle cellule del pancreas e del fegato dell'embrione, sino al sesto mese di gestazione (di qui il nome dell'antigene).

2 - Gli antigeni di differenziazione sono espressi in alcuni tessuti, mentre sono assenti in altri; compaiono inappropriatamente in certi tumori. Tra i numerosi antigeni di questo tipo, studiati soprattutto nel topo, i più importanti sono: a) gli antigeni timoleucemia (Tla), che sono presenti sia nei timociti normali, sia in alcuni tipi di leucemia e b) l'antigene G_{Ix} che è espresso sui timociti normali di alcuni ceppi di topi e in alcune leucemie virus-indotte (il nome deriva dalla prima leucemia in cui è stato evidenziato e che era indotta dal virus di Gross).

Meccanismi immunitari effettori anti-tumore

Parimenti a quanto avviene nel caso di stimoli evocati dagli antigeni dei microrganismi nel corso di malattie infettive, anche gli antigeni tumore-associati attivano tutti i meccanismi difensivi dell'ospite (specifici e non specifici, umorali e cellulari), alcuni dei quali giocano un ruolo più importante di altri (7,19). Il ruolo principale nella resistenza *in vivo* alla crescita tumorale è giocato dai linfociti T, per il loro intervento nelle reazioni di citotossicità che caratterizzano l'immunità cellulo-mediata nella sorveglianza immunitaria ai tumori. In effetti, la possibilità di distruggere cellule bersaglio, sulla cui superfi-

cie sia presente una sufficiente quantità di antigene specifico, costituisce la più tipica manifestazione delle reazioni della immunità cellulare. Queste reazioni, dirette contro singole cellule o tessuti (citotossicità), si realizzano attraverso meccanismi diversi, attivati dai linfociti T, che coinvolgono nella distruzione del tumore anche altri elementi cellulari.

Si riconoscono, fino ad oggi, tre principali tipi di citotossicità linfocitaria diretta, che prevede cioè un contatto diretto tra cellula effettrice e cellula bersaglio:

1) Citotossicità antigene-specifica. È mediata dai linfociti T citotossici (CTL) e si svolge con le tipiche caratteristiche di una risposta immunologica, in quanto richiede una pur breve esposizione all'antigene tumore-associato, in genere presentato loro dai macrofagi; a seguito di questo stimolo i linfociti vengono attivati e dopo differenziazione attaccano e uccidono le cellule tumorali. La reazione è perciò specifica per l'antigene (la lisi non coinvolge altre cellule «innocenti»). Per svolgere la loro funzione, i linfociti citotossici riconoscono (e debbono riconoscere) non soltanto l'antigene tumorale, ma anche gli antigeni della I classe del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Questo doppio riconoscimento operato dal linfocita T può essere realizzato mediante un singolo recettore, che riconosce simultaneamente sia l'antigene tumorale, sia gli antigeni MHC Una variante a questa ipotesi suggerisce che l'antigene estraneo interagisca con la molecola MHC modificandola; sarebbe proprio questa struttura *self* «alterata» ad essere riconosciuta dal recettore del linfocita T. Una seconda ipotesi prevede invece che vi siano due tipi di recettori sulla cellula T: uno che riconosce l'antigene tumorale e l'altro che riconosce la molecola MHC (fig. 2).

2) Citotossicità anticorpo-dipendente (ADDC). Le cellule effettrici in questa reazione sono i cosiddetti linfociti killer (K) che, come detto, si identificano con i linfociti nulli perché mancano dei marcatori sia T che B, ma presentano recettori molto avidi per la porzione Fc delle IgG. Quindi i linfociti K distruggono qualunque cellula tumorale su cui abbiano aderito IgG dirette contro antigeni di superficie, in modo da lasciare esposta la loro porzione Fc. Questi anticorpi vengono in genere prodotti contro gli antigeni tumore-asso-

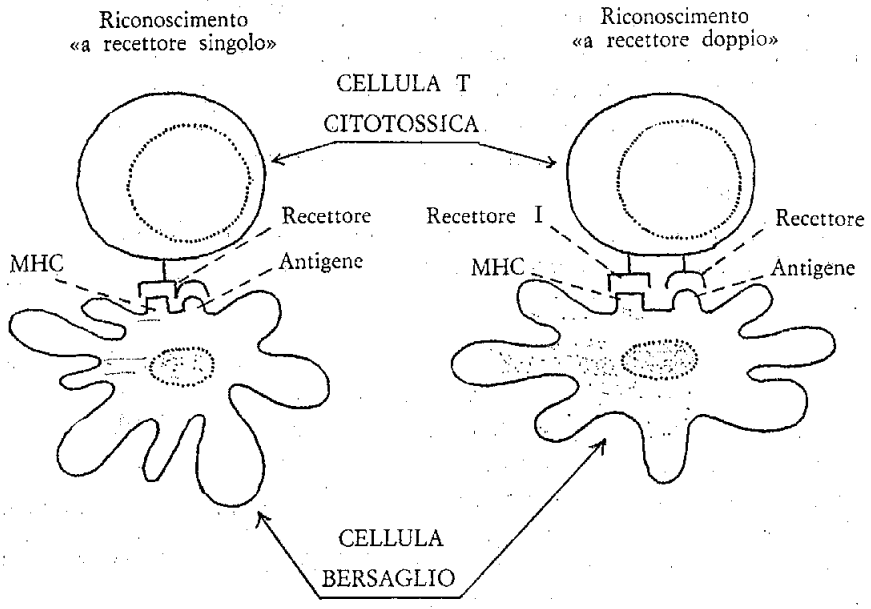

Fig. 2 - Rappresentazione schematica delle teorie sul doppio riconoscimento operato dal linfocita T citotossico nella reazione di citotossicità antigene-specifica contro la cellula tumorale.

ciati, comunque possono anche essere presenti anticorpi naturali, o generatisi spontaneamente, che posseggono una certa reattività contro una varietà di antigeni tumorali. Gli anticorpi, comunque, possono uccidere le cellule tumorali anche attraverso l'attivazione del complemento.

3) Citotossicità spontanea. Le cellule effettrici sono le cosiddette cellule NK (*natural killer*) (21), che appartengono alla popolazione dei linfociti nulli *. Non sono state per ora evidenziate particolari differenze fenotipiche tra le cellule K ed NK e pare che la prin-

* Sia le cellule K, sia le cellule NK si identificano con preparazioni cellulari, separabili dai leucociti del sangue periferico, mediante centrifugazione in gradiente di densità, che presentano la caratteristica morfologica di grossi linfociti granulari (LGLs). Questi hanno una dimensione di circa il 50% maggiore rispetto ai tipici linfociti, presentano una maggiore quantità di citoplasma, che contiene granuli azzurrofili e il loro nucleo è reniforme. Le cellule NK derivano dal midollo osseo e probabilmente rappresentano uno degli stadi pretimici del ciclo differenziativo dei linfociti T; sono relativamente radio-resistenti, non-aderenti, non-fagocitarie.

cipale differenza consista, probabilmente, nei meccanismi che regolano l'interazione tra cellula effettrice e cellula bersaglio. Nel caso dei linfociti NK cioè intervengono fenomeni ancora in parte sconosciuti, diversi certamente da quelli che caratterizzano le cellule CTL (ricognizione specifica dell'antigene di superficie) o le cellule K (riconoscimento di IgG adsorbite al bersaglio). L'attivazione delle cellule NK è indotta dall'interferone γ, prodotto dai linfociti T effettori su stimolo operato dalle cellule tumorali. Dopo attivazione le cellule NK sono in grado di riconoscere e ledere, mediante l'enzima litico arilsulfatasi, cellule appartenenti a vari tipi di tumore, specie di origine linfoide, ma anche di esplicare azione citotossica contro cellule fetali normali (ad esempio fibroblasti), senza che vi sia stata una precedente sensibilizzazione specifica; per questo motivo sono state denominate cellule *natural killer* e indicate come elementi specializzati nella prevenzione dei tumori al loro primo sviluppo (resistenza naturale) (9). La loro attività inoltre è intra- e interspecifica potendo distruggere cellule tumorali singeniche, allogeniche e xenogeniche; pertanto, a differenza dei linfociti T, non richiedono che la cellula effettrice e la cellula bersaglio abbiano gli stessi antigeni MHC.

In tutti i casi descritti, le fasi che portano alla distruzione della cellula bersaglio da parte di linfociti effettori sono simili: dopo il legame con i linfociti si osservano nel bersaglio marcate modificazioni morfologiche, caratterizzate da una alterata permeabilità di membrana, dalla emissione di «podosomi» (frammenti citoplasmatici rivestiti da membrana) e da un rigonfiamento osmotico seguito da lisi (fig. 3).

Anche se, come detto, sono i linfociti effettori (CTL, cellule K e NK) a giocare il ruolo primario nella difesa immunitaria ai tumori, altri elementi cellulari e umorali collaborano allo scopo. I macrofagi, per esempio, possono venire coinvolti nella risposta antitumorale in almeno due modi. Più precisamente gli anticorpi diretti contro antigeni tumore-associati possono formare un ponte tra la cellula tumorale (cui si legano mediante i siti combinatori) ed il macrofago (cui si legano mediante la loro regione Fc e l'equivalente recettore del macrofago); questo legame a ponte attiva il potenziale citolitico dei macrofagi e porta alla uccisione della cellula tumorale. I macrofagi possono anche venire attivati da una linfochinina, il «fattore specifico attivante i macrofagi» (SMAF), rilasciata dai linfociti T immuni.

Anche gli anticorpi che compaiono nel corso della manifestazione

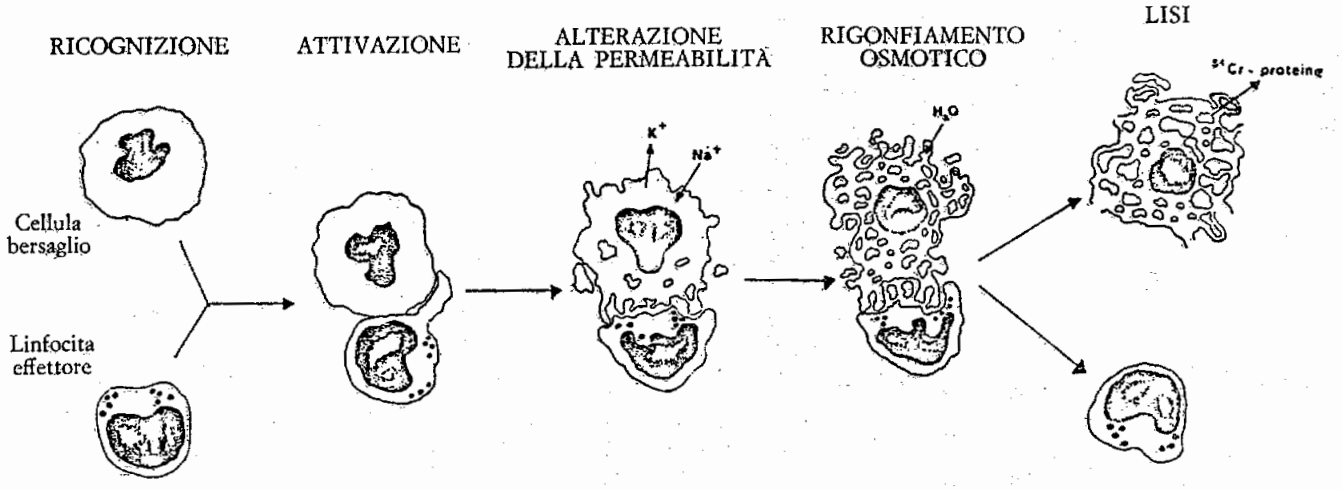

Fig. 3 - Eventi che portano alla lisi della cellula bersaglio ad opera dei linfociti T citotossici. La distruzione del bersaglio può venire valutata attraverso il dosaggio delle proteine marcate con ^{51}Cr, liberate dalla cellula in fase di distruzione.
(Ridisegnato da C.E. Grossi e M.F. Greaves)

neoplastica intervengono, come abbiamo visto, in alcuni meccanismi di difesa anti-tumore (reazione ADCC e attivazione dei macrofagi). D'altra parte, però, la presenza di anticorpi specifici anti-tumore non sempre è correlata alla resistenza contro lo sviluppo del tumore: anzi, in alcune circostanze, si è osservato che tali anticorpi danno origine a immunocomplessi, che possono funzionare da fattori bloccanti le difese immuni e favorenti la crescita neoplastica.

Meccanismi che consentono ai tumori di sfuggire alle difese immunitarie dell'ospite

Il fatto che molti individui muoiano di cancro indica che i meccanismi di difesa dell'ospite sono spesso inefficaci, nonostante il coinvolgimento di così tante ed efficienti componenti del sistema immunitario. Apparentemente il tumore sfrutta alcune delle tattiche che mettono in atto i parassiti per evadere l'immunità e svilupparsi indisturbati. Qui di seguito è riportata brevemente la descrizione di alcuni di questi meccanismi. Per maggiori informazioni si rimanda ai lavori di Kamo e Friedman (11), di Gorelik (4) e di North (16).

Immunoselezione. Sebbene ogni tumore origini verosimilmente da una singola cellula e rappresenti pertanto un clone, le cellule in questo clone non rimangono sempre uguali. Mentre il tumore cresce, si realizzano mutamenti continui per cui, a tempi diversi, la popolazione cellulare del tumore è rappresentata da una miscela eterogenea di subcloni diversi.

Se qualcuna di tali modificazioni esita in una ridotta antigenicità di qualche cellula, tale variante a bassa antigenicità può svilupparsi e avere il sopravvento sulle altre, a causa della pressione selettiva esercitata sulle cellule tumorali da parte del sistema immunitario dell'ospite. Questa variante cellulare può pertanto svilupparsi e aumentare così la generale immunoresistenza del tumore. La ridotta antigenicità delle cellule tumorali può essere dovuta non solo alla delezione degli antigeni, ma anche alla diminuzione della loro densità sulla membrana citoplasmatica; se la densità si riduce al di sotto di un determinato livello soglia, il tumore può diventare «invisibile» al sistema immunitario.

Modulazione antigenica. Viene così indicato il fenomeno della temporanea scomparsa degli antigeni di superficie delle cellule tumorali, a seguito della loro esposizione ad anticorpi specifici. La scomparsa degli antigeni sembra realizzarsi attraverso meccanismi di rilascio e/o di ingestione (endocitosi) dei complessi antigene-anticorpo formatisi (tali meccanismi sono più noti con i termini anglosassoni di «*patching*», «*capping*» e «*shedding*»). È interessante notare che è sufficiente un singolo passaggio del tumore in un ospite singenico, non immune, per osservare la completa ricomparsa degli antigeni perduti.

Stimolazione dei linfoctii T suppressor. È stato chiaramente dimostrato e ampiamente confermato che la crescita di un tumore immunogenico può indurre l'ospite ad attivare i linfociti T *suppressor* (15), i quali, a loro volta, inducono una soppressione di meccanismi immunitari anti-tumore sia specifici, sia aspecifici. In particolare è stato osservato che l'attivazione dei linfociti T *suppressor*, nei soggetti portatori di tumore, influenza negativamente l'attivazione dei linfociti T citotossici e la sintesi anticorpale. D'altra parte è difficile spiegare logicamente perché la cellula tumorale è in grado di attivare i linfociti T *suppressor*, dal momento che queste cellule fanno parte della rete immunologica e sono anzi il prodotto di una risposta immunitaria; dovrebbero cioè intervenire per interrompere una precedente risposta immunitaria anti-tumore.

Meccanismo dello «sneaking through». I ricercatori hanno rilevato che animali inoculati con dosi molto modeste di cellule tumorali manifestano spesso il tumore più frequentemente di quelli inoculati con dosi maggiori. Questa osservazione ha indotto alla formulazione della ipotesi cosiddetta dello «*sneaking through*» (letteralmente «scivolare attraverso»), secondo la quale poche cellule neoplastiche contengono una quantità di antigene troppo modesta per stimolare le difese immunitarie dell'ospite e pertanto, quando si sviluppa l'immunità in grado significativo, la massa tumorale è già così imponente da essere oltre le possibilità difensive del sistema immune. Questa semplice ipotesi è però molto difficile da dimostrare o da smentire, sperimentalmente.

Potenziamento immunologico del tumore. In condizioni sperimentali, il trattamento inteso a potenziare la risposta immunitaria dell'ospite

verso il tumore può talvolta portare all'effetto opposto e cioè promuovere la crescita del tumore. Questo potenziamento della crescita del tumore (in inglese: «*immunological enhancement*») è mediato da una particolare classe di anticorpi sierici, che agiscono sia direttamente sul tumore o su meccanismi immunitari attivati dal tumore stesso. Non si conosce ancora cosa renda un anticorpo «potenziante» e neppure come tali anticorpi agiscano nell'inibire il rigetto del tumore. Secondo alcune teorie, tali anticorpi alterano la superficie delle cellule tumorali in modo tale che possono sfuggire alle difese dell'ospite; è pure possibile che gli anticorpi combinandosi con il materiale antigenico rilasciato dal tumore impediscano che questo sensibilizzi l'ospite; ancora è possibile che gli anticorpi o i complessi antigene-anticorpo agiscano sui centri linfoidi inibendo la risposta cellulo-mediata contro il tumore.

Comunque agiscano, questi anticorpi intervengono soprattutto nei tumori trapiantati tra soggetti allogenici, mentre è meno chiaro se compaiano ed abbiano effetto nei tumori singenici.

Fattori bloccanti. Il siero dei soggetti portatori di tumore ha la capacità di abrogare *in vitro* l'attività citotossica dei linfociti T verso le cellule neoplastiche. Questa inibizione è attribuita ai cosiddetti «fattori bloccanti» che, combinandosi con antigeni presenti sulle cellule tumorali, prevengono il legame e la successiva citolisi da parte di linfociti sensibilizzati o di anticorpi citotossici. Questi fattori sono probabilmente diversi dagli anticorpi coinvolti nel fenomeno del «potenziamento» e possono verosimilmente identificarsi con complessi antigene-anticorpo. Non si conosce comunque il ruolo, se esiste, che hanno i fattori bloccanti *in vivo*.

Immunosoppressione. Alcuni tumori, che invadono i tessuti linfoidi, possono interferire con la normale risposta immunitaria e pertanto rendere inefficienti le difese anti-tumore. Questo tipo di depressione è stato dimostrato, nei soggetti portatori di tumore, nei confronti di un'ampia varietà di antigeni.

Per concludere, alcune considerazioni di ordine generale; ci si aspetta nei primissimi anni una migliore comprensione della natura degli antigeni tumore-associati e delle risposte immunitarie che essi evocano.

Poiché è stato acquisito che le reazioni immunitarie sono control-

late da geni, è ora necessario definire come funziona il controllo genetico della risposta immune contro il tumore. Per di più, per prevenire che il tumore si sottragga alla distruzione immuno-mediata, è indispensabile conoscere come superare la restrizione genetica che opera sulla risposta immune e come forzarne la rete regolatrice «attivazione-soppressione», in un rapporto a favore dei meccanismi anti-tumore.

A questo proposito assumono particolare importanza le future conoscenze sull'azione degli immunomodulatori e dei loro mediatori endogeni, oltre che, ovviamente, sui meccanismi molecolari dell'induzione del tumore.

BIBLIOGRAFIA

1) Antczak D.F., Newman M. (1983): Histocompatibility polymorphisms in domestic animal. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., *27*, 1.
2) Burton R.C., Warner N.L. (1977): In vitro induction of tumor specific immunity. Cancer Immunol. Immunother, *2*, 91.
3) Burton R. e Coll. (1975): In vitro induction of tumour specific immunity. J. Immunol. Methods, *8*, 133.
4) Gorelik E. (1983): Concomitant tumor immunity and the resistance to a second tumor challenge. Adv. Cancer Res., *39*, 71.
5) Haskill J.S. e Coll. (1978): Systemic and local immunity in allograft and cancer rejection. Contemp. Top. Immunobiol., *8*, 107.
6) Hellström K.E., Hellström I. (1974): Lymphocyte-mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. Adv. Immunol., 18, 209.
7) Herberman R.B. (1974): Cell-mediated immunity to tumor cells. Adv. Cancer Res., *19*, 207.
8) Herberman R.B. (1977): Immunogenicity of tumor antigens. Biochim. biophys. Acta, *473*, 93.
9) Herberman R.B. (1981): Review article: significance of natural killer (NK) cells in cancer research. Hum. Lymph. Differ., *1*, 63.
10) Herberman R.B. e Coll. (1976): Immunogenicity of tumor antigens. Ann. N.Y. Acad. Sci., *276*, 26.
11) Kamo I., Friedman H. (1977): Immunosuppression and the role of suppressive factors in cancer. Adv. Cancer. Res., *25*, 271.
12) Klein G. (1966): Tumor antigens. Ann. Rev. Microb., *20*, 223.
13) Klein G. (1972): Tumor immunology. In: Clinical immunobiology. Bach and Good (Eds). Academic Press, N.Y., *1*, 219.

14) LONGENECKER M., MOSMANN T.R. (1981): Structure and properties of the major histocompatibility complex of the chicken. Speculations on the advantages and evolution of polimorphism. Immunogenetics, *13*, 1-23.
15) NAOR D. (1979): Suppressor cells: permitters and promoters of malignancy? Adv. Cancer. Res., *29*, 45.
16) NORTH R.J. (1984): The murine antitumor immune response and its therapeutic manipulation. Adv. Immunol., *35*, 89.
17) OLD L.J. e Coll. (1964): Immunology of experimental tumors. Ann. Rev. Med., *15*, 167-186.
18) PREHN R.T. (1974): Immunological surveillance pro and con. In: Clinical Immunobiology. BACH and GOOD (Eds). Academic Press, N. Y., vol. II, 191.
19) SHIN H.S. e Coll. (1978): Mechanisms of tumor immunity: the role of antibody and nonimmune effectors. Quoted by: KALLOS et al. Progr. Allergy, *25*, 163.
20) STUTMAN O. (1977): Immunodeficiency and cancer. In: Mechanism of tumor immunity. GREEN COHEN and MCCLUSKEY (Eds). Wiley and Sons, N.Y., 27-53.
21) TESTI R. e Coll. (1984): Caratterizzazione e ruolo *in vivo* delle cellule Natural *killer* (NK) umane. Immunol. Clin. Sper., *III*, 87.
22) VRIESENDORP H.M. e Coll. (1977): The major histocompatibility system of the dog. In: The major histocompatibility system in man and animals. GÖTZE D. (Ed.). Springer-Verlag, N.Y., 129-163.
23) WAGNER H. e Coll. (1980 a): T-cell derived helper factor allows *in vivo*, induction of cytotoxic T cells in *nu/nu* mice. Nature (Lond.), *284*, 278.

E. Clerici *

LA COMPROMISSIONE DEL SISTEMA IMMUNITARIO NEL PORTATORE DI TUMORE **

Nel 1908 Paul Ehrlich, in una conferenza sull'immunologia dei tumori, che è rimasta famosa, postulò che le cellule maligne si formano frequentemente nel corso della vita e che sul loro plasmalemma compaiono nuove strutture antigeniche contro le quali l'ospite può produrre una risposta anticorpale che, nella maggior parte dei casi, è sufficiente ad eliminare le cellule trasformate.

Cinquanta anni più tardi, Lewis Thomas (1959) avanzò l'ipotesi che, nel corso dell'evoluzione della specie, lo sviluppo dell'immunità cellulare è stimolato dalla necessità di rigettare le cellule maligne insorte per mutazione somatica. Nello stesso periodo, ma dopo la formulazione dell'ipotesi di Thomas, questi concetti vennero ripresi da F.M. Burnet (1970) che coniò il termine di *sorveglianza immunologica* per definire la capacità dell'ospite di riconoscere tempestivamente i cloni maligni non appena essi emergono, in modo da distruggerli prima che la massa tumorale possa raggiungere una dimensione critica, al di là della quale questo meccanismo di controllo diverrebbe inefficace.

I postulati di Ehrlich, riveduti e corretti da Thomas, Burnet e da innumerevoli altri ricercatori in più di tre quarti del presente secolo, non hanno potuto essere dimostrati nel caso dei tumori umani, che ci interessano da vicino, e di quelli che insorgono spontaneamente negli animali di laboratorio, perché in entrambe queste condizioni né l'esistenza di TSTA (Tumor Specific Transplantation Antigens) né quella di una reazione immunitaria specifica sono state provate in maniera indiscutibile.

Al contrario, se si prendono in considerazione i tumori sperimen-

* Cattedra di Immunologia dell'Università di Milano, e Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano.
** Eseguito con il contributo C.N.R. n. 83.00777.96.

talmente indotti nei topi, ed altre specie, con cancerogeni chimici o fisici e con virus oncogeni, i postulati della sorveglianza immunologica, rimangono fondamentalmente validi. Le revisioni e correzioni sopraccitate si riferiscono al fatto che più del 90% dei tumori chimici dei topi sono stati indotti con il carcinogeno sintetico metilcolantrene che è un potente immunosoppressore. Si può presumere che proprio tale trattamento faccia emergere nell'ospite primario dei cloni cancerosi immunogenici e che la loro immunogenicità si manifesti meglio dopo isotrapianto in un accettore non immunodepresso.

Anche altri cancerogeni chimici, compreso uno assai debole come l'uretano, sono immunosoppressivi e quindi il meccanismo ora ipotizzato per il metilcolantrene potrebbe essere facilmente generalizzato. In altri termini, i modelli sperimentali sui quali si basa la filosofia dei TSTA da oncogeni chimici sono troppo limitati e criticabili; i denigratori sostengono che non si tratta che di artefatti di laboratorio, il cui comportamento non è estrapolabile all'uomo. Inoltre, gli antigeni tumorali vengono considerati «deboli» perché solo pochi di essi sono in grado di produrre modeste reazioni di rigetto. Rimane però il fatto, indiscutibile, che (alcuni) tumori chimici portano veri TSTA e che contro di essi si attua una reazione anticorpale, non necessariamente protettiva, ma ben dimostrabile (Hewitt, 1982).

Ricordo che qualsiasi tumore indotto da un singolo cancerogeno chimico è antigenicamente distinto da ogni altro, come si evince da esperimenti di immunizzazione crociata. Ciò è come dire che due tumori provocati in differenti animali dalla stessa sostanza cancerogena e persino due diverse sezioni di un voluminoso tumore suscitato da detto cancerogeno risultano immunologicamente differenti negli esperimenti di trapianto.

I virus oncogeni a DNA e RNA, inoculati in animali recettivi, inducono la formazione di diversi nuovi antigeni, detti collettivamente TAA (Tumor Associated Antigens), alcuni dei quali si comportano come veri e propri TSTA, contro cui si può esercitare il rigetto da parte dei T-linfociti immuni dell'ospite. Gli altri TAA, come quelli da *differenziazione* (ad esempio, l'antigene TL che si manifesta nelle cellule dei topi che normalmente mancano di questo marcatore timico), o quelli *oncofetali* (ad esempio: l'α-fetoproteina, che svelano una regressione evolutiva delle cellule maligne) e gli antigeni caratteristici dello stesso virus infettante, sono solo «spie» del tumore e contro di

essi *non* si attua la reazione di rigetto (Cooper e Stone, 1979; Old, 1981).

L'immunogenicità da virus oncogeni è abitualmente «forte» come indicato da una significativa incidenza di rigetto dei tumori dopo trapianto isologo e di regressioni spontanee degli stessi. Il rigetto dei tumori da virus soggiace però ad una insospettata limitazione che si dimostra nei sistemi murini *in vitro*. Infatti, la distruzione delle cellule tumorali delle leucemie da parte dei T-linfociti è *ristretta* alle cellule maligne che: 1) sono state trasformate dal virus appropriato e 2) hanno gli stessi antigeni di istocompatibilità H-2 delle cellule citotossiche. Le cellule tumorali indotte dallo stesso virus, ma in topi con assetto genetico H-2 differente da quello dei T-linfociti citotossici, non vengono affatto distrutte da questi ultimi. Si tratta del *fenomeno di Zinkernagel-Doherty (1979)*, il quale può recitare una parte da protagonista nella sorveglianza immunologica che le cellule del sistema linfociti-macrofagi eserciterebbero *in vivo*. Diversamente da quelli chimici, differenti tumori indotti nei topi dallo stesso virus oncogeno o da una famiglia di virus manifestano TSTA identici fra di loro; ciò vale anche per tumori virali che insorgono in tessuti istogeneticamente differenti (Levy, 1977).

Sfortunatamente, tutte queste osservazioni non si possono applicare ai tumori umani, poiché nessuno di questi è sicuramente ad eziologia virale. Non si può tuttavia dimenticare la costante «associazione» del virus di Epstein-Barr con il linfoma di Burkitt ed il carcinoma nasofaringeo, e del virus dell'Herpes simplex con il carcinoma della cervice uterina ed i carcinomi dell'orofaringe.

La cellula tumorale è un avversario evanescente o troppo ben mimetizzato, per poter essere affrontata con successo dal sistema immunitario, a meno che si tratti di quelle neoplasie sperimentali chimiche e virali le cui cellule, a causa dei TSTA che veicolano, suscitano una reazione specifica di rigetto. Per quanto riguarda i tumori da virus, l'immunizzazione contro l'agente eziologico dovrebbe prevenire l'effetto cancerogeno. L'ipotesi si è confermata esatta nel noto caso della malattia di Marek del pollo, dovuta ad un Herpes-virus oncogeno. Inoltre, si stanno attuando esperimenti su vasta scala di immunoprofilassi contro altri virus oncogeni, specie quelli della leucemia e del sarcoma dei gatti. Nel caso del tumore sperimentale stesso, l'immunoprofilassi è condizionata dal fatto che le cellule tumorali abbiano TSTA

ben riconoscibili. A questo proposito esistono migliaia di tentativi, riferiti in letteratura, di immunoprofilassi con: 1) cellule tumorali vive in dose subletali; 2) cellule tumorali la cui capacità replicativa è stata bloccata; 3) cellule tumorali con plasmalemma alterato enzimaticamente o chimicamente e 4) estratti di cellule tumorali che contengono TSTA ed estratti modificati chimicamente. Gli effetti protettivi che si ottengono con questi artifici sono dimostrabili, ma valgono solo, lo ripetiamo, per i tumori da virus oncogeni, in esperimenti nei quali si usano topi singenici e, soprattutto, per inoculi eseguiti con dosi assai modeste di cellule vive e virulente. Quando l'inoculo cancerogeno è superiore ad un certo valore numerico, il tumore cresce rapidamente perché è in grado di inibire la reazione immunitaria contro se stesso (Benjamini *et alii*, 1982).

Poiché la profilassi contro i tumori per mezzo della vaccinazione richiede che vi sia reattività crociata fra l'immunogeno e le cellule maligne, è evidente che si può immunizzare solo nel caso dei tumori da virus e non in quello dei tumori di origine chimica, ognuno dei quali dispone di antigeni individuali privati, come già prima abbiamo ricordato oppure non dispone di alcun TSTA dimostrabile.

La situazione si complica maggiormente se si prendono in considerazione le neoplasie spontanee degli animali e degli uomini, che, fino a prova contraria, non hanno TSTA riconoscibili in modo indiscutibile (Hewitt, 1982).

Poiché la reazione anticorpale è, per definizione, *specifica*, quando manca l'antigene devono intervenire, in nostra difesa, i meccanismi protettivi filogeneticamente inferiori rispetto a quelli immunitari propri dei Vertebrati, che è come dire la fagocitosi e l'attività citotossica delle cellule NK (Natural Killer). Infatti, la lisi delle cellule tumorali può essere mediata da macrofagi, i quali vengono indotti a tale funzione per intervento di linfochine prodotte dai T-linfociti, come lo SMAF (Specific Macrophage Arming Factor) ed altre ancora, oppure anticorpi citofili. Questi meccanismi *attivano o armano* i macrofagi, ossia li rendono rispettivamente capaci di aggredire la cellula neoplastica in modo aspecifico (se è priva di TSTA), ma apprezzabilmente selettivo, quasi che la cellula maligna si faccia in qualche modo, anche se non immunologico, riconoscere, oppure in modo specifico (se è, ovviamente, dotata di TSTA). Su questo fondamento si sono appoggiati i molti

tentativi di immunoterapia e di immunoprofilassi con i cosiddetti *adiuvanti*, che modificano la capacità di risposta immune del soggetto al quale vengano somministrati.

Si tratta di sostanze prevalentemente di origine batterica, le quali aumentano l'immunogenicità degli antigeni deboli attraverso meccanismi la cui natura più intima ancora ci sfugge, ma che coinvolgono principalmente le funzioni delle cellule linfoidi e dei macrofagi. Ricordiamo fra queste sostanze il Bacillo di *Calmette-Guérin* o BCG, il MER (Methanol Extraction Residue of phenol-treated BCG), la parete cellulare del BCG, il Muramyl Dipeptide (MDP), il PPD (Protein Purified Derivative), le endotossine batteriche (lipopolisaccaridi, lipide A) ed il *Corynebacterium parvum*. Altre sostanze di origine non batterica sono il Dinitroclorobenzene, il Levamisolo, che è un antielmintico per uso veterinario, ed ancora i fattori timici (timosina, fattore timico, timopoietine), lo RNA isolato da linfociti immuni, il Transfer Factor, che è un estratto dializzabile di leucociti immuni, l'Interferon e i suoi induttori, come lo RNA a doppia elica derivato dal *Penicillium chrysogenum* ed altre ancora. Poiché non tutte queste sostanze sono adiuvanti, in senso stretto, si è preferito usare per esse il termine cumulativo di *Immunomodulatori*, che ha significato più estensivo.

Gli immunomodulatori batterici agiscono stimolando il sistema reticolo-endoteliale e non è chiaro se si tratti di un effetto primitivo o secondario all'attivazione aspecifica dei T-linfociti. Poiché si postula che la stimolazione del sistema reticoloendoteliale rappresenti uno dei meccanismi di difesa antineoplastica, gli immunomodulatori batterici sono stati usati dapprima negli animali portatori di tumore e poi nell'uomo. In questo ultimo si sono avuti, o si è dichiarato di avere, successi in vari campi dell'oncologia come, per esempio, il melanoma maligno, la leucemia mieloide acuta, certi linfomi, carcinomi bronchiali, neuroblastomi ed altri tumori solidi. Però non è detto che questi risultati favorevoli siano da attribuirsi ad una attivazione o riattivazione della sorveglianza immunologica, obnubilata dalla crescita neoplastica, che è come dire ad una reazione d'allotrapianto mediata dai T-linfociti e diretta contro i TSTA, la cui esistenza, nei tumori umani, è come sappiamo, incerta. Gli immunomodulatori batterici possono agire in altri modi, per esempio inducendo l'organismo a reagire contro sostanze scarsamente immunogenetiche, prevenendo o interrompendo stadi di tolleranza immunologica aspecifica, garantendo prote-

zione contro molti stimoli immunosoppressori estrinseci, quali le radiazioni ionizzanti e le sostanze chemioterapiche stesse; oppure intrinseci, quali l'età avanzata o molto immatura, che sono caratterizzate da una relativita incapacità immunologica. Ciò conduce ad una maggiore resistenza dell'organsimo nei confronti di quelle gravi infezioni che nel paziente canceroso si accompagnano alla chemioterapia immunosoppressiva e, di conseguenza, alla facilitazione della terapia intensiva con altri mezzi.

In definitiva, la riattivazione del sistema immunologico sarebbe utile perché permetterebbe di condurre efficienti terapie antineoplastiche con metodi immunologici o non immunologici, anche se l'immunogenicità del tumore è scarsa o assente e la reattività immunologica dell'ospite è inizialmente carente. Considerazioni parallele si possono estendere agli immunomodulatori di origine non batterica, alcuni dei quali, come il Dinitroclorobenzene, sono stati usati con successo nella terapia dei melanomi ed epiteliomi cutanei, sia primitivi che secondari (Clerici, 1980).

Le cellule NK sono caratterizzate dalla loro capacità di esercitare una rapida azione citotossica contro cellule maligne (o infettate da virus), *in assenza di precedente sensibilizzazione o di immunizzazione intenzionale*; si tratta, per così dire, di citotossicità spontanea. Si tratta di cellule linfoidi non-immuni che hanno l'aspetto di grandi linfociti granulosi (LGL) a causa della presenza di granuli azzurrofili nel proprio citoplasma, le quali possono venire isolate dal sangue periferico di topi, ratti, uccelli, primati non-umani, Uomo, ed altre specie. Esse non appartengono né ai B né ai T-linfociti, sono non-aderenti e non-fagocitiche ed hanno il recettore Fc per le IgG (quindi possono funzionare anche come K cellule nella citotossicità anticorpo-dipendente = ADCC). Il 50% di quelle umane ha recettori di bassa affinità per le emazie di montone, con le quali formano rosette a 29°C; esse condividono alcuni antigeni di superficie con i T-linfociti umani, come si può dimostrare con gli anticorpi monoclonali 9.6 e 3A1. Per analogia, almeno la metà delle cellule NK murine esprime l'antigene Thy-1 ed il 20% reagisce con un anticorpo monoclonale diretto verso l'antigene Lyt-1. Inoltre le cellule NK crescono in risposta al TCGF (T Cell Growth Factor o Interleuchina-2) e producono tale sostanza e, quando sono fortemente concentrate, vengono stimolate dai

mitogeni per i T-linfociti, come la Fitoemagglutinina e la Concanavalina A. Però occorre rilevare che sia nell'uomo che nel topo, le cellule NK hanno anche antigeni superficiali simili a quelli veicolati dai macrofagi.

L'attività antineoplastica delle cellule NK è stata dimostrata essenzialmente *in vitro*, in esperimenti di rilascio di ^{51}Cr da cellule bersaglio umane (K562), C38NTD e YAC (nel ratto) e YAC (nel topo), ma anche *in vivo*, nei topi atimici *nude*, che pur mancando di T-linfociti, ma essendo ricchi di cellule NK, non sviluppano tumori spontanei con frequenza superiore a quella degli animali di controllo, nei pazienti con la sindrome di Chediak-Higashi, i quali hanno una spiccata e selettiva carenza di cellule NK e, contemporaneamente, un'alta incidenza di malattie linfoproliferative ed infine nei topi *beige*, nei quali la stessa carenza si accompagna ad una sorprendente frequenza di linfomi. Persino la aumentata incidenza di malattie linfoproliferative e di altri tumori nei trapiantati renali immunodepressi con farmaci citostatici viene ricondotta ad una grave depressione dell'attività NK.

Le cellule NK possiedono una notevole capacità di autoregolazione, nella quale recita un ruolo cruciale lo Interferon (IFN). Poiché lo IFN stesso mostrerebbe promettenti qualità di modulatore della crescita neoplastica, è comprensibile come, in questi recenti anni, si sia dedicata molta attenzione ai meccanismi attraverso i quali esso controlla il sistema NK. La somministrazione di IFN o di induttori (poli I-C; BCG; copolimeri piranici, *Corynebacterium parvum*) a topi per via sottocutanea o intraperitoneale aumenta la citotossicità spontanea NK e lo stesso effetto si può ottenere *in vitro*, trattando con IFN cellule effettrici isolate dal sangue periferico umano. Tutti i tipi di IFN, α, β, γ, sono egualmente attivi e l'aumento di citotossicità viene inibito dalla actinomicina e dalla puromicina, che è come dire che la sua manifestazione dipende dalla sintesi di RNA e proteine.

Quando è stato possibile isolare le cellule NK e riconoscere che si trattava di LGL, si è chiarito addirittura che esse stesse, al contatto con le cellule bersaglio neoplastiche, producono IFN e che la sintesi di questa proteina è necessaria per esaltare l'attività citotossica «spontanea». Ciò avverrebbe attraverso un aumento numerico delle cellule effettrici, causato dall'attivazione, da parte dello IFN, di precursori inattivi, che sono stati definiti «pre-NK». Lo IFN quindi recluta una popolazione pre-NK, originariamente inerte, facendola diventare cito-

tossica, e induce la espressione di «marcatori» delle cellule mature, come, nel topo, lo Ly-5.

Sulla scorta di queste osservazioni si è formulato un modello di controllo retroattivo positivo (positive feed-back) all'interno del sistema NK, in cui lo IFN agisce da mediatore. Esso implica che le cellule NK mature e circolanti abbiano una elevata affinità di legame con i bersagli maligni e che, non appena avvenuto il contatto, liberino IFN, che subito attiva gli elementi «pre-NK» trasformandoli in cellule dotate di piena capacità citotossica. In questo ciclo, entra in gioco lo IFN-α, ma non si sa quali o quanti prodotti dei geni per lo α-IFN siano coinvolti.

Il sistema NK umano e degli animali da esperimento viene regolato anche da cellule soppressive che apparterrebbero alla serie dei monociti-macrofagi e che agirebbero attraverso la liberazione di fattori solubili, forse di tipo prostaglandinico (PG). Infatti sembra che l'inibizione della sintesi delle PG da parte dell'aspirina aumenti l'attività NK. È noto che i macrofagi attivati, per esempio dallo IFN, secernono PG, le quali, deprimendo la citotossicità naturale, potrebbero creare i presupposti per l'emergenza di tumori che, in condizioni normali, sarebbero tenuti sotto controllo dal sistema NK. Attività soppressiva viene esercitata anche da T-linfociti umani con il recettore Fc per le IgG (Ts) la cui attività viene inibita dallo IFN; ciò rappresenta un'ulteriore via di incremento della citotossicità NK da parte dello IFN. Quindi, il feed-back positivo sopraccitato diviene più complesso, perché l'IFN, prodotto dal contatto fra cellula NK e bersaglio, aumenta la citotossicità, e la amplia non solo reclutando i precursori «pre-NK», ma anche inibendo le cellule Ts. Invece, la sua azione di attivazione dei macrofagi, che porta alla liberazione di PG, produce effetti negativi, perché tali derivati della cicloossigenazione dell'acido arachidonico deprimono la citotossicità NK. Tutte queste considerazioni, che aspettano verifiche e conferme, si applicano quasi esclusivamente ai sistemi *in vitro*; che la citotossicità spontanea reciti un ruolo rilevante nel controllo *in vivo* della crescita neoplastica è ancora da dimostrare. Certamente, non appena si avrà, grazie all'impiego di DNA-ricombinante, illimitata disponibilità di IFN, si potrà procedere ad esperimenti *in vivo* ampi, estensivi e ben pianificati, che dovrebbero chiarire molti aspetti di questo spinoso problema.

Le cellule NK possono essere considerate come un sistema omeo-

statico ontogenicamente antico, il cui modo di agire è meno selettivo di quello del raffinatissimo e più recente sistema immunitario dei Vertebrati. Anche la produzione di IFN è una proprietà cellulare altamente conservatasi all'interno di tutto il Regno Animale. Probabilmente lo IFN è sorto dapprima come fattore protettivo a livello di singole cellule e, successivamente, si è adattato a fungere da messaggero e regolatore quando un sistema difensivo di «seconda generazione» composto da più numerosi e differenti elementi cellulari si è fatto strada nell'evoluzione della specie. Terminando questo argomento, è curioso osservare che *l'interferenza virale* è una manifestazione *non* immunologica e che anche le cellule NK non appartengono a rigore di termini, al sistema immunitario. Ovvero, la difesa immunologica contro i tumori è affidata a sostanze e cellule che nulla hanno a che fare con l'Immunità in senso stretto (Herberman e Ortaldo, 1981; Saksela, 1981; Oldham, 1982).

La tecnica di produzione degli anticorpi monoclonali, introdotta da Kohler e Milstein solo nel 1975, è potenzialmente quella che ha le maggiori possibilità di portare alla individuazione di anticorpi specifici per gli antigeni tumorali o, viceversa, di smascherare antigeni tumorali specifici la cui esistenza non era sino ad ora dimostrabile con tecniche tradizionali. L'esperimento di base è il seguente. Cellule spleniche di topo immunizzato con un certo tumore umano vengon fuse con una linea di cellule murine mielomatose in crescita continua. Gli eterocarioti che si formano vengono prima fatti crescere in terreni culturali selettivi e poi clonati. Ogni cultura che produce anticorpi diretti contro il tumore immunizzante viene attentamente selezionata per la specificità. La maggior parte di esse produrrà anticorpi diretti semplicemente contro gli antigeni di istocompatibilità normali del paziente canceroso ma alcune reagiranno solo con le cellule tumorali e non con quelle normali del paziente, come ad esempio, i suoi leucociti. In questo secondo caso, si tratta di anticorpi monoclonali specifici per il tumore. Naturalmente occorre sempre una certa cautela e spirito critico nel valutare la specificità degli anticorpi monoclonali. Ad esempio, le cellule maligne possono comportarsi come spugne e, abbastanza frequentemente, una potenziale risposta anti-tumorale si è dimostrata, ad una più attenta verifica, diretta contro antigeni del siero di feto di vitello, usato in questo tipo di ricerche (Nossal, 1980).

A dispetto di questo ed altri inconvenienti, è più che ragionevole

riporre le nostre speranze di una futura terapia oncolitica specifica sulla tecnica della ibridazione somatica. Non appena si disporrà di un anticorpo monoclonale capace di riconoscere un TSTA umano comune a un tumore dello stesso istotipo (ad esempio, un melanoma maligno, un adenocarcinoma mammario etc.), sarà possibile isolare l'antigene e poi sintetizzarlo per mezzo delle tecniche del DNA-ricombinante. Il disporre di grandi quantità di un TSTA umano puro è il preludio necessario alla sua caratterizzazione chimica ed alla produzione degli agognati vaccini antineoplastici.

Nel frattempo, gli anticorpi monoclonali hanno già portato a notevoli progressi nella identificazione e classificazione delle sottopopolazioni di T e B linfociti umani e nello inquadramento dei linfomi da essi derivati.

Non si tratta ancora di riconoscere antigeni *specifici* di tali linfomi, perché gli stessi antigeni sono veicolati dai precursori normali, ma di riconoscere lo stadio ontogenetico della malattia, cosa che ha rilevanti implicazioni prognostiche e terapeutiche.

Per quanto riguarda le applicazioni pratiche degli anticorpi monoclonali nella immunoterapia dei tumori, vale la pena di ricordare che essi sono già stati utilizzati in numerose leucemie e linfomi umani, ad esempio, in linfomi linfocitici diffusi e poco differenziati (anticorpo Ab89), in leucemie acute linfoblastiche non-T (anticorpo J5 contro l'antigene comune della leucemia linfoblastica detto CALLA), nelle leucemie e nei linfomi cutanei a T-cellule (anticorpo L17F12) e nella leucemia cronica a B-cellule (anticorpo T101). Dopo la somministrazione dei sopraddetti anticorpi monoclonali le cellule maligne diminuiscono rapidamente nel circolo, ma risalgono ai valori normali entro 24-36 ore cosicché non si sono ottenute risposte clinicamente significative. Inoltre, l'azione degli anticorpi monoclonali è ostacolata dalla presenza di antigeni circolanti, dalla modulazione antigenica, dall'insorgere di reazioni anafilattoidi verosimilmente dovute ad una ipersensibilità alle proteine murine, dal loro reagire anche con svariate cellule normali del sistema emopoietico ed infine dall'insufficienza dei meccanismi immunitari effettori del paziente. Infatti gli anticorpi legati alle cellule maligne non sono tossici e non ne impediscono la crescita, a meno che esercitino un effetto citotossico diretto grazie all'intervento del Complemento o di cellule K (ADCC) dell'ospite, oppure

facilitando la rimozione del complesso immune (opsonizzazione) da parte del sistema reticolo-endoteliale. In genere però, questi meccanismi effettori dell'ospite non entrano in funzione, verosimilmente perché inibiti dal tumore stesso e/o dalla chemioterapia eseguita prima dell'intervento immunologico (Ritz e Schlossman, 1982).

Poiché gli anticorpi monoclonali si uniscono facilmente alle cellule-bersaglio (nelle leucemie e linfomi il bersaglio esiste, anche se non è necessariamente un TSTA ma piuttosto un normale marcatore cellulare!), anche senza eliminarle tutte, essi sono i veicoli ideali di agenti citotossici, che possono uccidere direttamente gli elementi maligni, anche se i sistemi effettori dell'ospite sono inibiti. Come è noto, questo è il concetto della «pallottola magica» preconizzato nel 1900 da Paul Ehrlich. Diversi tentativi sono già stati effettuati, utilizzando vari agenti chemioterapici, vescicole lipidiche caricate con farmaci o tossine, isotopi radioattivi e tossine vegetali. Quest'ultimo approccio è assai promettente ed i coniugati formati dall'anticorpo più tossina, ribattezzati «immunotossine» sono già stati usati in campo sperimentale con buon successo.

Nell'esempio più tipico, ad un anticorpo monoclonale o eterologo con specificità per marcatori di superficie di celule linfoidi maligne, viene legata la sola catena A della ricina, che è tossica. Ricordiamo che la ricina nativa ha due catene polipeptidiche, una A che è la tossina ed una B la cui funzione è di aderire alla cellula. Questa catena B è una lectina che si unisce a glicolipidi del plasmalemma o glicoproteine contenenti galattosio e facilita la penetrazione di quella A all'interno del citoplasma per un fenomeno di endocitosi. Una volta penetrata nel citoplasma, la catena A della ricina inibisce la sintesi proteica inattivando enzimaticamente il fattore di allungamento 2 (EF-2) della subunità ribosomica 60 s; si tratta di un meccanismo d'azione assai importante ed utile perché permette di uccidere anche cellule maligne che non si stanno dividendo. Poiché la catena A non è tossica fino a che non penetra nel citoplasma, le immunotossine sono relativamente innocue per le cellule non-fagocitanti prive dei determinanti antigenici verso i quali l'anticorpo è diretto, ed inoltre, la liberazione in circolo della sola catena A da parte delle cellule uccise non dovrebbe creare problemi significativi alle cellule circostanti, in quanto si tratta, lo ripetiamo di una catena A isolata, priva della subunità B che ne condiziona l'endocitosi.

I principali studi su questo argomento sono stati condotti usando la leucemia murina BCL_1, costituita da B-linfociti monoclonali che veicolano immunoglobuline di superficie con lo stesso *idiotipo*, il quale, in questo caso, può essere considerato un vero antigene tumore-specifico ed immunotossine costituite da eteroanticorpi anti-idiotipo coniugati con catena A della ricina. Vari esperimenti hanno confermato che questa immunotossina è capace di eradicare *in vitro* le cellule maligne che infiltrano il midollo osseo emopoietico e di produrre prolungate, ma ancora incomplete, remissioni in topi trattati per via parenterale. Buoni risultati, con altri anticorpi e differenti tossine e bersagli tumorali sono stati ottenuti da svariati ricercatori (Vitetta *et alii*, 1983).

Chiaramente, le difficoltà da superare sono ancora molte, ma questa è una via promettente, soprattutto per il trattamento di linfomi e leucemie monoclonali, dotate di un caratteristico idiotipo. Grazie a questa tecnica si potrà, ad esempio, attuare con più facilità e sicurezza il cosiddetto «autologous bone marrow rescue approach» in certe forme di leucemia e altri tumori del midollo osseo emopoietico. Il midollo prelevato dal paziente in fase di remissione, congelato e, in fase di recidivia, reinoculato previa irradiazione letale dell'accettore, «salva» quest'ultimo dagli effetti nocivi delle radiazioni ionizzanti. Però, può contenere cellule maligne che riproducono il tumore originale, a meno che non le si distrugga con immunotossine. In questi sistemi di «salvataggio» si può usare anche midollo osseo allologo, dal quale sono stati eliminati, sempre con la stessa tecnica, i T-linfociti, in modo da evitare la *Graft-vs-Host reaction*.

In conclusione, la terapia immunologica specifica dei tumori umani è ora più potenziale che attuale anche se sussistono alcuni validi presupposti teorici e qualche positiva applicazione pratica. Non vi è però dubbio che «l'accelerazione della scienza» che si sta verificando sotto i nostri stessi occhi porterà, fra breve, a successi che potrebbero essere clamorosi, come tutti ci auguriamo.

BIBLIOGRAFIA

1) BENJAMINI E., RENNICK D.M., SELLS S.: Tumor Immunology. In: *Basic and Clinical Immunology*, D.P. Stites, J.D.S. Stobo, H.H. Fudenberg and J.V. Wells (Eds.), Lange Medical Publication, Los Altoss California, 4th Edition, 1982, p. 233.
2) BURNET F.M.: *Immunological Surveillance*, Pergamon Press, Oxford, 1970.
3) CLERICI E. (1980): Che cosa sorveglia la sorveglianza immunologica? Argom. Oncol., *1*, 17-25.
4) COOPER E.H., STONE J. (1979): Acute phase reactant proteins in cancer Advances in cancer research, *30*, 1-44.
5) EHRLICH P.: Uber den Jetzigen stand der Karzinomforschung. In: *The collected papers of Paul Ehrlich*, vol. II, Pergamon Press, London, 1957, p. 550.
6) HEWITT H.B. (1982): Animal Tumor Models and their relevance to human tumor immunology Journal of Biological Response Modifiers, *1*, 107-119.
7) KOHLER G., MILSTEIN C. (1975): Continous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. Nature, *256*, 495.
8) LEVY J.A. (1977): Endogenous C-type Viruses in normal and «abnormal» cell development. Cancer Research, *37*, 2957-2968.
9) OLD L.J. (1981): Cancer Immunology: The search of specificity - G.H.A. Clowes Memorial Lecture. Cancer Research, *41*, 361-375.
10) NOSSAL G.J.V. (1980): The case history of Mr T.I. Terminal patient or still curable? Immunology Today, *1*, 5.
11) THOMAS L.: Reactions to homologous tissue antigens in relationship to hypersensitivity. In *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitivity States*, Lawrence H.S. (Ed.), Hoeber-Harper, New York, 1959, p. 529.
12) ZINKERNAGEL R.M., DOHERTY P.C. (1979): M.H.C.-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplanation antigens determing T-cell restriction-specificity, function and responsiveness. Adv. Immunol., *27*, 51.

ALBERTO CLIVIO *

LE BASI GENETICHE E MOLECOLARI DELLA NEOPLASIA

1 - *Introduzione*

Gli oratori che mi hanno preceduto, il professor Poli ed il professor Clerici, hanno presentato un quadro completo di quelli che sono i principali meccanismi cellulari e umorali attraverso i quali un organismo può organizzare la propria strategia difensiva nei confronti dell'«invasore neoplastico». Tali meccanismi sono stati analizzati nei minimi dettagli su animali da esperimento portatori di tumori indotti da virus oncogeni e da agenti chimici. Molto opportunamente, tuttavia, è stato messo in risalto il fatto che la maggior parte dei tumori «spontanei» non sembra essere in grado di evocare una risposta immunitaria nell'ospite portatore, come se l'«invasore» si originasse dall'ospite stesso e la sua struttura o costituzione antigenica fosse del tutto identica a quella dell'ospite. Cercherò in questa relazione di affrontare il problema della neoplasia analizzandolo dal punto di vista della cellula tumorale, valutando quelle che sono le modificazioni, genetiche o meno, che portano una cellula in apparenza normale a diventare neoplastica. Per rendere più facilmente accessibile a tutti la presente trattazione, dovrò necessariamente fare una descrizione dei metodi di colture cellulari che hanno permesso di mettere in evidenza in vitro la trasformazione tumorale, e delle tecniche di manipolazione del DNA che hanno reso possibile una vera e propria «esplorazione» del genoma cellulare.

* Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia.

2 - *Colture cellulari e trasformazione indotta da virus oncogeni*

La possibilità di coltivare in laboratorio cellule di varie specie animali (uomo compreso) e la capacità di alcuni virus di indurre tumori negli animali non sono frutto di lavoro recente: agli inizi di questo secolo, Alexis Carrel manteneva in vita, utilizzando terreni di coltura, cellule provenienti da embrioni di pollo. Inoltre, Peyton Rous descriveva per la prima volta la possibilità di trasmissione orizzontale di un particolare tipo di tumore, un sarcoma del pollo, attraverso la iniezione di estratti ultrafiltrati. In questi ultimi anni si è tuttavia giunti ad un estremo perfezionamento sia delle tecniche per la coltivazione in vitro di cellule che per la manipolazione e per l'analisi quantitativa oltre che qualitativa del potenziale oncogenico dei virus.

Purché si disponga di un terreno nutritivo contenente una miscela isotonica di sali, una adeguata concentrazione di tutti gli aminoacidi, dei nucleotidi e di glucosio, nonché di siero di sangue bovino, è oggi possibile mettere in coltura cellule provenienti dai tessuti più disparati di numerose specie animali. In tali condizioni, le cellule iniziano a proliferare assumendo un aspetto allungato (fig. 1), fusiforme, e vengono comunemente denominate fibroblasti. In tali condizioni, le cellule crescono instaurando uno stretto contatto con il supporto, costituito dalla parete interna di una capsula di Petri e tentando di occupare tutto lo spazio disponibile. Non appena le cellule giungono a stretto contatto tra loro, si osserva invariabilmente un arresto della crescita, detto in gergo «inibizione da contatto». A questo punto, se si vuole mantenere in vita la coltura, occorre staccare le cellule dalla piastra mediante un blando trattamento proteolitico (tripsinizzazione) e distribuirle, aumentando il volume di terreno, in un numero maggiore di piastre. Queste «colture primarie» possono essere sottoposte a diversi cicli successivi di tripsinizzazione, diluizione e ricoltivazione (i «passaggi»): tuttavia, dopo un numero di passaggi che può variare da specie a specie e che dipende anche dall'età dell'animale utilizzato come donatore di cellule, la coltura va incontro a degenerazione ed esaurisce le proprie capacità proliferative. In casi sporadici si può osservare che la coltura presenta, dopo questo «periodo di crisi», dei punti di crescita cellulare, le cui cause sono ancora da definire. Viene comunque ad affermarsi (fig. 2 A) una popolazione di cellule dall'aspetto morfologico estremamente diverso rispetto alle cellule origina-

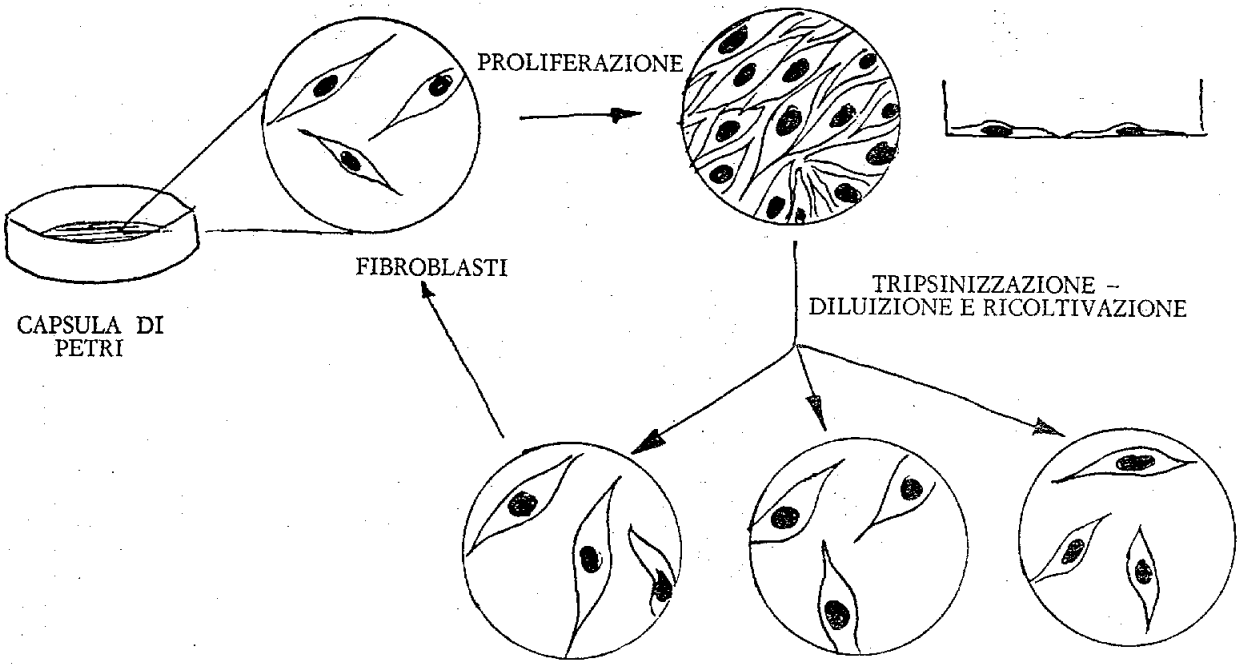

Fig. 1 - Colture di fibroblasti
Le cellule crescono fino a formare un monostrato, un tappeto continuo di spessore unicellulare. A questo punto la crescita si arresterebbe, se non si intervenisse tripsinizzando il monostrato e ricoltivando le cellule in condizioni di maggior diluizione. Dopo un numero variabile di passaggi, però, la coltura entra in «crisi» e si esaurisce.

rie: non più cellule fusiformi, ma dall'aspetto più regolare, che tendono a formare un tappeto continuo con una tipica distribuzione «a piastrella» sul supporto. Queste popolazioni cellulari vengono, per le loro caratteristiche di «immortalità», chiamate «linee cellulari». La differenza sostanziale tra queste cellule e le cellule di una coltura primaria risiede nel fatto che le linee cellulari non vanno più incontro a periodi di crisi ma continuano a proliferare in modo indefinito. Il cariotipo cellulare è nella maggior parte dei casi profondamente alterato rispetto alle cellule originarie. Analogamente alle cellule di una coltura primaria, anche le linee cellulari stabilizzate presentano il fenomeno dell'inibizione da contatto: proliferano infatti fino a formare uno strato continuo di spessore unicellulare sulla superficie interna del supporto, e possono essere mantenute in vita operando continui passaggi in vitro.

Una linea stabilizzata di topo, denominata NIH 313, è stata scelta per tutte le indagini più recenti riguardanti la natura genetica della trasformazione oncogena in virtù di alcune sue caratteristiche salienti: tali cellule presentano infatti una spiccata capacità di accettare la introduzione di DNA estraneo, una tecnica che va sotto il nome di «trasfezione» e che analizzeremo in dettaglio più avanti.

L'utilizzazione delle colture di cellule stabilizzate ha permesso di dimostrare che alcuni virus (del tipo di quello descritto funzionalmente da Rous) hanno la capacità di indurre il fenotipo tumorale anche «in vitro». Trattando infatti una coltura stabilizzata e inibita da contatto con una sospensione di virus oncogeni si osserva una profonda modificazione nelle modalità di accrescimento cellulare: in punti diversi del monostrato (fig. 2 B) alcune cellule perdono l'inibizione da contatto e iniziano a proliferare anche nella terza dimensione, tendendo a formare una «colonia» che dai virologi e dai biologi cellulari viene definita «focus». Nella maggior parte dei casi, il numero di foci che si osservano è direttamente proporzionale alla concentrazione di particelle virali presenti nella sospensione aggiunta alla coltura. È stato quindi possibile mettere a punto un metodo quantitativo che permettesse di «titolare» il potenziale oncogenico di una sospensione virale. I continui progressi nella analisi genetica di questi virus hanno permesso di stabilire che il loro genoma è costituito da due regioni principali: una che contiene l'informazione per la sintesi e l'assemblaggio delle proteine virali, l'altra che contiene i geni responsabili della tra-

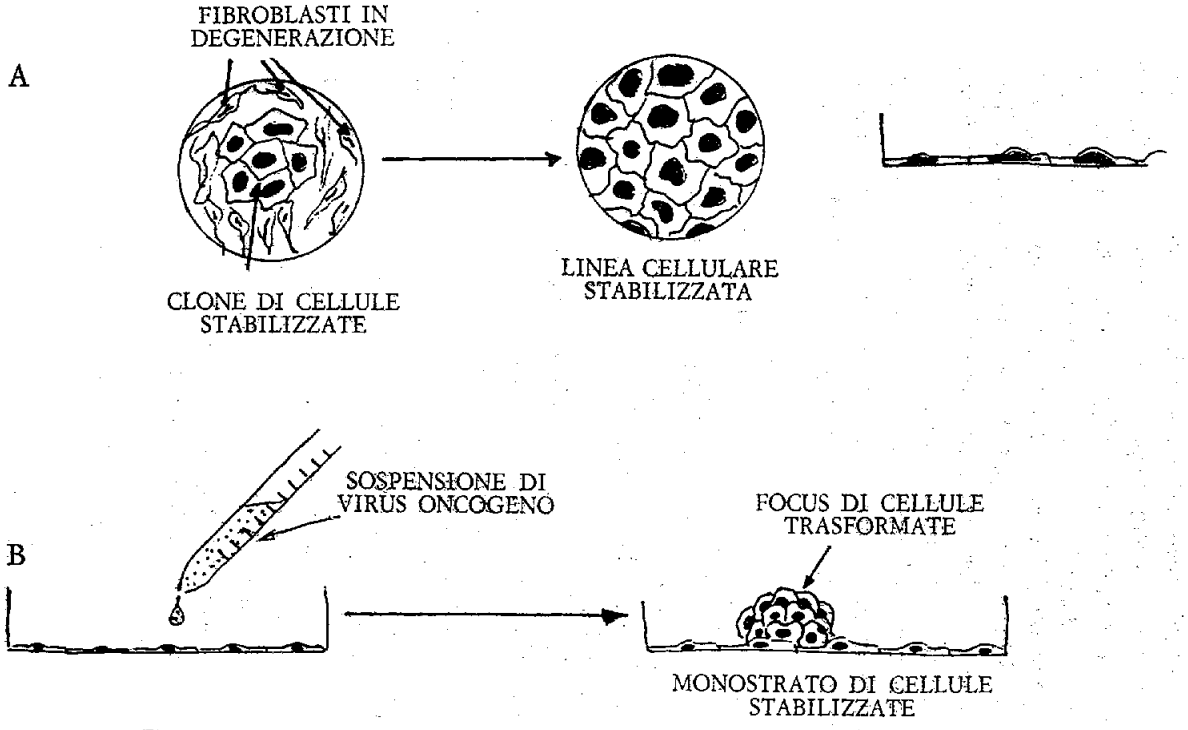

Fig. 2

A: Comparsa di un clone di cellule «immortali» ma non neoplastiche da una coltura di fibroblasti in «crisi». Le cellule presentano una morfologia diversa dai fibroblasti ma sono ancora inibite da contatto.

B: Trasformazione indotta da virus oncogeni. L'infezione di una cellula da parte di una o più particelle virali induce una trasformazione in senso neoplastico: tali cellule formano un «focus» in quanto sono in grado di crescere nella terza dimensione, sovrapponendosi l'una sull'altra. Inoltre, generalmente hanno richieste nutrizionali ridotte e un'alterazione del metabolismo glucidico.

sformazione in senso tumorale delle cellule infettate. Fino a qualche anno fa sembrava quindi ormai indiscutibile il fatto che i virus fossero i principali responsabili dell'insorgenza dei tumori. In molti casi fu possibile stabilire che la struttura antigenica dei tumori indotti dallo stesso virus su cellule diverse fosse del tutto simile e da mettere in relazione con la presenza del virus infettante. Restava da spiegare la natura dei tumori ad insorgenza «spontanea», che soprattutto nell'uomo non sembravano possedere una struttura antigenica diversa rispetto a quella delle cellule normali. Cominciò a questo punto, grazie anche ai progressi compiuti nel campo della Biologia Molecolare, a delinearsi la possibilità di affrontare questo problema seguendo un approccio del tutto diverso.

3 - *L'oncogenicità, un carattere determinato geneticamente?*

Una delle acquisizioni più importanti di questo secolo, per quanto riguarda la biologia, è stata la dimostrazione secondo cui, in tutti gli organismi viventi, l'informazione genetica risiede in una macromolecola dalle caratteristiche peculiari: il DNA. Benché gli acidi nucleici fossero stati studiati in modo approfondito dai chimici tedeschi, non si riusciva a comprendere come una molecola dalle caratteristiche apparentemente così semplici e ripetitive fosse in grado di possedere un potenziale informativo tale da assicurare, da una parte, l'individualità biochimica di tutti gli esseri viventi e, dall'altra, la trasmissione fedele di tali caratteristiche alla progenie. Il DNA era stato scartato quasi «a priori» come candidato in quanto era costituito da una successione in apparenza continua e regolare di sole quattro basi organiche: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) e Citosina (C). Nel 1944 tuttavia, Avery, McLeod e McCarty dimostrarono che il DNA è l'unica, tra le macromolecole intracellulari, a contenere e trasmettere l'informazione genetica per una serie di caratteristiche antigeniche e di virulenza nel batterio Diplococcus pneumoniae. Lo schema dell'esperimento era il seguente: esistono due varianti di D. pneumoniae, una delle quali è altamente virulenta in virtù della presenza di una capsula polisaccaridica esterna che conferisce alle colonie batteriche in vitro un aspetto perfettamente liscio e viene denominata variante S (smooth = liscio). L'altra variante è avirulenta, non contiene la capsula e viene

chiamata R (rough=rugosa). Estratti ottenuti per lisi di batteri S sono stati usati per trattare una popolazione di batteri R. In questa prima prova vennero ottenute diverse colonie di batteri S, cioè provvisti di capsula (e virulenti). La sola spiegazione possibile era che un «principio trasformante» fosse passato dall'estratto ai batteri R, trasformandoli in batteri S. In esperimenti successivi, gli autori dimostrarono che questa attività trasformante era resistente ad enzimi proteolitici, a RNasi, ad agenti che degradano i polisaccaridi ma era totalmente distrutta dall'enzima DNasi. Era quindi necessaria l'integrità del DNA perché il carattere «virulenza» venisse trasferito ai batteri non virulenti. Più tardi si dimostrò in modo inequivocabile che il DNA purificato era in grado di trasferire caratteri come la virulenza o la resistenza ad antibiotici nei batteri. Da allora quindi, per dimostrare che un carattere è determinato geneticamente, occorre portare l'evidenza sperimentale dell'avvenuto passaggio dell'informazione da una cellula ad un'altra attraverso il DNA.

E questo è l'approccio innovativo utilizzato in questi ultimi anni in numerosi laboratori. Se l'oncogenicità è un carattere determinato geneticamente, dovrebbe essere possibile trasferire tale caratteristica ad una cellula normale mediante il trattamento con DNA purificato a partire da una cellula tumorale. Per questi esperimenti è stata sempre utilizzata la linea cellulare NIH 3T3 come «cellula normale ricevente», in virtù delle caratteristiche tecnicamente vantaggiose cui ho accennato in precedenza. Essa rappresenta per il biologo cellulare attuale ciò che l'Escherichia coli è per i genetisti batterici: un sistema-modello ottimale. Prima di tutto fu confermato che il DNA autologo non fosse in grado di trasferire il carattere in questione. In seguito, cellule NIH 3T3 sono state trattate con DNA purificato a partire da cellule tumorali. In queste condizioni (vedi figura 3) si osserva la formazione di foci di trasformazione con una frequenza pari all'incirca ad un focus per ogni 2 microgrammi di DNA. Fu dimostrato anche che questa attività era effettivamente associata al DNA cellulare. Ciò diede il segnale d'inizio per una serie di studi su tumori di diversa origine, e di diverse specie animali uomo compreso, per una valutazione qualitativa dell'attività trasformante. Si dimostrò inoltre che il DNA estratto dalle cellule dei singoli foci era ancora in grado di generare altri foci: l'informazione è dunque stabile di generazione in generazione.

È necessario a questo punto fare un inciso per rendere più com-

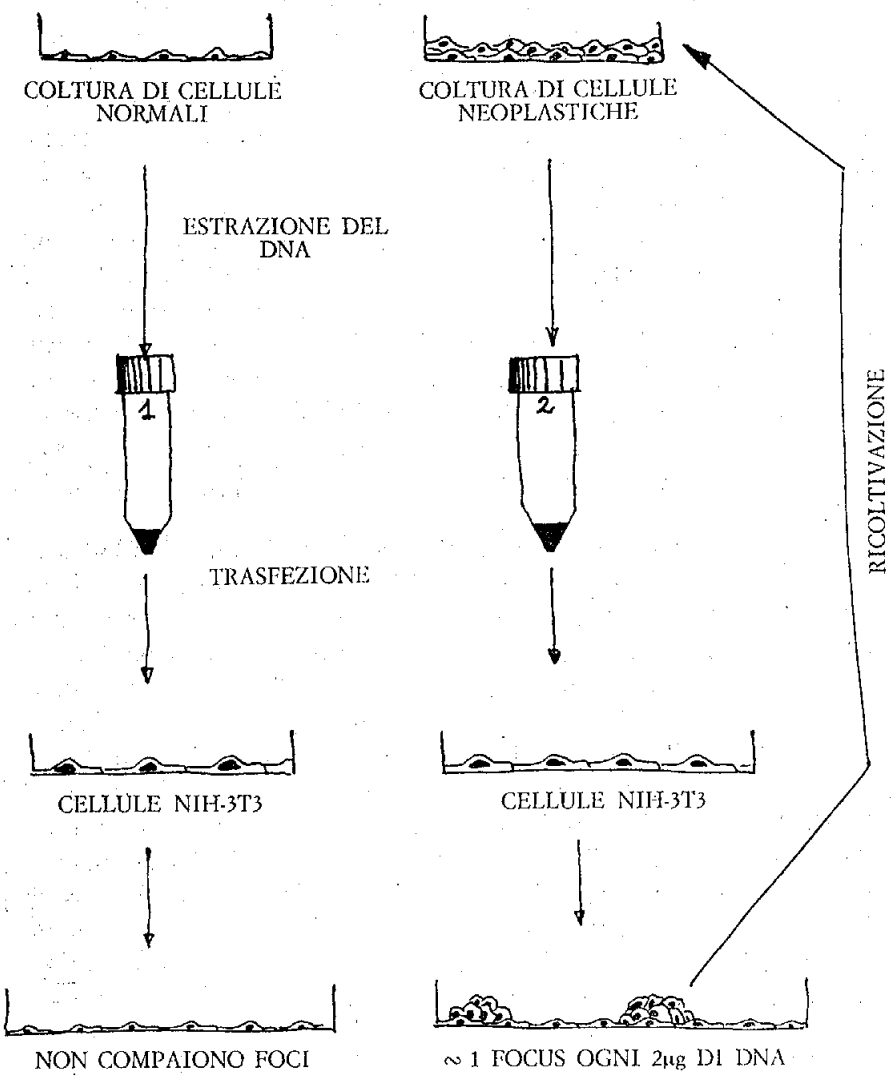

Fig. 3 - Esperimento di trasfezione con DNA. Le caratteristiche di accrescimento neoplastico possono essere trasmesse a cellule inibite da contatto attraverso il DNA (2). Il DNA proveniente da cellule inibite da contatto non dà trasformazione (1). Il DNA proveniente da cellule dei foci contiene ancora l'informazione «neoplastica».

prensibile la procedura sperimentale utilizzata per l'analisi di questi geni oncògeni. Come ho detto in precedenza, nonostante che il DNA fosse effettivamente la macromolecola depositaria dell'informazione genetica, non si comprendeva come tale informazione potesse essere contenuta in una struttura macromolecolare apparentemente semplice e ripetitiva. La spiegazione venne quando fu possibile dimostrare che il DNA era sì costituito da una successione di 4 basi, ma che tale successione non era affatto monotona. L'informazione non risiede quindi nella complessità chimica della molecola ma nella sequenza secondo cui le 4 basi sono disposte lungo il DNA. Più tardi si dimostrò che una sequenza di tre basi (la tripletta) rappresentava l'unità informazionale del codice genetico e che ciascuna tripletta «significava», a livello della proteina, un particolare aminoacido. Furono chiariti, successivamente, i passaggi biochimici attraverso i quali l'informazione genetica contenuta nel DNA viene decifrata in modo da esprimersi nella sintesi delle proteine cellulari. Questo processo presenta alcune

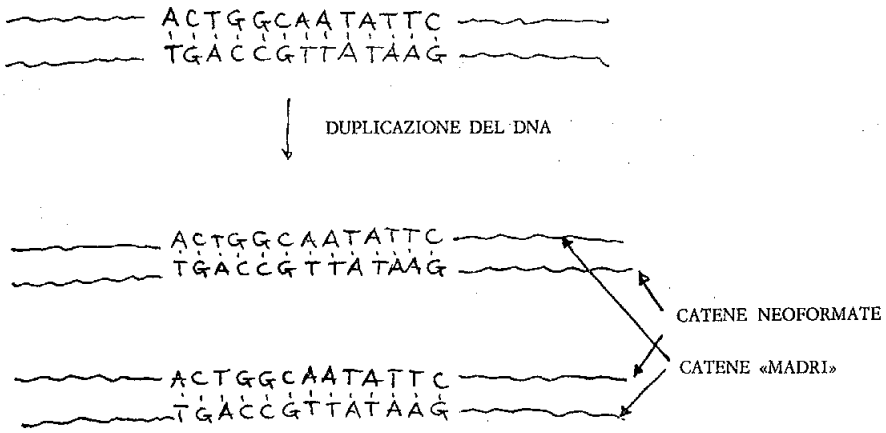

Fig. 4 - Duplicazione del DNA. Le due catene «madri» vengono utilizzate come «stampo» per la sintesi di due nuove catene, nel pieno rispetto delle regole della complementarietà fra le basi. L'intero cromosoma viene duplicato in questo modo: ne risultano due cromosomi identici all'originale che vengono distribuiti alle due cellule figlie, e il ciclo ricomincia. La sintesi viene effettuata con l'intervento di una serie di enzimi cellulari diversi, tra i quali la DNA polimerasi.

differenze significative a seconda che si tratti di organismi procarioti o eucarioti. In sostanza, comunque, la sequenza di basi del DNA che corrisponde ad una particolare regione cromosomica viene «ricopiata» in modo da sintetizzare una molecola di RNA, di dimensioni limitate alla regione che interessa, rispettando regole precise di complementarietà: infatti la struttura del DNA è organizzata in modo da costituire due catene parallele, leggermente attorcigliate tra loro, nelle quali di fronte alla base Adenina ci può essere solo una Timina (A-T) e di fronte a una Guanina solo una Citosina (G-C). In questo modo (fig. 4) si spiegano diversi fenomeni biologici quali la perpetuazione del messaggio genetico nella discendenza e le stesse capacità informative del DNA. Le stesse regole di complementarietà valgono anche per la sintesi dell'RNA, con la differenza che in quest'ultimo è l'Uracile che viene utilizzato in sostituzione della Timina (vedi figura 5).

Dunque la struttura primaria di una proteina è determinata dalla sequenza di basi sul DNA. È quindi ovvio che qualsiasi modificazione

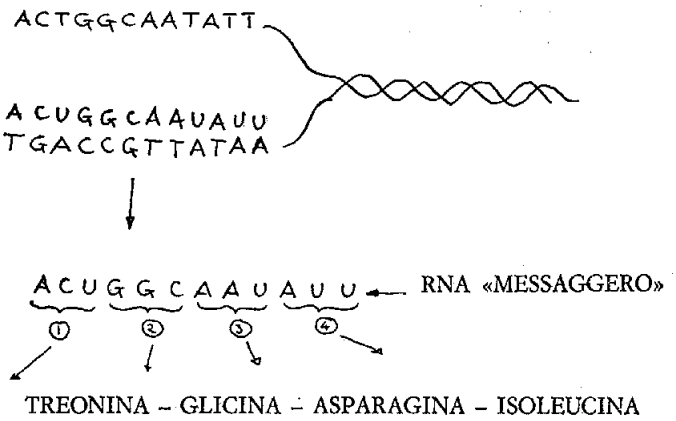

Fig. 5 - Trascrizione e traduzione. Una sola catena madre viene utilizzata, e per di più solo in una regione limitata, come stampo per la «ricopiatura» del DNA in una molecola di RNA messaggero. L'RNA contiene la base Uracile (U) invece della Timina e lo zucchero ribosio invece del desossiribosio. È a livello dei *ribosomi* che ha luogo la «traduzione» del codice a basi in sequenza aminoacidica, con sintesi di una catena polipeptidica in cui viene rispettata la regola: una tripletta = un aminoacido.

a carico della sequenza con la quale le basi sono disposte lungo il DNA può portare ad una alterazione nella proteina codificata da quella particolare regione genetica. L'attività trascrizionale della cellula (vale a dire la sintesi di RNA) è regolata in modo tale che la sintesi di proteine specifiche abbia luogo soltanto in quelle fasi della vita cellulare durante le quali tali proteine sono effettivamente necessarie. Semplificando molto il discorso, possiamo dire che esistono «geni strutturali», i quali determinano la struttura primaria delle catene polipeptidiche, e «geni regolatori» dai quali dipende la possibilità di trascrivere particolari geni strutturali.

Mutazioni all'interno di geni strutturali possono determinare modificazioni a carico della sequenza aminoacidica della proteina in questione. Mutazioni in corrispondenza di un gene regolatore possono invece modificare il tasso di espressione di un gene strutturale, il che può dare come risultato o una mancata espressione oppure un'espressione incontrollata e incontrollabile, definita anche «costitutiva». Ritorneremo su questo argomento tra breve, quando ci occuperemo della regolazione dell'attività degli oncogeni.

Occorre tuttavia, prima di passare a questo argomento, introdurre una nuova parentesi metodologica riguardante l'utilizzazione di una particolare famiglia di enzimi in grado di interagire con il DNA in modo estremamente interessante, e che si è rivelata utilissima dal punto di vista applicativo: gli «enzimi di restrizione». Si tratta di nucleasi (cioè di enzimi in grado di incidere la molecola del DNA) dotate di «specificità di sequenza». Essi riconoscono, lungo la catena del DNA, specifiche sequenze brevi (da 4 a 6 basi), vi si legano e introducono un taglio per rottura del legame fosfodiesterico (vedi figura 6).

Utilizzando questo tipo di enzimi è stato possibile condurre un'analisi comparata dei diversi tipi di DNA contenenti sequenze oncògene e di classificarli sulla base della loro sensibilità alle diverse nucleasi di restrizione. Se, ad esempio, la capacità di indurre la formazione di foci di trasformazione da parte del DNA di una linea tumorale è distrutta dal pretrattamento con l'enzima Eco RI, ciò significa che all'interno dell'oncogene in questione è contenuta la sequenza GAATTC (fig. 7 B e A). Il taglio introdotto dall'enzima di restrizione porta alla distruzione dell'oncogene e alla perdita del potere trasformante. Un diverso oncogene può non venire inattivato dallo stesso enzima ma essere sensibile al taglio da parte di Hpa II; ciò indicherebbe la pre-

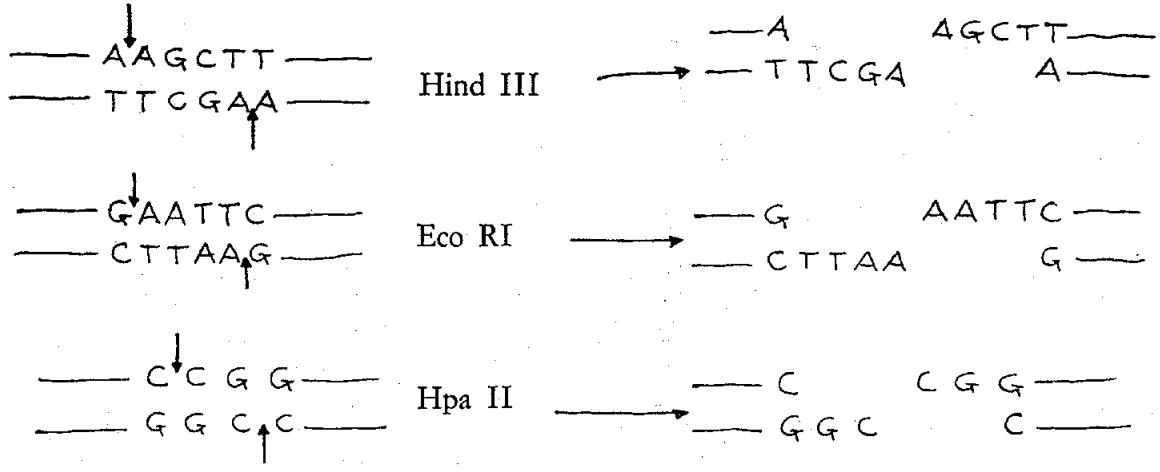

Fig. 6 - Enzimi di restrizione. Sono endonucleasi sito-specifiche, nel senso che «incidono» il DNA solo in corrispondenza di sequenze di basi caratteristiche. Generalmente, il taglio introdotto risulta sfasato su una catena rispetto all'altra in quanto le sequenze riconosciute sono generalmente simmetriche. Le estremità dei frammenti generati dal taglio con questi enzimi di restrizione sono complementari e possono essere fatte riassociare in condizioni di rinaturazione controllata. Tagliando con lo stesso enzima due DNA di diversa origine, è possibile costruire molecole «ricombinanti», nelle quali i frammenti dei due tipi di DNA possono venire riuniti a formare un'unica catena continua.

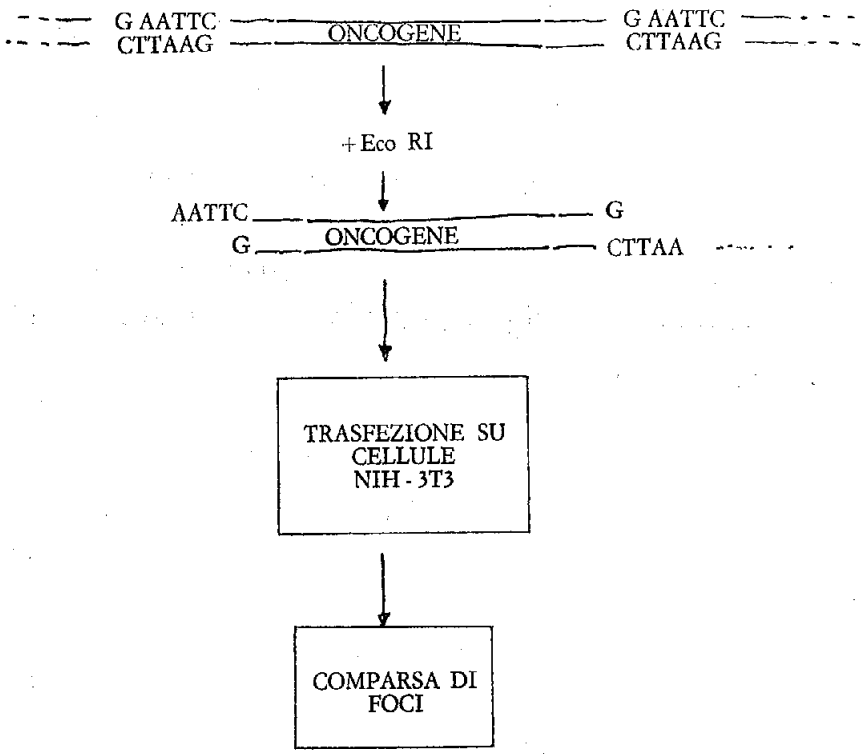

Fig. 7 - A. Effetto del trattamento con Eco RI del DNA da una linea di cellule tumorali contenente un oncogene fiancheggiato da due sequenze specifiche per Eco RI. L'attività biologica dell'oncogene non viene influenzata dal trattamento endonucleolitico.

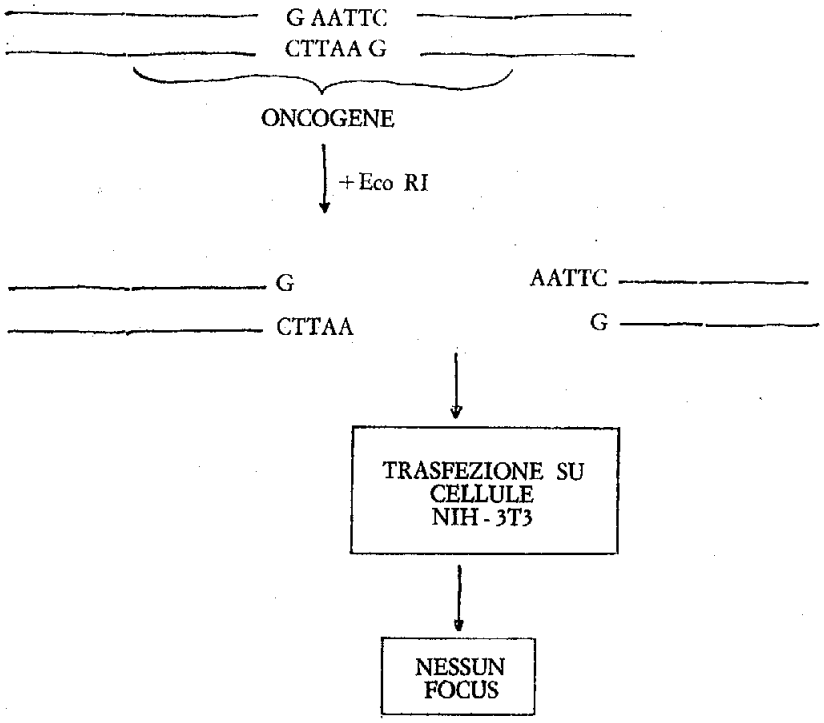

Fig. 7 - B. Effetto del trattamento con Eco RI del DNA di una linea tumorale contenente un oncogene all'interno del quale vi è una sequenza specifica per Eco RI. Il taglio endonucleolitico «spezza» il gene in due frammenti, inattivandolo. E infatti l'esperimento di trasfezione dà esito negativo.

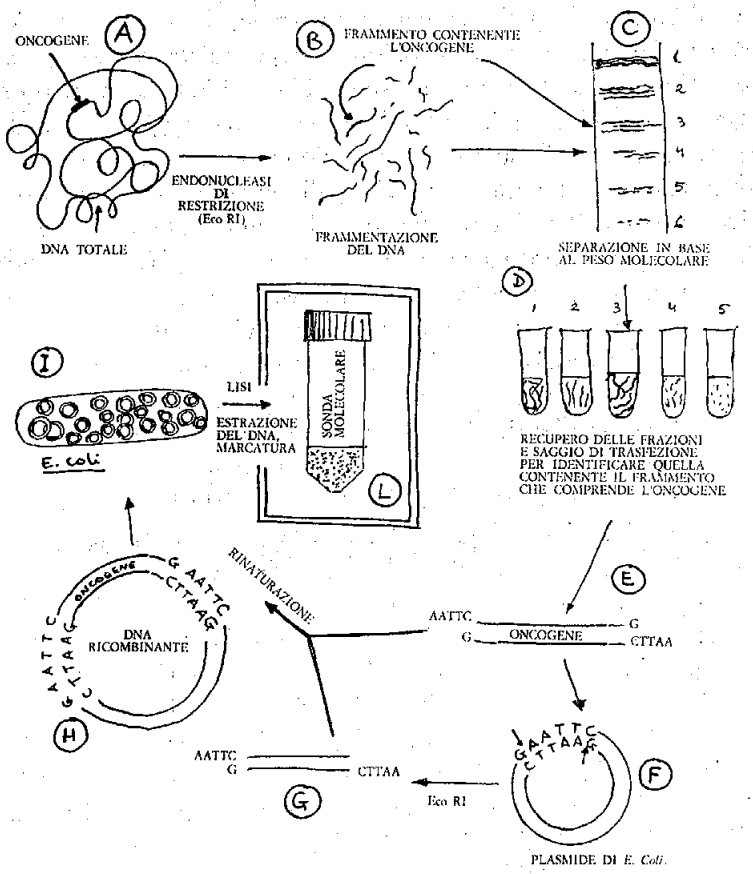

Fig. 8 - *Procedimento per la clonazione di un oncogene.* (A) Nel DNA cellulare totale, la sequenza contenente l'oncogene rappresenta una regione molto limitata del genoma; per questo motivo, gli esperimenti di trasfezione richiedono quantità relativamente elevate di DNA cellulare. (B) Il primo passaggio è una frammentazione del DNA cellulare con un enzima di restrizione che non inattivi l'oncogene in questione. In questo caso ipotetico, utilizziamo Eco RI. (C) Occorre ora separare tra loro i vari frammenti originati dalla endonucleasi, che hanno pesi molecolari differenti perché la loro lunghezza è variabile. (D) Dopo aver recuperato le diverse frazioni dal gel (nel caso che la separazione sia avvenuta per elettroforesi) occorre identificare la frazione contenente l'attività trasformante, vale a dire l'oncogene. (E) Poiché abbiamo tagliato con Eco RI, l'oncogene è compreso tra due siti di riconoscimento per tale endonucleasi. (F) Trattiamo con Eco RI il plasmide di E. coli che reca la sequenza GAATTC. Si genera così una molecola lineare le cui estremità sono complementari a quelle del frammento contenente l'oncogene. In opportune condizioni (G) si induce la formazione della molecola ricombinante costituita dal plasmide batterico e dal frammento che porta l'oncogene, che risultano legati in modo continuo (H). Questa molecola viene quindi introdotta per trasfezione nel batterio *E. coli*. All'interno della cellula batterica, il plasmide contenente l'inserto è in grado di replicarsi autonomamente (I) fornendo una notevole amplificazione. In questo modo, si ottengono numerosissime copie del plasmide ricombinante. Il DNA con potenziale oncogenico è, stavolta, arricchito notevolmente (in media, circa 2.000 - 3.000 volte) rispetto al punto (A). È possibile estrarlo dal batterio, purificarlo e marcarlo con isotopi radioattivi. A questo punto, disponiamo di una *sonda molecolare* per l'oncogene in questione (L).

senza, all'interno di quel particolare oncogene, della sequenza CCGG, e così via. Oltre a questa utilizzazione di tipo «distruttivo», gli enzimi di restrizione sono reagenti indispensabili nell'analisi elettroforetica del genoma cellulare e in tutta la serie di passaggi chimici che va comunemente sotto il nome di «clonazione» di geni. In pratica, enzimi di restrizione che non inattivino gli oncogeni vengono utilizzati per frammentare il DNA purificato dalla cellula tumorale. In questo modo, la sequenza oncògena viene ad essere compresa all'interno di un frammento di peso molecolare più basso rispetto al DNA non frazionato. Con lo stesso enzima di restrizione viene effettuato un taglio in «plasmidi batterici» da utilizzare come «vettori». Disponendo di un sistema per separare fra loro molecole di DNA aventi diverso peso molecolare (gradienti, metodi elettroforetici) è possibile identificare, attraverso il saggio di trasfezione, quali sono i frammenti contenenti le sequenze oncogeniche. Tali frammenti vengono quindi separati dagli altri e riallacciati al DNA plasmidico preparato come descritto precedentemente. La molecola ibrida così ottenuta (fig. 8) (DNA ricombinante) viene quindi usata come un plasmide del tutto normale: introdotta nei batteri, questa molecola si replica velocemente producendo un gran numero di copie. I batteri vengono quindi utilizzati come strumento per l'amplificazione di tali sequenze. Le molecole ricombinanti possono essere facilmente separate dal DNA batterico in virtù del loro piccolo peso molecolare. A questo punto il DNA ricombinante può essere reso radioattivo con metodi particolari e utilizzato in modi diversi, grazie al fenomeno della complementarietà delle basi del DNA:

1. È possibile identificare, nel DNA di qualsiasi cellula, la presenza di una sequenza complementare all'oncogene così clonato.
2. L'RNA messaggero di una cellula può essere esplorato con lo stesso metodo: ciò permette di stabilire, in ogni momento della vita della cellula, se gli oncogeni in essa presenti sono espressi o meno. Analizzeremo in dettaglio l'applicazione di questi metodi nel capitolo successivo.

4 - *Oncogeni cellulari: il fenomeno dell'attivazione*

La disponibilità di sonde molecolari specifiche per gli oncogeni permette quindi, in un certo senso, di «scavalcare» il saggio di trasfezione e di sostituirlo con un metodo molto più rapido e sensibile. Supponiamo dunque di disporre di una sonda specifica per un particolare oncogene e di allestire un esperimento di ibridazione per determinare la presenza o meno di sequenze ad essa complementari nel DNA di cellule tumorali di varia origine e in cellule normali, che servono da controllo negativo. Frammentiamo quindi il DNA cellulare con un enzima di restrizione e sottoponiamo il materiale così digerito ad elettroforesi su gel di agarosio. I frammenti si dispongono lungo il gel a distanze dall'origine della migrazione che sono inversamente proporzionali al loro peso molecolare (fig. 9). Trasferiamo ora tutto il DNA, per elettroforesi nel senso della profondità del gel, su un foglio di nitrocellulosa. Le posizioni relative dei singoli frammenti vengono rispettate durante questa procedura: i frammenti escono dal gel e si legano al foglio di nitrocellulosa. Si opera una denaturazione «in situ» del DNA mediante trattamento al calore e il foglio viene quindi immerso in una soluzione contenente la sonda radioattiva, in condizioni tali da favorire la rinaturazione della sonda stessa con le sequenze omologhe contenute nel DNA cellulare digerito. La sonda radioattiva va a riassociarsi esclusivamente con il frammento immobilizzato che contiene una sequenza ad essa complementare. Nel caso che l'enzima di restrizione non abbia tagliato il DNA all'interno dell'oncogene, ci si aspetta di trovare un'unica «banda di riassociazione». Nel caso che il sito di restrizione per l'endonucleasi si trovi invece all'interno dell'oncogene in questione, le sequenze riconoscibili dalla sonda risulteranno associate a due frammenti differenti e, nelle condizioni dell'esperimento descritto, ci si aspetta di trovare due bande di riassociazione. Dal momento che la sonda è radioattiva, l'avvenuta riassociazione con il DNA sul foglio di nitrocellulosa può essere messa in evidenza con metodi autoradiografici. Se l'oncogene in questione non è presente nel DNA cellulare, non vi sarà alcuna associazione con la sonda. Un'indagine di questo tipo ha portato ad un primo risultato sorprendente: anche le cellule normali utilizzate come controllo negativo danno riassociazione con la sonda radioattiva. Ciò significa che sequenze di DNA con potenziale oncogeno sono presenti anche sulle

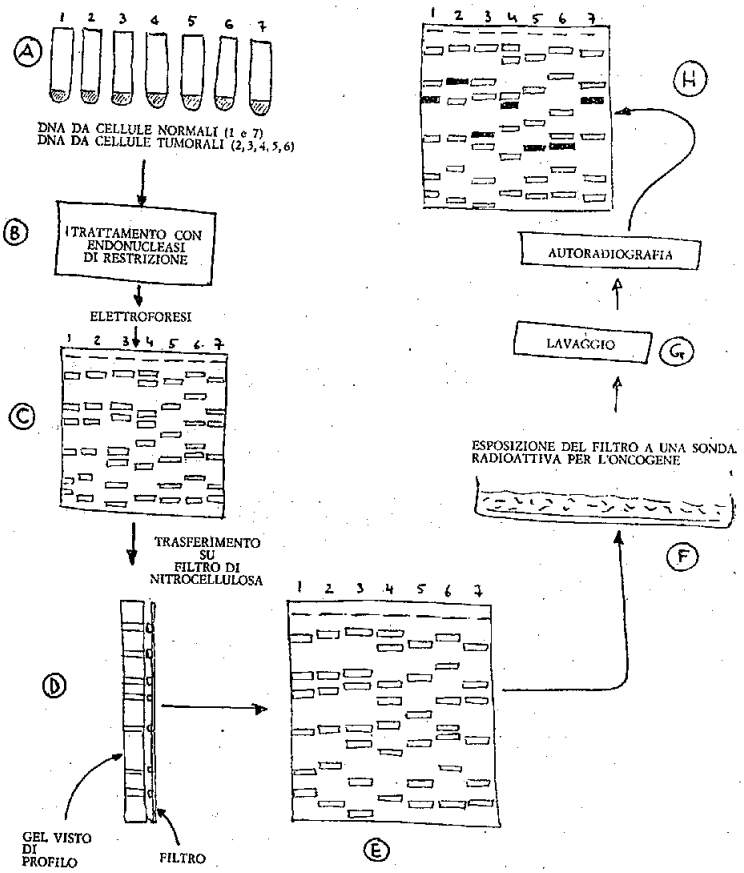

Fig. 9 - *Identificazione di sequenze oncogeniche nel DNA cellulare mediante l'uso di sonde molecolari.* Ⓐ Viene estratto il DNA da cellule normali e da cellule tumorali di varia origine. Ⓑ Tutti i DNA vengono trattati con uno stesso enzima di restrizione. Ⓒ I diversi DNA frammentati vengono sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio, dove migrano a seconda del peso molecolare. Ⓓ Tutto il DNA viene trasferito per elettroforesi dal gel su un foglio di nitrocellulosa e successivamente denaturato *in situ*. Ⓔ e Ⓕ Il foglio viene esposto ad una soluzione contenente la sonda molecolare per l'oncogene in questione in condizioni favorenti la rinaturazione. Ⓖ Si effettua un lavaggio onde eliminare eventuali adesioni aspecifiche al filtro. Ⓗ Il foglio viene esposto ad una lastra sensibile, che viene impressionata dalle radiazioni emesse dalla sonda radioattiva in corrispondenza delle bande alle quali essa si è riassociata. È evidente che la sonda va a localizzarsi sui frammenti che contengono sequenze ad essa complementari. Come si può notare, si osserva radioattività anche in corrispondenza delle corsie elettroforetiche nelle quali è stato messo DNA proveniente da cellule normali. Il fatto che, per quanto riguarda gli altri DNA, la sonda vada a riassociarsi a frammenti diversi per ogni DNA, indica che la distribuzione dei siti di restrizione è differente per ognuno dei tumori analizzati.

cellule normali. Uno «screening» molto esteso, condotto con sonde molecolari specifiche per numerosi oncogeni ha permesso di stabilire che gli oncogeni sono ubiquitari. Per quale motivo dunque le cellule normali non presentano caratteristiche neoplastiche ed il loro DNA non dà luogo alla formazione di foci di trasformazione? Vi sono almeno due spiegazioni possibili: la prima è che questi geni siano silenti nelle cellule normali e vengano espressi ad un tasso elevato nelle cellule neoplastiche. La seconda ipotesi possibile è che vi siano piccole differenze nella sequenza nucleotidica degli oncogeni delle cellule normali rispetto agli oncogeni delle cellule neoplastiche. Tali differenze, che sarebbero sufficienti ad alterare la proteina codificata dal gene in questione, non sono però tali da interferire con il saggio di riassociazione appena descritto.

Per valutare il grado di espressione di un gene cellulare, occorre mettere in evidenza la presenza di un RNA messaggero specifico. Le sonde molecolari radioattive possono essere utilizzate anche a questo scopo: è infatti possibile estrarre e purificare l'RNA messaggero cellulare, sottoporlo ad elettroforesi e a tutti i passaggi già descritti per l'esperimento precedente. Nel caso che il gene in questione sia effettivamente espresso dalla cellula, l'RNA corrispondente entrerà a far parte della popolazione di RNA messaggeri presenti nella preparazione e potrà essere messo in evidenza con i metodi suaccennati. Se viceversa la cellula, pur contenendo il gene, non è in grado di esprimerlo, non si osserverà nessuna associazione con la sonda (fig. 10). A questo proposito vi sono risultati diversi a seconda degli oncogeni sottoposti a tale tipo di indagine. In alcuni casi vi sono notevoli differenze nel livello di espressione tra cellule normali e neoplastiche: si tratta quindi di un fenomeno legato alla regolazione genica. In altri casi non è stato possibile rilevare differenze nei livelli di espressione: con il metodo dell'ibridizzazione, questi geni sono espressi sia dalle cellule normali che da quelle tumorali. A questo proposito, occorre dire tuttavia che il metodo della riassociazione tra acidi nucleici, pur essendo molto sensibile, non è sufficientemente selettivo: piccole variazioni a carico della sequenza polinucleotidica non comportano differenze significative nel grado di riassociazione, con la sonda. Pertanto, questo tipo di analisi non permette di escludere che siano avvenute mutazioni all'interno del gene strutturale, con l'ovvia conseguenza che la proteina finale avrà caratteristiche biochimiche o addirittura funzioni comple-

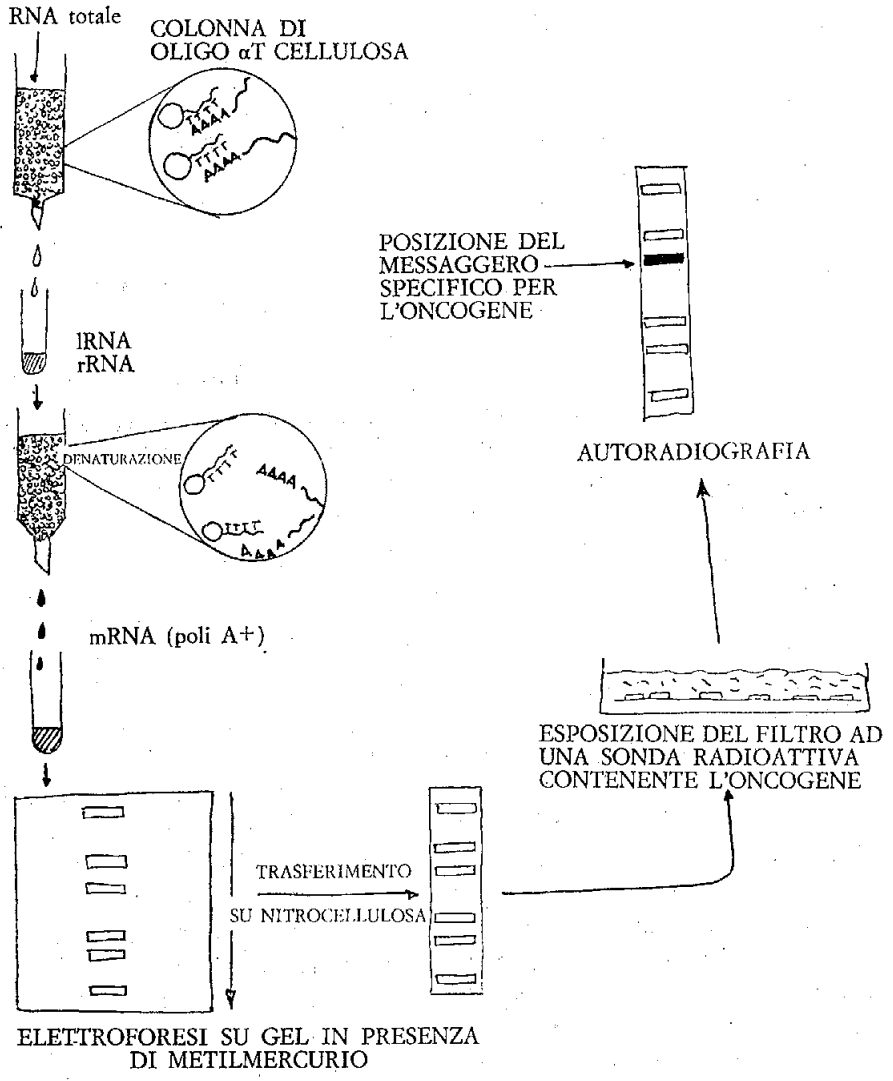

Fig. 10 - Espressione di un oncogene.

tamente differenti rispetto alla proteina prodotta dalle cellule normali. Una elegante dimostrazione di un fenomeno di questo tipo è stata fatta nel caso dell'oncogene Ha-ras espresso da un carcinoma della vescica urinaria dell'uomo. L'oncogene attivo presenta, rispetto a quello normale, una singola mutazione che è sufficiente a creare un nuovo sito di restrizione non presente nel protooncogene normale. Si generano quindi due bande distinte di riassociazione DNA-DNA invece dell'unica banda osservata nelle cellule normali. Questa mutazione comporta, a livello della proteina finale, la sostituzione di una glicina con una valina; tale differenza sembra render conto dell'intero potenziale oncogenico della proteina.

Abbiamo quindi, almeno in parte, ricostruito le tappe principali che hanno portato, in un primo momento alla dimostrazione secondo cui l'oncogenicità può essere considerata un carattere genetico, e successivamente alla delucidazione, seppure parziale, delle modificazioni responsabili del fenotipo neoplastico. Resta ancora da chiarire quale sia il significato dell'esistenza stessa di tali sequenze potenzialmente oncogene, la relazione che le lega alle sequenze oncogeniche dei virus a RNA e il meccanismo d'azione delle proteine codificate dagli oncogeni.

5 - *Proteine codificate dagli oncogeni*

Quale che sia il meccanismo attraverso il quale un proto-oncogene viene convertito in oncogene, l'effetto di tale attivazione deve necessariamente venire esercitato attraverso l'attività biologica di una proteina. Quando fu purificata la proteina p60 src, a partire da cellule infettate dal virus del sarcoma di Rous, si dimostrò che essa era dotata di una attività enzimatica caratteristica, consistente nella capacità di catalizzare l'aggiunta di molecole di fosfato ad altre proteine. Tutti gli enzimi che fosforilano le proteine vengono denominati protein-chinasi. Generalmente, le protein-chinasi fosforilano le proteine in corrispondenza dei residui aminoacidici che presentano gruppi ossidrilici disponibili per il legame con il gruppo fosforico, vale a dire la serina, la treonina e la tirosina. Ciò che caratterizza le proteine codificate da una serie di oncogeni è la capacità specifica di fosforilare la tirosina. La scoperta secondo cui sia la p60src che la corrispondente

proteina presente nelle cellule normali hanno lo stesso tipo di attività enzimatica indica che nella quasi totalità dei casi, la proteina codificata da un oncogene virale è dotata di una attività biologica simile a quella della proteina normale. La «fedeltà» con la quale la proteina virale è in grado di imitare la proteina cellulare può spiegare entrambe le ipotesi avanzate in precedenza per il meccanismo di attivazione degli oncogeni: nel caso in cui le proteine codificate dall'oncogene attivo e da quello inattivo siano del tutto identiche, la loro oncogenicità è legata semplicemente ai livelli di concentrazione intracellulare della proteina stessa. Nel caso in cui l'attivazione sia conseguente ad una alterazione di sequenza, l'attività «tumorale» potrebbe essere dovuta all'assunzione, da parte della proteina risultante, di una nuova capacità catalitica che ha come risultato la trasformazione cellulare.

Nella maggior parte dei casi, l'attivazione degli oncogeni ha come conseguenza un'aumentata attività di fosforilazione dei residui di tirosina delle proteine. È noto, d'altra parte, che la fosforilazione è in grado di regolare l'attività di molte proteine intracellulari. Ciò che risulta evidente quando si mettono a confronto cellule normali con cellule neoplastiche è una profonda modificazione della morfologia a carico del citoscheletro. Quando furono isolate le proteine del citoscheletro sia da cellule normali che da cellule trasformate risultò chiaro che solo una delle proteine, la vinculina, presentava fosforilazione in corrispondenza dei residui di tirosina e che il grado di fosforilazione era di circa 20 volte superiore, nelle cellule trasformate, rispetto alle cellule normali. La vinculina è interposta tra la membrana cellulare e le estremità dei filamenti di actina, e sembra essere in grado di fissare i filamenti di actina ad una ipotetica proteina di ancoraggio situata nella membrana. Ciò permette alla cellula di restare tenacemente adesa al substrato mantenendo «in tensione» i filamenti di actina (fig. 11). La fosforilazione della vinculina da parte della p60 src può modificarne radicalmente l'affinità nei confronti dei filamenti di actina che perdono così il loro grado di organizzazione. Possono così essere spiegate le profonde modificazioni a carico del citoscheletro e della capacità di ancoraggio rilevabili nelle cellule trasformate rispetto alle cellule normali.

Le cellule tumorali sono caratterizzate dalla capacità di proliferare in modo indefinito, sfuggendo ai meccanismi di regolazione dell'attività proliferativa. In alcuni casi, tale controllo è esercitato da fattori

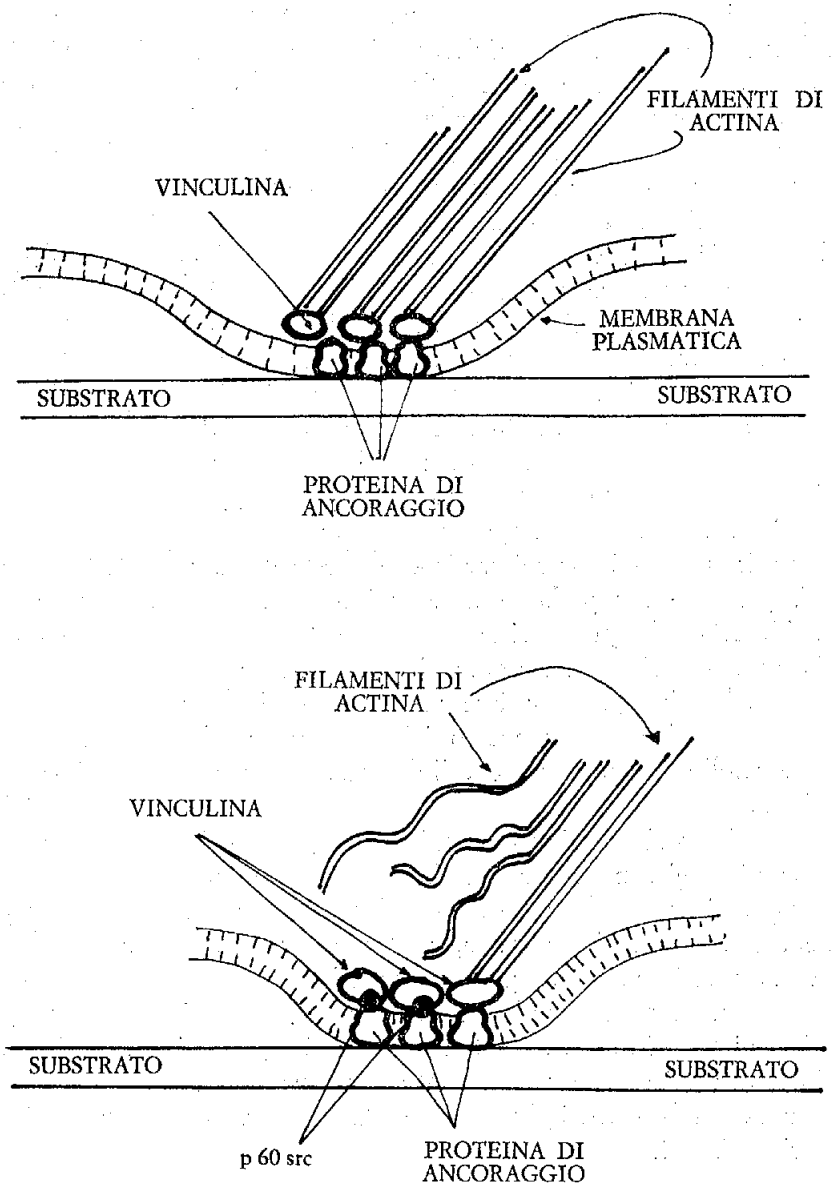

Fig. 11 - Ultrastruttura della placca di adesione. Effetto della p 60 src.

favorenti o inibenti la proliferazione che sono presenti nei liquidi circolanti. Due di questi fattori favorenti la proliferazione, EGF (Epidermal Growth Factor) e PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) esercitano la loro attività biologica legandosi ai recettori di membrana. È stato dimostrato che questi recettori presentano un'attività proteinachinasi specifica per la tirosina quando sono legati all'EGF. Il recettore è una proteina transmembranaria: la porzione che sporge dalla superficie cellulare riconosce l'EGF, la parte intracellulare è rappresentata da un sito catalitico in grado di fosforilare le proteine in corrispondenza dei residui di tirosina (fig. 12). C'è una somiglianza metabolica tra cellule tumorali e cellule normali esposte a fattori di crescita: in entrambi i casi si osserva un aumento nel grado di fosforilazione della tirosina. Recentemente è stato osservato che il prodotto dell'oncogene erb-B altro non è se non una specie di recettore per l'EGF che funziona però in modo incontrollato.

Altro caso interessante è quello dell'oncogene sis del virus del sarcoma della scimmia, la cui corrispondente proteina presenta una identità quasi assoluta, nella sequenza aminoacidica, con il PDGF. Le cellule infettate da questo virus proliferano in quanto sono in grado di sintetizzare e di secernere notevoli quantità di questo fattore. Mentre il PDGF «fisiologico» fornisce un segnale proliferativo soltanto in circostanze particolari, il prodotto dell'oncogene sis sfugge a questo tipo di controllo e induce, nelle cellule infettate, una proliferazione illimitata.

Abbiamo sinora citato esempi di oncogeni i cui prodotti sono localizzati o agiscono a livello della membrana cellulare; vi sono anche oncogeni i cui prodotti possono essere messi in evidenza nel nucleo delle cellule dove influenzano, con meccanismi ancora in gran parte da chiarire, l'espressione genica (oncogeni myc, myb, fos). Molto recentemente è stato dimostrato che il prodotto dell'oncogene Ha-ras microiniettato in cellule NIH, è di per sé in grado di indurre il fenotipo neoplastico. Si tratta in realtà della prima dimostrazione sperimentale del fatto che il fenotipo neoplastico possa essere direttamente attribuibile alla presenza di una proteina particolare.

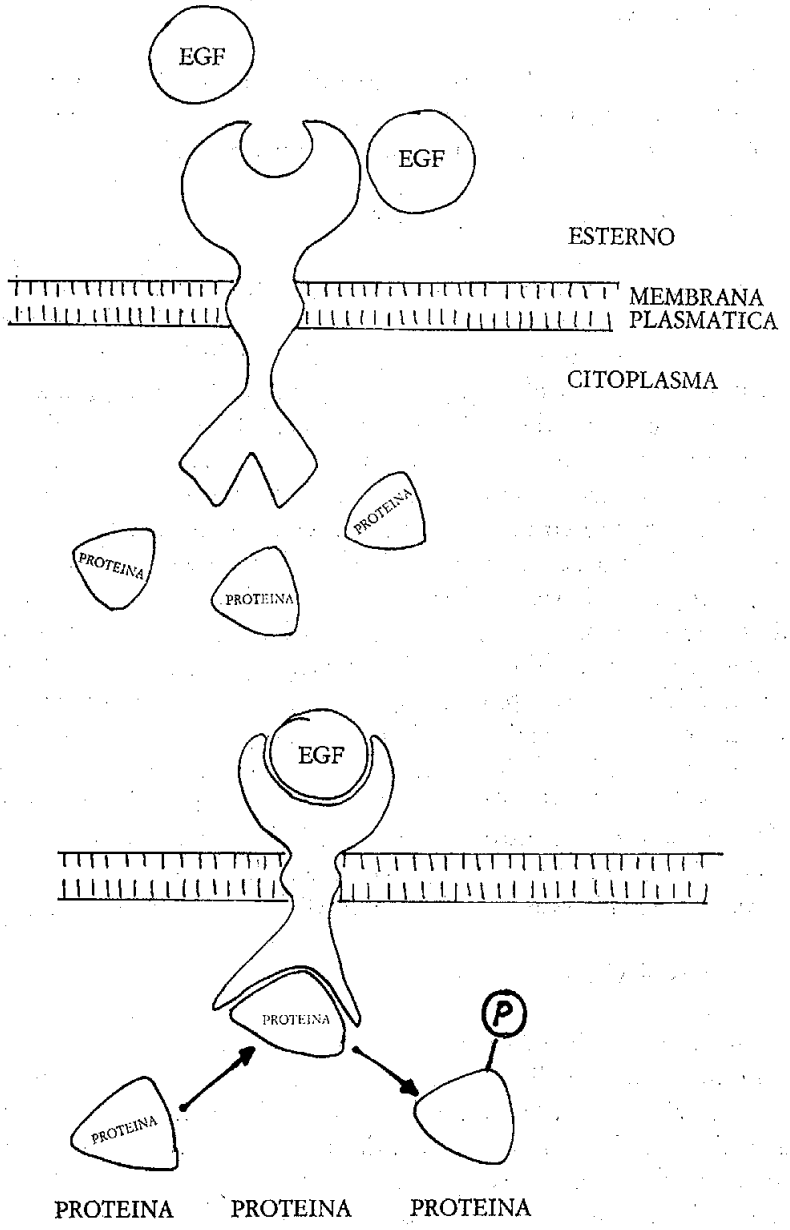

Fig. 12 - Fosforilazione delle proteine indotta da fattori di crescita.

6 - *Conclusioni*

Sulla base delle informazioni sin qui riportate, è possibile trarre alcune conclusioni riguardanti il ruolo biologico degli oncogeni cellulari e avanzare ipotesi sulla natura degli oncogeni virali.

a. Oncogeni e differenziazione cellulare

La presenza in tutte le cellule di sequenze di DNA potenzialmente in grado di trasformarsi in «geni tumorali» sta ad indicare che, se sono state mantenute dai meccanismi dell'evoluzione nonostante la loro intrinseca «pericolosità», tali sequenze debbano necessariamente svolgere un compito determinante in qualche fase della vita della cellula o dell'organismo. Abbiamo visto come nella maggior parte dei casi le proteine codificate dagli oncogeni siano dotate di una attività enzimatica importante come la fosforilazione, un meccanismo attraverso il quale vengono regolate numerose attività metaboliche all'interno della cellula. Studi condotti su tumori del sistema ematopoietico, le cui cellule sono bloccate a stadi differenziativi differenti permettono di dimostrare che, all'interno di una stessa linea differenziativa, (la linea linfoide, per esempio) ad ogni passaggio maturativo corrisponde l'attivazione di oncogeni distinti. È dunque possibile pensare al processo differenziativo delle cellule del sistema ematopoietico come ad un meccanismo di attivazione «a cascata»: il prodotto di ciascun oncogene è deputato al controllo di un particolare stadio differenziativo. È possibile quindi assegnare agli oncogeni del sistema ematopoietico un ruolo determinante nel dirigere la differenziazione cellulare.

b. Oncogeni virali

La presenza di oncogeni nel genoma dei retrovirus viene attualmente interpretata sulla base delle peculiari caratteristiche fisiologiche di questi virus a RNA: l'ipotesi più probabile è che gli oncogeni siano tutti di origine cellulare e che, durante il ciclo d'infezione, i primi retrovirus abbiano, per così dire, «ripescato» molecole di RNA messaggero dalla cellula e le abbiano incorporate nel proprio genoma. La presenza di un oncogene nel genoma di un virus può conferire all'agente infettante un vantaggio evolutivo in termini di probabilità di mol-

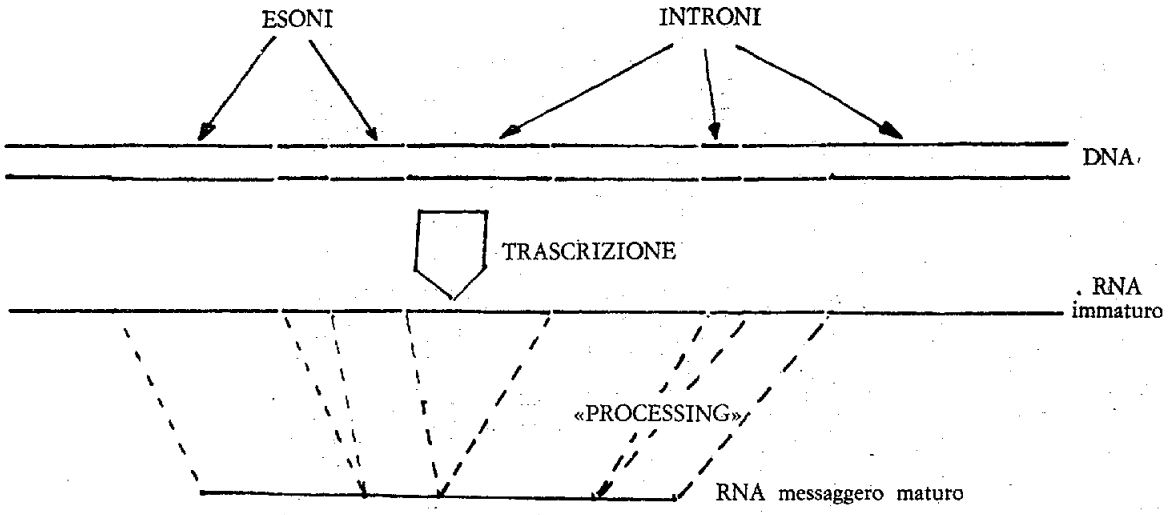

Fig. 13 - Struttura del gene eucariote e formazione dell'RNA messaggero, per eliminazione delle sequenze corrispondenti agli «introni».

tiplicazione e ciò potrebbe spiegare l'associazione preferenziale che oggi si riscontra fra geni propri del virus ed oncogeni di origine cellulare. Che l'origine degli oncogeni sia effettivamente cellulare lo suggerisce la struttura stessa degli oncogeni. La struttura del gene nelle cellule eucariote è molto caratteristica: le sequenze codificanti (vale a dire quelle che hanno un «significato» proteico) di uno stesso gene non sono in genere continue ma risultano essere interrotte da regioni di DNA alle quali non corrisponde alcun senso in termini di proteina (fig. 13). Le sequenze codificanti vengono chiamate esoni, le sequenze non codificanti introni. Durante la sintesi dell'RNA messaggero viene prodotta, in un primo momento, una molecola di RNA contenente sia gli esoni che gli introni. Questa molecola non è ancora utilizzabile come RNA messaggero da parte della cellula: il messaggero maturo è invece una molecola dalle dimensioni inferiori rispetto a quella dell'RNA iniziale in quanto, durante il processo di maturazione, (il «processing») vengono eliminati gli introni non codificanti. Gli oncogeni virali hanno, nella quasi totalità dei casi, una struttura molecolare identica a quella del messaggero maturo presente nelle cellule normali.

Abbiamo cercato di vedere il problema della neoplasia «dalla parte della cellula tumorale», aprendo uno spiraglio su quelle che sono le basi genetiche del fenomeno tumorale.

Alla luce di queste conoscenze, sapendo cioè che le caratteristiche strutturali e fisiologiche delle cellule tumorali possono essere attribuite ad alterazioni nei livelli intracellulari di una o di poche proteine, o per lo più a differenze quasi insignificanti nella sequenza aminoacidica rispetto ad alcune proteine normali, non stupisce che i tumori di origine spontanea, come ha ricordato nella sua relazione il Prof. Clerici, non siano affatto immunogenici.

Atti della tavola rotonda su: «Immunologia comparata della malattia neoplastica»
Forlì, 14 settembre 1984

P.C. Powell *

L'IMMUNITÀ NELLE NEOPLASIE IL CONTRIBUTO RESO DALLA RICERCA SUI POLLI

Introduzione

La ricerca sui tumori dei polli ha una lunga storia ed è stato fin dal 1908 che Ellerman e Bang descrissero una forma trasmissibile di leucemia causata da un agente filtrabile. L'anno prima, Marek aveva descritto le lesioni della neurolinfomatosi del pollo che in seguito prese nome da lui, e nel 1911 il sarcoma di Rous risultò essere causato da un virus che in questo caso si collegava ai virus responsabili nell'induzione della leucosi linfoide. Pertanto i polli sono storicamente qualificati per lo studio sperimentale sui tumori. Oltre a queste annotazioni storiche, attualmente si riconosce che i virus capaci di indurre i tumori nei polli comprendono i rappresentanti delle due maggiori classi di virus tumorali, cioè il virus erpetico della malattia di Marek ed il retrovirus della leucosi linfoide (Tav. 1). Dall'esame epidemiologico delle due malattie emergono ulteriori considerazioni. Il virus della malattia di Marek è un virus a trasmissione orizzontale che si diffonde dall'epitelio del follicolo della piuma all'atmosfera, infettando gli altri polli attraverso le vie respiratorie. Anche i virus della leucosi linfoide hanno una diffusione orizzontale, ma è possibile anche la trasmissione verticale attraverso l'uovo. Ciò può comportare l'esposizione dell'embrione immaturo al virus e, in conseguenza dell'esposizione precoce, condurre alla sua tolleranza immunologica, cioè la sua incapacità di riconoscere il virus come un corpo estraneo e quindi di reagire nel modo adeguato. Il virus della leucosi linfoide può diffondersi anche in altro modo, verticalmente, attraverso la linea germinale in forma integrata. In tal modo può accadere che non vi sia alcuna

* Houghton Poultry Research Station, G.B.

espressione del genoma come antigene virale, per cui il virus sfugge di nuovo al sistema immunitario.

Un altro vantaggio importante del pollo nella ricerca immunologica sui tumori è costituito dal fatto che il sistema immunitario è morfologicamente suddiviso in un sistema immunitario umorale borsa-dipendente e in un sistema immunitario cellulo-mediato timo-dipendente(fig. 1). Le comuni cellule staminali immature del sacco vitellino che originano nel mesenchima embrionale, non sono predestinate a divenire dei B-linfociti o dei T-linfociti, ma la loro maturazione dipende da una fase di «apprendimento» nella borsa o nel timo. Qui sono esposte alle cellule epiteliali, sviluppando di conseguenza le caratteristiche dei B-linfociti, destinati a divenire plasmacellule, o dei T-linfociti, destinati a partecipare alle reazioni immunitarie cellulo-mediate. Nei mammiferi apparentemente avvengono processi simili, compresa la maturazione dei T-linfociti nel timo. Tuttavia non appare ancora chiaro quale sia l'equivalente morfologico nei mammiferi della Borsa di Fabrizio.

Un altro vantaggio presentato dai polli nei confronti dei mammiferi è la possibilità di avere accesso all'embrione in fase di sviluppo durante tutto il periodo dell'embriogenesi. Così sono possibili le inoculazioni, le manipolazioni e quegli atti chirurgici che sarebbero di difficile esecuzione in feti di mammiferi. Tuttavia è necessaria una certa prudenza prima di estendere alle altre specie le osservazioni effettuate sui polli. Sebbene numerosi meccanismi di azione immunitaria che agiscono nei volatili siano evidentemente identici a quelli descritti nei mammiferi, i due gruppi di animali sono ben distinti dal punto di vista filogenetico e fra di essi possono esservi importanti differenze ancora sconosciute.

Tumori linfoidi nel pollo

I polli vanno soggetti ad una vasta gamma di tipi di tumore, ma non vi è alcun dubbio che le varie forme del linfoma sono le più numerose e pertanto le più importanti dal punto di vista economico. Ciò può derivare dal fatto che il tessuto linfoide dei volatili non è strutturato in linfonodi e possiede una sua capacità, notevole ed innata, di infiltrare e proliferare nelle zone in cui è necessario, per esem-

pio nei siti di infezione. La leucosi linfoide e la malattia di Marek sono simili dal punto di vista patologico, pur differendo in molti importanti aspetti. In primo luogo, come già detto, le due malattie sono causate da virus differenti, in gran parte non correlati. In secondo luogo, le cellule maligne della leucosi linfoide sono dei B-linfociti, mentre nella malattia di Marek sono dei T-linfociti (Tav. 1). Ciò è stato reso meno evidente in parte a seguito dell'interessamento di altre cellule – i B-linfociti, i macrofagi, le cellule reticolari – nei linfomi della malattia di Marek. Probabilmente trattasi di cellule reattive in senso immunologico che si infiltrano tra le cellule neoplastiche. I virus responsabili delle due malattie sono estremamente diffusi, ma non vi è dubbio che la malattia di Marek sia economicamente più importante. Perciò è stata attentamente studiata ed ora la malattia di Marek è controllata in campo immunologicamente, cioè con la vaccinazione. In base a quanto detto, vale la pena di prendere in considerazione le risposte immunitarie che vengono stimolate in questa malattia. Sono esse che ci daranno indicazione dei tipi di reazione immunitaria che si possono prevedere in altri tumori indotti da virus.

Per amor di chiarezza per prime saranno descritte le risposte immunologiche osservate nella malattia di Marek. In secondo luogo saranno esaminati i meccanismi attraverso i quali queste risposte immunologiche possono conferire la resistenza all'ospite.

Risposte immunitarie nella malattia di Marek

Prima cosa da dire è che il sistema immunitario entra in funzione nella malattia di Marek in due modi contrastanti. Gli antigeni associati alla malattia di Marek producono reazioni immunitarie potenzialmente protettive. Tuttavia gli organi linfoidi responsabili della risposta immunitaria sono essi stessi bersagli primari dell'infezione virale. Ciononostante si è dimostrato l'importanza del sistema immunitario nella resistenza in base all'efficacia dei vaccini nell'impedire l'evoluzione della malattia e alla maggiore sensibilità dei polli che sono sottoposti a terapie immunosoppressive, come la timectomia o il trattamento con ciclofosfamide.

Le risposte immunitarie sono stimolate da antigeni e nel caso della malattia di Marek gli antigeni rientrano in due categorie: antigeni vi-

rus-specifici da un lato ed antigeni associati a tumore dall'altro. Gli antigeni virus-specifici sono quelli associati a cellule infettate con esito produttivo o abortivo e comprendono antigeni virus-strutturali e glicoproteine virus-indotte. Gli antigeni associati a tumore sono rinvenibili nelle cellule tumorali. Essi comprendono il MATSA, l'antigene di superficie associato a tumore della malattia di Marek, gli antigeni embrionali, gli antigeni eterofili e gli antigeni associati a metastasi specifiche d'organo. Questi differenti tipi di antigene caratterizzano i diversi modi in cui il virus della malattia di Marek può infettare le cellule. Gli antigeni virus-specifici caratterizzano le cellule infettate con esito produttivo o abortivo, mentre gli antigeni associati a tumore caratterizzano cellule trasformate, infettate con esito non produttivo. Esiste un altro tipo di infezione, l'infezione latente, in cui il virus scompare all'interno del linfocita con infezione latente e in cui mancano prove antigeniche dell'infezione, a meno che la derepressione induca l'espressione virale. Pertanto le cellule ad infezione latente sono protette contro il sistema immunitario.

Aggiungiamo qualche parola sullo stato del MATSA. La presenza di MATSA è inequivocabilmente associata a linfociti e ad infezione *in vivo* da virus appartenenti al gruppo di virus della malattia di Marek. Tuttavia, la sua associazione con la trasformazione maligna è meno chiara poiché è indotta non solo da ceppi virulenti (sierotipo 1) del virus della malattia di Marek (Tav. 2), ma anche da ceppi attenuati del sierotipo 1, da ceppi non oncogeni (sierotipo 2) e dal virus erpetico dei tacchini (sierotipo 3). Si è pertanto inclini a concludere che o il MATSA non è specifico per la trasformazione, oppure che questi altri virus possiedono una potenziale attività oncogena, affermazione questa per cui disponiamo di poche o nessuna prova. Sarebbe forse meglio considerare il MATSA come un marcatore pre-neoplastico, specifico della trasformazione, che appare durante la trasformazione ma in una fase precoce del processo.

Questo è dunque il quadro immunitario fondamentale della malattia di Marek: in esso figurano due tipi diversi di antigeni – virus-specifici e associati a tumore – che in potenza possono stimolare risposte immunitarie separate. In secondo luogo vi è il sistema immunitario che svolge due ruoli contradditori, producendo le risposte immunitarie contro gli antigeni oppure non riuscendovi a causa degli effetti immunosoppressivi del virus.

Le risposte immunitarie descritte in relazione alla malattia di Marek sono numerose e varie. Esse comprendono i macrofagi, l'interferon, l'ipersensibilità ritardata da T-linfociti, i T-linfociti citotossici, le cellule «killer» naturali, la citotossicità cellulo-mediata da anticorpi-dipendente e il complemento. Un altro fattore non-immunologico che determina resistenza può essere costituito dalla limitazione delle quantità di cellule bersaglio per l'infezione virale o la trasformazione e un altro ancora, suggerito ma per il quale non possediamo alcuna prova, è l'interferenza virale.

Anticorpi. Gli anticorpi diretti contro gli antigeni virali possono essere individuati in sieri prelevati da volatili infetti usando l'immunoprecipitazione, l'immunofluorescenza, la neutralizzazione virale ed altri metodi, compreso l'ELISA. Gli anticorpi sono diretti contro gli antigeni interni, gli antigeni di membrana e l'envelope virale ed esiste un grado soddisfacente di specificità sierotipica. Vi è tuttavia scarsa evidenza di una significativa risposta umorale nei confronti delle cellule tumorali della malattia di Marek. Inoltre, gli anticorpi diretti contro il MATSA non sono stati individuati nei polli convalescenti o vaccinati, anche se si possono produrre anticorpi anti-MATSA inoculando polli con cellule linfomatose o di linee cellulari linfoblastoidi.

Malgrado questi aspetti negativi, la somministrazione passiva di siero prelevato da volatili convalescenti ha accelerato la regressione di tumori trapiantabili della malattia di Marek, probabilmente per intervento di anticorpi citofili agenti da soli o in combinazione con cellule linfoidi. Gli anticorpi possono essere attivi in congiunzione al complemento, ma si può verificare una attivazione diretta del complemento per la via alternativa e l'attivazione per via alternativa da linee cellulari tumorali della malattia di Marek è stata effettivamente descritta.

Cellule T. Le reazioni cellulo-mediate si verificano sia contro gli antigeni virali sia contro gli antigeni tumorali. L'ipersensibilità ritardata può essere scoperta *in vivo* con gli antigeni virali e i T-linfociti sono attivi *in vitro* contro cellule infettate da virus nel test di inibizione delle placche. Questa attività citotossica è relativamente specifica per il virus della malattia di Marek o per il virus erpetico del tacchino. L'attività dei linfociti sensibilizzati è maggiore contro il virus

omologo rispetto al virus eterologo. È stata dimostrata *in vitro* la citotossicità mediata da T-linfociti contro linee cellulari linfoblastoidi della malattia di Marek (MD). Le cellule di milza prelevate da polli infettati con sierotipi 1, 2 o 3 del virus della malattia di Marek sono citotossiche. Il grado di citotossicità specifica è ridotto, ma può essere accresciuto sottoponendo le cellule bersaglio a trattamento con neuraminidasi, probabilmente per maggiore esposizione dei relativi antigeni. La natura dell'antigene bersaglio non è nota: può trattarsi di MATSA, anche se la citotossicità ha continuato a manifestarsi dopo l'eliminazione dalle cellule del MATSA per via enzimatica; inoltre nemmeno il blocco del MATSA con antisieri ha prodotto effetto. Tuttavia la significatività della citotossicità *in vitro* viene posta in dubbio per una serie di motivi. L'associazione da taluni descritta tra l'attività citotossica e lo stadio dell'infezione è molto variabile e alcuni ricercatori hanno riscontrato una citotossicità solo con cellule «effector» provenienti da donatori portatori di tumore; inoltre, la citotossicità *in vitro* si è dimostrata poco significativa se le cellule «effector» e le cellule bersaglio hanno in comune gli stessi antigeni di maggiore istocompatibilità. Essa può essere perciò un artefatto *in vitro*.

Citotossicità cellulo-mediata anticorpi dipendente. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). La ADCC diretta contro cellule infettate dal virus è probabilmente importante per controllare la diffusione del virus cellulo-associato nei polli infettati. L'ADCC è stata dimostrata con l'antisiero prelevato da volatili infettati con il virus della malattia di Marek o con il virus erpetico del tacchino, il quale associato ai linfociti ematici o prelevati da milza normale, è attivo contro le cellule infettate con uno dei due virus. Pertanto l'ADCC non rivela la specificità verso il virus dimostratasi con la citotossicità antivirale mediata da T-linfociti.

Macrofagi. Come l'intero sistema immunitario, i macrofagi sembrano svolgere un ruolo bivalente nella resistenza alla malattia di Marek. Essi o i loro precursori cellulari reticolo-endoteliali sembrano essere una cellula bersaglio per il virus della malattia di Marek. D'altro lato essi svolgono un ruolo di immunosorveglianza. In volatili sensibili la stimolazione del sistema reticolo-endoteliale ha ridotto la patologia della malattia di Marek; in volatili resistenti l'oncogenesi è stata au-

mentata dalla soppressione dei macrofagi. Essi costituiscono una componente dei tumori della malattia di Marek.

I macrofagi prelevati da polli infettati possono limitare la replicazione *in vitro* del virus della malattia di Marek e possono anche influenzare la proliferazione delle cellule linfomatose e delle cellule della linea linfoblastoide. Parte della loro attività antivirale può dipendere dalla cooperazione tra i macrofagi e l'anticorpo. D'altronde alcune attività dei macrofagi nella malattia di Marek possono essere attribuite ad una espansione dei ruoli da loro abitualmente svolti. Per esempio i macrofagi normali possono inibire la risposta dei T-linfociti ai mitogeni e limitare la replicazione della crescita della linea cellulare linfoblastoide.

Cellule «killer» naturali. Si è riscontrata una citotossicità naturale nella milza di polli appartenenti a ceppi determinati. L'attività delle cellule killer naturali è stata inibita in fase di sviluppo della malattia di Marek in polli sensibili, ma è aumentata dopo il «challenge» in polli geneticamente resistenti o vaccinati. Le cellule killer naturali sono presenti nei linfomi della malattia di Marek e la loro attività è apparsa maggiore nei tumori trapiantabili in via di regressione rispetto ai tumori in fase di avanzamento indotti da virus.

Interferone. Alcuni ceppi virali inducono la formazione di interferone, i cui livelli sono maggiori nei polli resistenti rispetto a quelli sensibili. Inoltre esso protegge contro il tumore JMV trapiantabile. Tuttavia un suo eminente ruolo protettivo appare improbabile poiché non tutti i ceppi virali inducono la formazione di interferone.

Immunosoppressione. Il contrario della risposta immunitaria nella malattia di Marek è l'immunosoppressione. Essa costituisce un importante aspetto nella malattia di Marek: il grado di immunosoppressione può essere importante nella valutazione della probabilità della successiva malattia neoplastica.

La depressione delle risposte *in vitro* dei linfociti ai mitogeni caratterizza l'infezione in fase iniziale. Quanto detto si osserva a sette giorni dall'infezione da virus virulento della malattia di Marek, corrispondente allo stadio di infezione citolitica acuta del tessuto linfoide, ma anche da virus non oncogeno della malattia di Marek e da virus

erpetico del tacchino. Tuttavia, alcuni ceppi di virus virulento della malattia di Marek (GA) e di virus attenuato della malattia di Marek non causano questa depressione in fase iniziale. La depressione precoce è transitoria e le risposte riprendono in varia misura sia nei polli sensibili che nei polli resistenti. I volatili sensibili che contraggono la malattia indicano una depressione in seguito, ma le risposte sono normali oppure accentuate nei volatili geneticamente resistenti oppure in quelli infettati con virus non oncogeno della malattia di Marek o con virus erpetico del tacchino. Anche la vaccinazione protegge sia dalla depressione iniziale che secondaria della risposta mitotica quando i polli sono sottoposti al «challenge» con virus virulento della malattia di Marek.

La depressione secondaria corrisponde ad una compromissione delle risposte umorali e mediate da cellule ad una vasta gamma di antigeni; essa può essere correlata ad aumentata sensibilità nei confronti di altre malattie, come la coccidiosi.

I meccanismi che regolano l'immunodepressione non sono noti. La depressione precoce della risposta mitogena può collegarsi alla localizzazione del virus negli organi linfoidi. È interessante notare che i virus patogeni che producono l'infezione citolitica e la distruzione del tessuto linfoide ed i virus non patogeni che non le producono, ambedue causano una depressione iniziale simile. Almeno un ceppo di virus patogeno (GA) non comporta questa depressione iniziale della risposta mitotica, e ciò può collegarsi alla sua relativa incapacità di replicare negli organi linfoidi. Similmente, non si è notata alcuna depressione con il virus attenuato della malattia di Marek, la cui replicazione avviene in misura molto limitata negli organi linfoidi.

Vi è un interessamento dei macrofagi soppressori ed essi possono essere rinvenuti nella milza di volatili infettati.

L'immunosoppressione secondaria, durante la fase linfoproliferativa della malattia di Marek, sarebbe suscettibile di una serie di spiegazioni. Vi potrebbe essere una deplezione di cellule reattive normali in conseguenza dell'atrofia linfoide o della sostituzione delle cellule normali con cellule linfomatose non reattive. In alternativa vi potrebbero essere dei fattori soppressivi. Recentemente un'interessante osservazione è che le linee cellulari linfoblastoidi producono *in vitro* fattori soppressivi che sono attivi, almeno in parte, per stimolazione dei macrofagi alla liberazione di prostaglandina. Ciò fornisce un mec-

canismo diretto attraverso il quale le cellule linfomatose della malattia di Marek causano l'immunosoppressione e spiega l'associazione dell'immunosoppressione con la linfoproliferazione e la malattia clinica, piuttosto che con la semplice infezione.

Qualunque siano i meccanismi interessati, l'immunosoppressione secondaria osservata nella malattia di Marek sembra essere una conseguenza più che una causa della formazione del linfoma. L'immunosoppressione primaria potrebbe contribuire allo sviluppo di linfomi, ma il suo ruolo viene messo in dubbio dalla sua insorgenza in polli infettati con virus non oncogeni. È utile ricordare che molte infezioni virali ed anche particelle virali uccise possono inibire le risposte mitotiche.

Immunità alla malattia di Marek

Come possono queste varie reazioni immunitarie contribuire alla resistenza alla malattia di Marek?

In teoria vi sono molti punti a cui lo sviluppo della malattia potrebbe essere bloccato, per esempio: (a) l'infezione può essere prevenuta, (b) l'infezione avviene ma si limita la replicazione e la propagazione del virus, (c) la trasformazione maligna è prevenuta, e (d) la trasformazione maligna avviene ma i tumori regrediscono.

Resistenza non significa refrattarietà all'infezione: i volatili resistenti contraggono l'infezione e restano infetti. La resistenza però si associa alla soppressione della replicazione del virus quale conseguenza delle risposte immunitarie dirette contro gli antigeni virus-specifici. Ugualmente, quando volatili resistenti sono sottoposti al challenge con virus oncogeno della malattia di Marek, si producono cellule tumorali, ma esse non si trasformano in tumori poiché sono tenute sotto controllo dal sistema immunitario. Pertanto sembra che i meccanismi immunitari sia antivirali sia antitumorali entrino in gioco nel produrre resistenza. Questa conclusione ha fornito la base per un ipotetico meccanismo di resistenza a due stadi (Tav. 3). Per esso si suppone una resistenza iniziale nei riguardi della replicazione e propagazione virale; il livello ridotto di attività virale diminuirebbe l'incidenza della trasformazione maligna e nello stesso tempo il sistema linfoide sarebbe preservato dagli effetti immunosoppressivi. La seconda fase sarebbe

costituita da un rigetto immunologico di cellule trasformate, indipendentemente dagli eventi virologici iniziali, per quanto da essi influenzata fino al punto di produrre immunosoppressione e trasformazione linfocitaria.

La dimostrazione di una duplice risposta immunitaria si basa sull'osservazione, nei polli resistenti, di un'attività antivirale ed antitumorale del tipo già descritto. Inoltre essa è confermata dalla riuscita immunizzazione descritta in letteratura contro la malattia di Marek con l'impiego di antigeni virali o tumorali inattivati. In questi esperimenti è stato possibile dissociare le risposte immunitarie ai due tipi di antigeni. I due tipi di vaccino inattivato inibivano la comparsa di cellule portatrici di MATSA (cioè cellule trasformate) e prevenivano lo sviluppo di linfomi, ma sulla base di meccanismi diversi. Gli antigeni virali inattivati agivano in senso protettivo inducendo l'immunità contro il virus, il che era caratterizzato dallo sviluppo di anticorpi neutralizzanti con una diminuzione della viremia della malattia di Marek, inibizione della replicazione virale e delle iniziali trasformazioni degenerative negli organi linfoidi, pur essendovi assenza di linfociti citotossici verso le cellule tumorali. Tuttavia non si sviluppavano tumori probabilmente a causa dell'effetto combinato della trasformazione limitata e della preservazione del sistema immunitario, ambedue conseguenza dei diminuiti livelli di attività virale. L'immunizzazione con cellule tumorali non modifica gli episodi virologici iniziali; si sono però rinvenuti dei linfociti citotossici per cellule della linea linfoblastoide e questa risposta antitumorale probabilmente era responsabile del rigetto delle cellule tumorali.

Un'altra prova che implica la presenza dell'immunità antitumorale è data dalla protezione fornita da vaccini vivi della malattia di Marek contro i trapianti di tumori della stessa, tra cui il trapianto di JMV che è privo di antigeni virali ma che esprime il MATSA. I virus vaccinali stimolano la comparsa di cellule portatrici di MATSA e di linfociti citotossici per le cellule tumorali. Inoltre, gli antigeni virali di vaccini inattivati non sono stati in grado di immunizzare contro il trapianto di JMV, il che conferma l'importanza degli antigeni tumore-specifici in questo tipo di protezione. Potrebbe essere spiegata in modo analogo l'incapacità del virus erpetico di tacchino di proteggere tale specie dagli effetti oncogeni del virus della malattia di Marek. Il virus

erpetico del tacchino infetta, naturalmente, i tacchini ma senza portare alla comparsa di MATSA. La mancata protezione può dunque essere spiegata dalla risultante assenza di immunità anti-tumorale.

Un ulteriore contributo alla messa a punto dell'ipotesi dei due stadi è stato dato da alcune osservazioni sulla patogenesi delle infezioni indotte dal virus della malattia di Marek in polli resistenti e sensibili. Gli iniziali eventi virologici che si verificano negli organi linfoidi non presentano differenze dovute all'età a cui l'infezione viene contratta, né alla costituzione genetica dell'ospite. Solo dopo circa 8 giorni dall'esposizione si iniziano ad osservare delle differenze e a 10 giorni è possibile distinguere i gruppi destinati a sopravvivere e quelli destinati a sviluppare i tumori. Tutto questo rispecchia correttamente lo sviluppo graduale di una efficace immunità antivirale. Un effetto simile, cioè lo sviluppo graduale dell'immunità antitumorale, si può osservare studiando grandi numeri di cellule portatrici di MATSA. Come in tutte le regole generali, tuttavia, esistono anche in questo caso delle eccezioni e nel caso dei polli del Regional Poultry Research Laboratory, East Lansing appartenenti alle linee 6 e 7, la diversità degli eventi virologici si osserva immediatamente dopo l'infezione e indipendentemente dalle influenze del sistema immunitario. In questo caso la sensibilità o resistenza viene determinata dalla presenza o assenza di cellule bersaglio per l'infezione virale o la trasformazione.

Chiaramente svariati meccanismi effettori operano nella malattia di Marek, diretti contro almeno due ampie categorie di antigeni. Sono stati fatti alcuni tentativi tesi a dimostrare la presenza di un unico meccanismo di resistenza come principale determinante della stessa e l'immunità mediata dai linfociti-T sembra svolgere un ruolo dominante in tal senso. La borsectomia non ha quindi alcun effetto sulla resistenza dipendente dall'età, dallo stato genetico o dalla vaccinazione con virus attenuato della malattia di Marek, anche se la vaccinazione con virus erpetico del tacchino si è rivelata meno efficace nei polli sottoposti a borsectomia. D'altro lato la timectomia abolisce queste forme di resistenza. Tutto questo è comunque più complesso di quanto non sembri poiché il ruolo del timo, come si verifica per la maggior parte degli aspetti della malattia di Marek, è bivalente. La timectomia aumenta l'incidenza di linfomi nei polli resistenti, ma diminuisce la formazione di linfomi nei polli sensibili, presumibilmente diminuendo

il numero di cellule bersaglio disponibili per la trasformazione. Il differente effetto della timectomia sulla formazione di linfomi in gruppi sensibili e resistenti può d'altronde essere previsto dato che i T-linfociti forniscono sia il bersaglio per la trasformazione sia le cellule «effector», per l'eliminazione del virus e delle cellule trasformate.

Nonostante le indicazioni che l'immunità mediata dai T-linfociti svolga un ruolo dominante, la sua azione non è essenziale al conferimento della resistenza. Per esempio, anticorpi trasferiti passivamente possono svolgere un ruolo protettivo. Analogamente in alcuni casi è possibile che un certo grado di resistenza venga determinato dai macrofagi o dalle cellule killer naturali di per sé. Tuttavia, allo stato naturale, tutte le parti del sistema immunitario verranno stimolate e ciascuna svolgerà un qualche ruolo nel determinare la resistenza.

È appropriato a questo punto, come nota di cautela, aggiungere che alcuni aspetti della stimolazione immunitaria nella malattia di Marek possono non indurre la resistenza, ma invero contribuire alla patologia della malattia. La sensibilità alla mielina rappresenta una caratteristica immunologica della malattia che si può rievocare nel momento in cui si verifica la demielinizzazione. Quest'ultima è un evento secondario, successivo alla precedente infiltrazione linfoide dei nervi periferici. Sfortunatamente, la natura dello stimolo all'infiltrazione e del successivo stimolo alla demielinizzazione non è nota.

Immunità alla leucosi linfoide

Alcuni dei principi generali illustrati considerando l'immunità alla malattia di Marek si applicano anche all'altro importante tumore linfoide dei polli, la leucosi linfoide. Un animale infettato può combattere contro i tumori virus-indotti rispondendo agli antigeni virali strutturali e quindi limitando la replicazione e la diffusione virale, riducendo la trasformazione neoplastica e l'immunosoppressione. Vi possono inoltre essere risposte ad antigeni di superficie associati a cellule tumorali che quindi ritardano la crescita del tumore o ne causano la regressione. Tali antigeni tumorali possono essere antigeni virali strutturali, antigeni derepressi dell'ospite o altri antigeni di superficie, tumorali gruppo-specifici a volte codificati dal virus. Una complicazione nell'epidemiologia della leucosi linfoide è che è possibile la trasmissio-

ne verticale, che conduce all'infezione dell'embrione, e alla conseguente mancanza della risposta immunitaria, cioè alla tolleranza. Questi soggetti sono viremici in permanenza ed è probabile che sviluppino tumori.

Relativamente pochi studi sono stati condotti sulla vaccinazione contro la leucosi linfoide. Sulla base delle nostre conoscenze sulle risposte immunitarie ai virus e alle cellule tumorali, è probabile che tali studi portino a dei risultati utili. Una strategia alternativa soddisfacente è rappresentata comunque dall'eradicazione del virus da gruppi selezionati. Si tratta di cosa fattibile dato che il virus ha una diffusione orizzontale piuttosto inefficiente. Può darsi quindi che la pressione economica non divenga mai sufficiente a stimolare lo sviluppo di vaccini commerciali.

Implicazioni con l'immunologia dei tumori

Quale valore hanno questi studi sui tumori indotti da virus nei polli nel contesto più ampio dell'immunologia tumorale? In primo luogo sappiamo molto delle risposte immunitarie distinte che si verificano nei polli contro gli antigeni virus-specifici e tumore-specifici. È questo il caso della malattia di Marek ed anche dei tumori indotti da retrovirus come la leucosi linfoide e la reticoloendoteliosi. Risposte immunitarie separate di questo tipo si hanno nei tumori indotti da virus in altre specie, ad esempio la leucemia felina e la leucosi bovina enzootica. In secondo luogo, la caratteristica più notevole della malattia di Marek sta nel fatto che si tratta del primo tumore ad insorgenza spontanea ad essere controllato con la vaccinazione di massa. Questo presenta delle implicazioni per l'immunologia tumorale in genere e per i virus erpetici oncogeni in particolare. Fra gli herpesvirus oncogeni un importante candidato per la preparazione di un vaccino è il virus di Epstein-Barr umano, responsabile della mononucleosi infettiva, del linfoma di Burkitt e del carcinoma naso-faringeo. Il confronto diretto con la malattia di Marek consente di ipotizzare che un antigene virale inattivato sarebbe adatto come vaccino e si stanno facendo dei tentativi per preparare una subunità vaccinale (polipeptide). Si deve d'altronde essere cauti, come nel caso della malattia di Marek, il virus

di Epstein-Barr può essere immunodepressore ed alcune delle risposte immunitarie potrebbero risultare dannose. Ad esempio, in presenza di antigene in eccesso, le risposte *in vitro* di linfociti sensibilizzati agli antigeni del virus di Epstein-Barr sono inibite per soppressione antigene-specifica mediata dai T-linfociti suppressor. Allo stesso modo, cellule infettate o trasformate dal virus di Epstein-Barr portano alla liberazione di attivatore del plasminogeno che inibisce la funzione delle cellule killer naturali tramite un effetto sulle cellule bersaglio. L'attivatore del plasminogeno inibisce inoltre la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente. Sono pure liberate le prostaglandine. Infine, titoli elevati di anticorpi serici indicano una prognosi infausta sia nel linfoma di Burkitt sia nel carcinoma naso-faringeo e i titoli diminuiscono in remissione della malattia. Il carcinoma naso-faringeo progressivo è associato ad alti titoli di IgA, che sopprime la stimolazione linfocitaria da parte dell'antigene. Bisogna dunque concludere che lo studio di una malattia, quella di Marek ad esempio, può gettare una parziale luce sugli eventi che si verificano in altre malattie, soprattutto se sono interessati agenti eziologici simili. Tuttavia i particolari meccanismi che agiscono nelle diverse malattie possono variare in modo significativo. È probabile, ad ogni modo, che lo studio di un certo numero di malattie possa darci una comprensione più approfondita di ogni singolo processo patologico. Nel caso della malattia di Marek e delle malattie connesse al virus di Epstein-Barr, gli studi recenti sulla natura dell'immunosoppressione nella malattia di Marek sembrano giustificati.

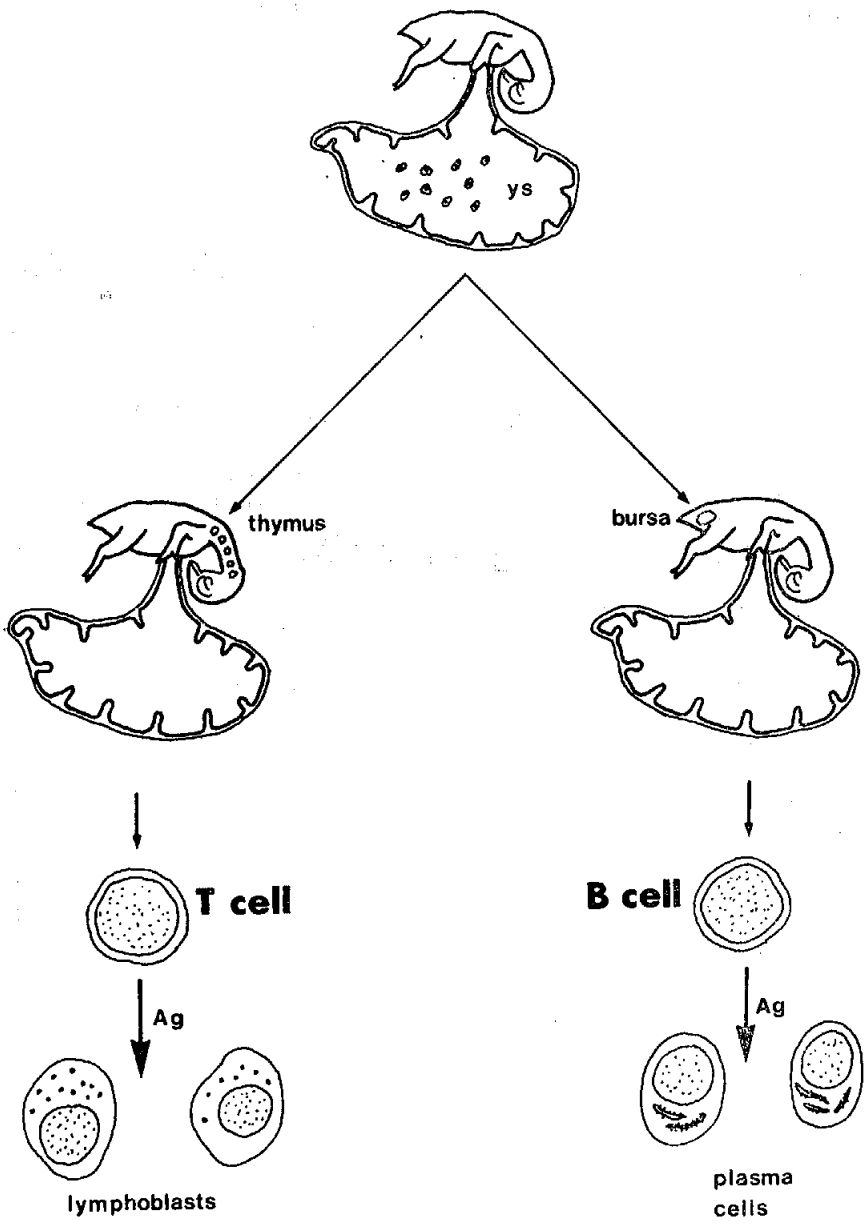

Fig. 1 - La differenziazione delle cellule embrionali staminali del sacco vitallino (ys) nella borsa o nel timo. La differenziazione finale in plasmacellule o linfoblasti è stimolata dall'antigene.

TAVOLA 1

Tumori comuni dei polli

MALATTIA	CARATTERISTICHE
MALATTIA DI MAREK	causata da un herpesvirus trasmissione orizzontale linfoma a linfociti T
LEUCOSI LINFOIDE	causata da retrovirus trasmissione orizzontale, verticale e genetica linfoma a linfociti B

TAVOLA 2

Classificazione sierologica di alcuni ceppi di virus della malattia di Marek (MVD) e herpesvirus del tacchino (HVT).

Sierotipo	Tipo di virus	Ceppo
1	MDV altamente patogeno (acuto)	ALA-8 GA HPRS-16 JM Oldenburg RPL 39
	MDV moderatamente patogeno (classico)	CVI 988 HPRS-B14 VC
	Varianti altamente virulenti di MDV (Biotipi varianti)	Md5 Md11
	MDV attenuato artificialmente	HPRS-16/att JM/att Md11/att
2	MDV non patogeno	HN HPRS-24 HPRS-27 SB-1
3	HVT non patogeno	AC-16 FC-126 HPRS 26 HVTpa WIHV-1

TAVOLA 3

Meccanismo a due fasi della resistenza alla malattia di Marek

---

1. *Immunità antivirale*

L'immunità contro gli antigeni virali della malattia di Marek ridurrà:

a) la replicazione e la diffusione del virus seguite all'infezione,

b) l'immunosoppressione dovuta al virus,

c) le possibilità di trasformazione maligna.

2. *Immunità antitumorale*

L'immunità contro gli antigeni tumorali della malattia di Marek causerà:

a) il rigetto delle cellule tumorali,

b) la regressione dei tumori.

Finito di stampare da
La Nuova Cartografica S.p.A. - Brescia
nell'aprile 1986