



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI DISCIPLINE CHIRURGICHE, ONCOLOGICHE ED  
ODONTOSTOMATOLOGICHE

Direttore di Dipartimento: Prof. Francesco Moschella

XXIV CICLO DOTTORATO DI RICERCA IN

ONCOLOGIA CLINICA E MOLECOLARE

“Studio dell’infiltrato linfocitario peritumorale e dei linfociti  
circolanti in pazienti affetti da melanoma cutaneo”

Tesi di Claudia Liuzza

Tutor Prof.ssa Adriana Cordova

Coordinatore Prof. Eugenio Fiorentino



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

UNIVERSITY OF PALERMO

FACULTY OF MEDICINE

ONCOLOGICAL, ODONTOSTOMATOLOGICAL AND SURGICAL  
SCIENCE DEPARTMENT

Director: Prof. Francesco Moschella

XXIV CICLE OF PhD DOCTOR IN CLINICAL AND  
MOLECULAR ONCOLOGY

“Study of the infiltrate of lymphocytes and peritumoral  
lymphocytes circulating in patients with cutaneous  
melanoma”

Thesis: Dr. Claudia Liuzza

Tutor Prof. Adriana Cordova

Coordinator Prof. Eugenio Fiorentino



## **INDICE**

INTRODUZIONE

RAZIONALE DEL PROGETTO DI RICERCA

STORIA DEL PROGETTO DI RICERCA

MATERIALI E METODI

RISULTATI

CONCLUSIONI

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

ELENCO FIGURE e TABELLE

## INTRODUZIONE

I linfociti T  $\gamma\delta$  sono un gruppo di effettori “natural killer” del sistema immunitario innato che hanno rappresentato un interessante oggetto di studio nel corso degli ultimi anni.

Il Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche ed Odontostomatologiche del Policlinico Universitario di Palermo, da anni attivo nei confronti della ricerca scientifica, ha recentemente condotto uno studio mirato alla conoscenza del potenziale effetto immunoterapeutico di questa popolazione linfocitaria verso i melanomi in stadio avanzato.

[1,2, 3, 4, 5, 6]

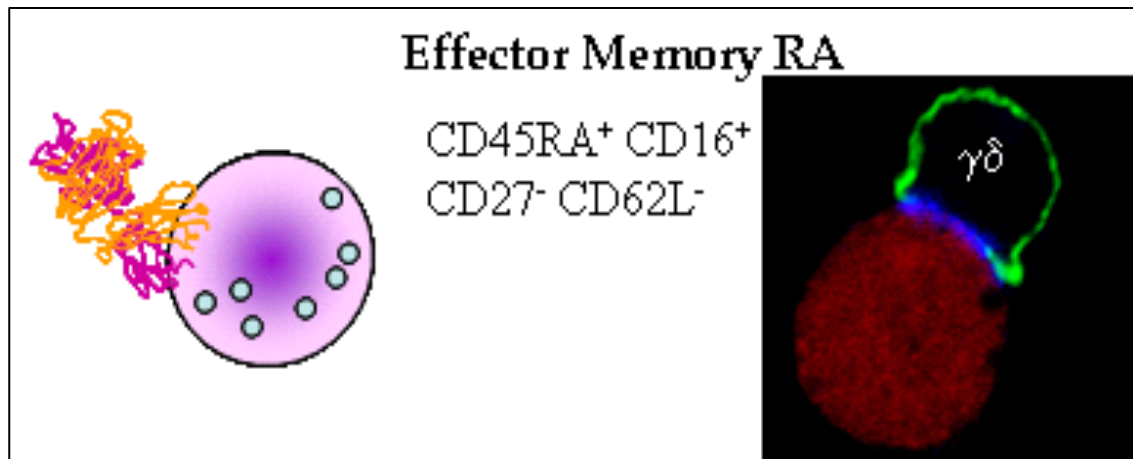
Sulla base della classificazione della American Joint Committee on Cancer (AJCC) i pazienti affetti da melanoma maligno in stadio IV con neoplasia metastatica hanno una prognosi infausta, con una bassa sopravvivenza a 5 anni.

Dati statistici stimano che la sopravvivenza globale sia inferiore al 10%, evidenziando come pochi trattamenti terapeutici siano al momento disponibili e ragionevolmente efficaci.

[7]

I diversi schemi terapeutici proposti ed approvati per il trattamento del melanoma metastatico (interleukina 2 ad alte dosi e chemioterapia) hanno mostrato un tasso di risposta globale del 16% e del 7,5%, con bassa risposta completa e sopravvivenza a lungo termine. [7]

Lo studio e l'analisi dell'infiltrato linfocitario peritumorale (TIL) nei pazienti affetti da melanoma maligno e la ricerca di linfociti circolanti nel torrente ematico permetterà di definire il ruolo chiave dei linfociti T  $\gamma\delta$ , e le potenzialità del trattamento terapeutico del melanoma maligno metastatico (Fig. 1). [2, 3, 4]



**Fig. 1** Immagine rappresentativa dei Linfociti T  $\gamma\delta$

## **RAZIONALE DEL PROGETTO DI RICERCA**

Diversi fattori sono stati esaminati nel tentativo di prevedere una migliore sopravvivenza nei pazienti affetti da melanoma cutaneo avanzato. Secondo il sistema di stadiazione TNM della AJCC, rientrano nello stadio IV i pazienti con metastasi da melanoma a distanza alla cute, tessuto sottocutaneo, e/o linfonodi (M1a), metastasi polmonari (M1b), e metastasi viscerali (M1c). Inoltre, pazienti con elevati livelli di latticodeidrogenasi (LDH) sierico sono assegnati alla categoria M1c, indipendentemente dalla sede di metastasi a distanza.

Sulla base di questa analisi più recente, i pazienti con metastasi a distanza alla cute, ai tessuti sottocutanei, e/o bacini linfonodali (M1a), hanno il più alto tasso di sopravvivenza ad un anno (62%) tra i pazienti con malattia in stadio IV. I pazienti con metastasi polmonari (M1b) hanno una prognosi intermedia con tasso di sopravvivenza a un anno del 53 %. Infine, i pazienti con metastasi viscerali non-polmonari e/o con un LDH sierico elevato (M1c) hanno la peggiore sopravvivenza a un anno tra i pazienti di stadio IV (33%).

Analogamente ad altri marcatori sierici comunemente utilizzati nella stadiazione e nella prognosi dei tumori solidi, diversi studi hanno costantemente dimostrato come elevati livelli di LDH sierico possano rappresentare un fattore negativo prognostico altamente significativo nei pazienti con melanoma di stadio IV; per tale motivo le più recenti linee guida raccomandano il dosaggio dell' LDH in tutti i pazienti con melanoma al momento della diagnosi di metastasi a distanza. [8,9]

Alla luce di queste considerazioni lo studio dell'infiltrato linfocitario peritumorale e sierico potrebbe essere considerato un interessante fattore prognostico ai fini della immunosorveglianza e immunoterapia.

Lo sviluppo di strategie di trattamento mediante l'analisi diretta o indiretta di studi clinici e sperimentali è fondamentale per migliorare le nostre conoscenze sui futuri potenziali trattamenti. [1,2, 3, 4, 5, 6]

Le opzioni terapeutiche approvate per il trattamento del melanoma metastatico comprendono alte dosi di IL -2 e la chemioterapia. Si tratta di opzioni che hanno, nella migliore delle ipotesi, un tasso di risposta globale del 16% e del 7,5 %, con bassa risposta completa e scarsa sopravvivenza a lungo termine. [14, 15]

Il ruolo chiave di linfociti T  $\gamma\delta$  sarà oggetto di studio e di ricerca per la caratterizzazione dei linfociti infiltranti il tumore (TILs) nella zona periferica o nella circolazione ematica di un paziente affetto da melanoma maligno.

Come dimostrato in molti tumori solidi, come i carcinomi mammario e prostatico, anche nel melanoma cutaneo il potenziale comportamento biologico e il meccanismo di azione della risposta immunitaria innata nel processo di progressione della malattia neoplastica risultano essere ben descritti. [23, 24, 25]

Nel panorama scientifico attuale, la ricerca di biomarcatori per l'identificazione del melanoma, la previsione di progressione della malattia, la prognosi e la pianificazione del trattamento rappresentano campi ancora in evoluzione. E' probabile che il miglioramento nello studio del profiling molecolare possa fornire informazioni supplementari su stadiazione del melanoma e prognosi dei pazienti affetti.

Sebbene l'LDH sia parte del sistema di stadiazione attuale, risulta essere un valore aspecifico e non può essere facilmente utilizzato per valutare la risposta alla terapia.

I linfociti infiltranti il tumore (TILs) sono, invece, una popolazione immune composta da diverse cellule immunitarie che hanno specificità e potenziale reattività contro i tumori. [13]

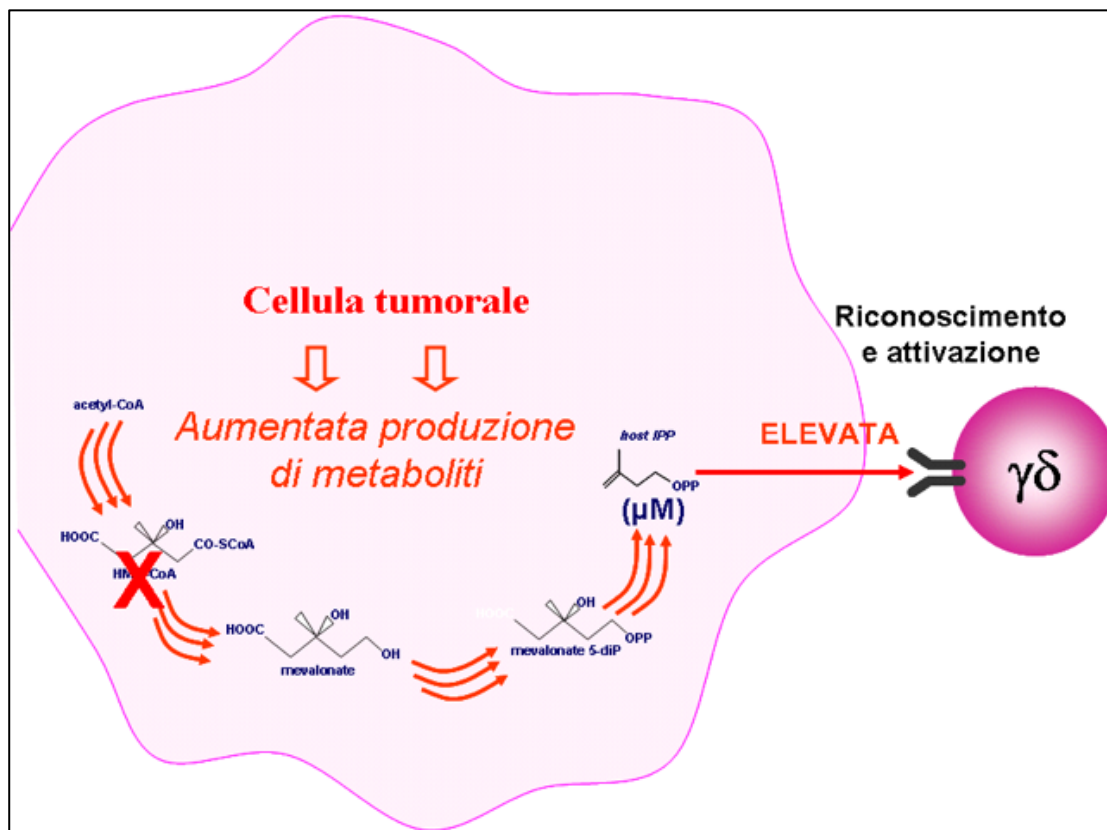
Recenti studi hanno riportato elevati tassi di risposta clinica nei pazienti con melanoma metastatico con i protocolli (TILs) di combinazione con chemioterapia non



mieloablativa (ciclofosfamide e fludarabina), “lymphodepleting”, immediatamente prima o aggiunto alla infusione di TIL ed alte dosi di terapia immunoterapica con IL-2. [15, 16, 17]

La terapia di combinazione con altri agenti serve a diminuire il numero di linfociti infiltranti il tumore (TILs) necessari per la terapia e/o diminuire la tossicità associata con ciclofosfamide e/o i regimi di preparazione della fludarabina.

Studi precedenti dimostrano l'evidenza di regressione spontanea della malattia nei pazienti affetti da melanoma grazie ad un maggior numero di linfociti infiltranti il tumore (TIL) correlato ad una migliore prognosi della malattia neoplastica. [10, 11, 12]

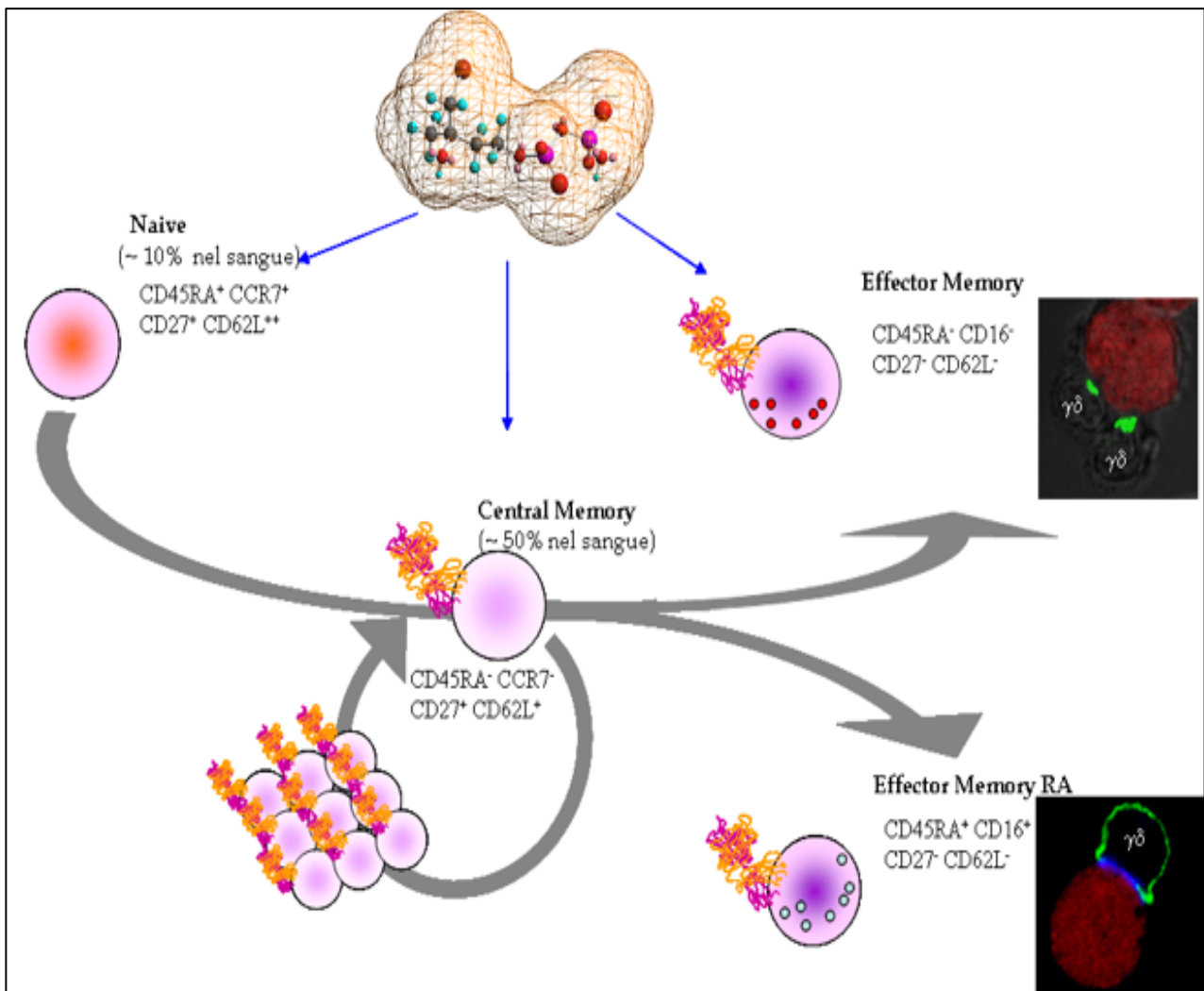


**Figura 2** Immagine schematica della via metabolica del mevalonato e del riconoscimento dei Linfociti T  $\gamma\delta$ .

Il razionale di questo studio si basa sulla funzione e sull'attività anti-melanoma delle cellule linfocitarie T CD4+, CD8+ e della sottopopolazione dei linfociti T  $\gamma\delta$  che sono stati

ampiamente studiati, sebbene pochi studi spieghino la funzione e il potenziale effetto dei linfociti T  $\gamma\delta$ , in pazienti affetti da melanoma cutaneo.

**Figura 3** Immagine dei Linfociti T  $\gamma\delta$



## ***Linfociti T $\gamma\delta$***

I linfociti T  $\gamma\delta$  sono importanti cellule effettrici del sistema immunitario che possono svolgere un ruolo nella sorveglianza antitumorale intorno alla periferia della lesione. [2,4]

Una prova sperimentale per studiare i linfociti T  $\gamma\delta$  intorno al sito del tumore primario è stata eseguita per identificare le cellule umane T  $\gamma\delta$ , che possono essere suddivise in due popolazioni principali in base al momento di espressione della catena  $\delta$ . L'esame viene eseguito su un campione di cute perilesionale (in stretta vicinanza al melanoma primario escisso), prelevato dall'equipe chirurgica dell'U.O. di Chirurgia Plastica e Ricostruttiva, ed inviato in soluzione salina fisiologica al Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie dell'Università degli Studi di Palermo.

Le cellule T  $\gamma\delta$ , che esprimono la catena V $\delta$ 1, sono spesso riscontrate nei tessuti mucosi, dove sono implicate nel mantenimento dell'integrità del tessuto epiteliale di fronte a danni, infezioni o trasformazione tumorale. Le cellule T che esprimono la catena V $\delta$ 2 predominano nel sangue periferico e negli organi linfoidi secondari. [32,33]

Evidenze cliniche indicano che il sistema immunitario ha un ruolo fondamentale nella patogenesi del cancro e può contribuire alla progressione della malattia così come all'inibizione della crescita tumorale. [10, 11, 12]

E' stato dimostrato che le lesioni tumorali in una fase di regressione sono marcatamente infiltrate da cellule mononucleate e dalla presenza di linfociti T, che è stata associata ad una prognosi migliore in pazienti affetti da melanoma maligno.

Comprendere il ruolo dei diversi sottogruppi di cellule immunitarie infiltranti il tumore nella patogenesi del tumore specifico è fondamentale per lo sviluppo di strategie immunoterapeutiche antitumorali efficaci. I linfociti T  $\gamma\delta$  svolgono un ruolo importante nel processo di immunosorveglianza.

Nel progetto di ricerca, concentreremo la nostra attenzione sulla presenza di cellule T  $\gamma\delta$ , ed in particolare dei sottoinsiemi V  $\delta 2$ , tra le cellule immunitarie infiltranti il tumore significativamente correlati con i melanomi in fase iniziale, una scoperta che potrebbe derivare, almeno in parte, dalla limitata efficacia della risposta immunitaria locale in fase di malattia avanzata. Le cellule T  $\gamma\delta$  sono un sottoinsieme di linfociti T caratterizzati dalla presenza di un complesso di riconoscimento antigene di superficie di tipo 2.

Tali cellule T  $\gamma\delta$  rappresentano solo il 2-5 % di cellule T periferiche, ma sono comuni in organi e mucose, perché agiscono come un primo sistema di difesa dell'organismo. Le cellule T  $\gamma\delta$  partecipano alla risposta immunitaria mediante citolisi diretta, nello sviluppo di fenotipi di memoria e nella modulazione di cellule immunitarie. Sono state implicate in disturbi autoimmuni, immunodeficienze, infezioni e malattie tumorali. Abbiamo segnalato il ruolo di cellule T  $\gamma\delta$  in oncologia, concentrandoci sulle loro potenziali applicazioni per il trattamento del cancro.

Recenti studi clinici supportano l'uso di cellule T  $\gamma\delta$  come immuno-agenti terapeutici, sia tramite il trasferimento adottivo di cellule T ex vivo  $\gamma\delta$  espanse o dopo l'attivazione di queste cellule T in vivo, mediante composti quali fosfoantigeni o aminobifosfonati. [41,42, 43]

Le cellule T  $\gamma\delta$  hanno diverse funzioni, quali:

- una funzione effettrice che può contribuire direttamente alla funzione immunitaria antitumorale
- una funzione citotossica che può mediare l'attività citotossica contro le cellule tumorali
- una funzione di produzione di citochine Th1 - associate e cross-talk con le cellule dendritiche, macrofagi e cellule B

In condizioni appropriate, tutti questi effetti delle cellule T  $\gamma\delta$  possono deviare dalla loro tipica funzione Th1 come fenotipo e polarizzare verso Th2, Th17, e le cellule T regolatorie (Tregs), i quali inibiscono la risposta immunitaria antitumorale. [41-47]

Presso il Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche ed Odontostomatologiche, dell'Università degli Studi di Palermo, è stata eseguita una valutazione funzionale delle cellule T  $\gamma\delta$ , infiltranti il tumore, isolate da pazienti affetti da melanoma primario. I livelli di infiltrazione di linfociti T  $\gamma\delta$  sono stati correlati con caratteristiche comuni clinico-patologiche.

Mediante il prelievo di un campione ematico e di un campione biotico di tessuto perilesionale al melanoma, prelevati contestualmente all'exeresi del melanoma cutaneo, è stato possibile isolare le cellule T  $\gamma\delta$  peritumorali e studiare la loro funzione differente nelle fasi di progressione del tumore primario. Sebbene le cellule T  $\gamma\delta$  siano note per esercitare sia un'azione di prevenzione tumorale sia l'attività di promozione dei tumori, ci sono ancora poche informazioni sulle caratteristiche funzionali e sul significato clinico delle cellule T  $\gamma\delta$  isolate dal sito del tumore.

In un recente studio, abbiamo studiato la distribuzione delle diverse popolazioni  $\gamma\delta$ , le cellule T nel melanoma e il loro impatto sulla prognosi della malattia. [2]

In questo progetto di studio, abbiamo raccolto tutti i dati relativi alle cellule T  $\gamma\delta$  per aprire nuovi orizzonti nella immunoterapia per i pazienti affetti da melanoma metastatico e anche per il carcinoma epiteliale della cute come il carcinoma a cellule squamose (SCC) come prossima prospettiva sperimentale.

## • **STORIA DEL PROGETTO DI RICERCA**

La ricerca dei linfociti T  $\gamma\delta$  nasce da previ studi condotti presso la stessa Università degli studi di Palermo, nel Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche ed Odontostomatologiche. Grazie alla stretta collaborazione in un progetto multidisciplinare, nel quale le conoscenze del dipartimento di Biopatologia e Biotecnologia Mediche e Forensi si mettono a confronto con l'Unità Operativa di Chirurgia Plastica e Ricostruttiva e con il Dipartimento di Oncologia Clinica, per lo studio di specifiche cellule linfocitarie peritumorali del sistema immunitario innato (MCH I), che potrebbero svolgere un ruolo chiave nel trattamento immunoterapico dei pazienti affetti da melanoma cutaneo.

Uno dei primi progetti di studio è stato realizzato per studiare le cellule V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2, le quali sono linfociti T non convenzionali, effettori dell'immunità innata, che agiscono come prima linea di difesa contro le cellule tumorali e gli agenti infettivi. [2]

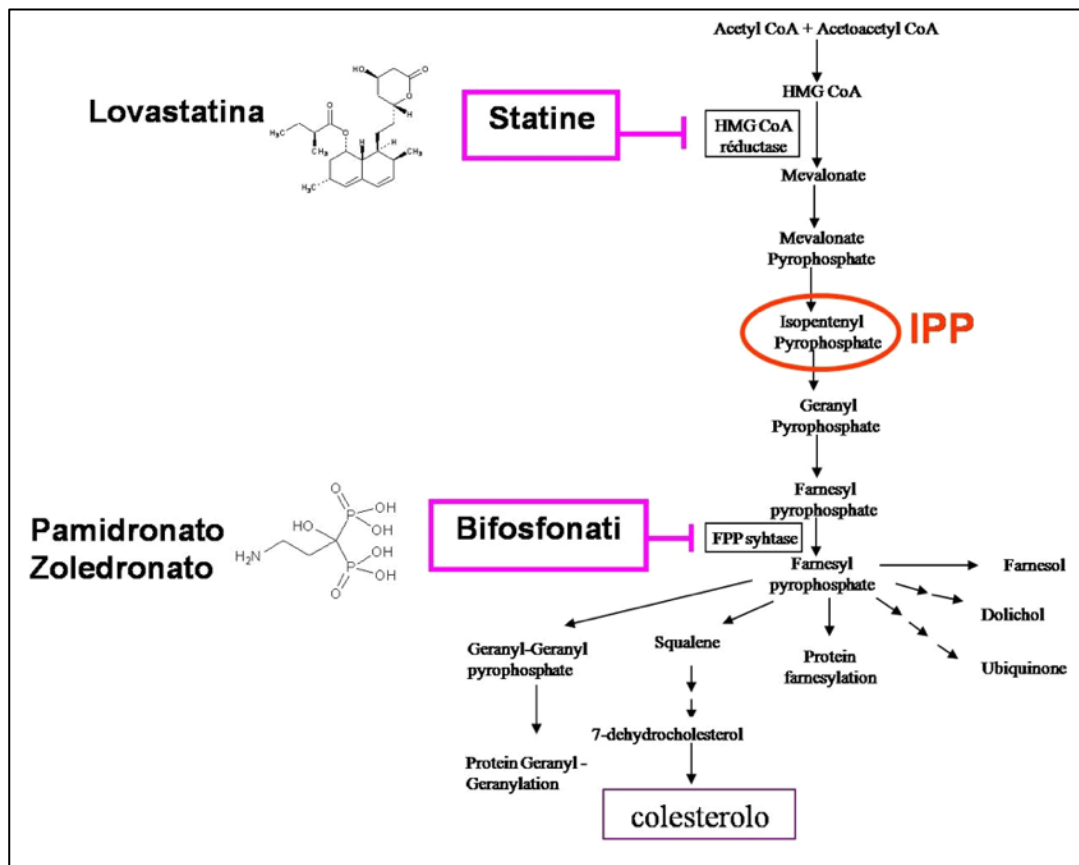
Questo studio di ricerca (PRIN 2005) è stato condotto sui linfociti T  $\gamma\delta$  come effettori della risposta immune nelle malattie tumorali per valutare i meccanismi di attivazione e le applicazioni cliniche. [3,5,43, 46] Successivi trials hanno dimostrato il potenziale ruolo chiave di questi linfociti T  $\gamma\delta$ , già precedentemente studiati nei linfonodi e nei processi infiammatori (2003). [44,45, 50]

Sin dal 1998, epoca in cui si pubblicano i primi risultati del ruolo dei linfociti T  $\gamma\delta$  negli umani e nei topi di laboratorio, si intuisce l'importanza di una ricerca immunopatologica con potenziali prospettive cliniche in pazienti affetti da tumore maligno come nel caso del melanoma cutaneo in stadio avanzato, oggetto di studio nel presente progetto di ricerca.

Successivi studi condotti nel 2008, hanno evidenziato come l'attivazione dei linfociti T  $\gamma\delta$  con una terapia sistemica con bifosfonati possa essere una nuova arma nell'immunoterapia del tumore maligno. [1,54, 55 ,56, 57] Infatti, le cellule T  $\gamma\delta$  possono

essere attivate, sia indipendentemente dal sistema di immunoistocompatibilità innato MHC I, sia dall'aumento della concentrazione di fosfoantigeni o agenti capaci di stimolare l'accumulo endogeno dei pirofosfati come ad esempio l'isopentenilpirofosfato (IPP). [40]

L'attivazione specifica dei linfociti T  $\gamma\delta$  in vivo con aminobifosfonati potrebbe rappresentare un nuovo target utile nell'immunoterapia di pazienti affetti da melanoma. [39]



**Fig.4** Schema rappresentativo della via del mevalonato e del meccanismo d'azione sia delle statine sia dei bifosfonati.

Recenti studi condotti nel corso dell'Anno Accademico 2012/2013 presso il Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche ed Odontostomatologiche di Palermo hanno dimostrato la reale presenza dei linfociti T  $\gamma\delta$  nell'infiltrato linfocitario peritumorale e nei linfociti circolanti di pazienti affetti da melanoma cutaneo.

La ricerca specifica di cellule linfocitarie infiltranti il tumore, appartenenti al sistema di immunoistocompatibilità innata, potrebbe essere fondamentale nello sviluppo di nuove terapie alternative basate sulla immunosorveglianza come meccanismo d'azione nei confronti del melanoma maligno in stadio avanzato, quando la chirurgia non migliora più la sopravvivenza globale a 5 anni e pochi trattamenti terapeutici sono ad oggi risolutivi.

L'evidenza scientifica sul ruolo chiave dei linfociti T  $\gamma\delta$  è stata dimostrata sin dal 1998, grazie a ricerche mirate allo studio di linfociti CD4+ e CD8+ e della sottopopolazione dei linfociti T  $\gamma\delta$ , sia V $\delta$ 1 sia V $\delta$ 2, potenti cellule effettrici in grado di differenziarsi in cellule antitumorali e antinfettive in presenza di un processo neoplastico o infiammatorio specifico.

Il progetto di ricerca proposto per il XXIV Ciclo del Dottorato di Ricerca in Oncologia Clinica e Molecolare è basato sullo studio dell'infiltrato linfocitario peritumorale e dei linfociti circolanti in pazienti affetti da melanoma cutaneo, nella caratterizzazione e nella sperimentazione di sostanze o agenti in grado di stimolare la loro innata capacità effettrice nei confronti del processo neoplastico avanzato.

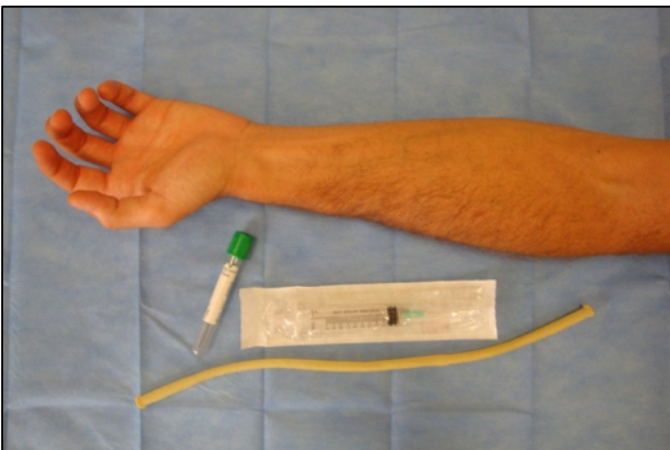


## MATERIALE E METODO

Presso il Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche ed Odontostomatologiche del Policlinico Universitario di Palermo una serie consecutiva di 114 pazienti affetti da melanoma maligno, durante il 2007 e il 2013, sono stati analizzati per studiare l'infiltrato linfocitario peritumorale (TIL), presente in una biopsia periferica al melanoma maligno, e dal prelievo ematico per lo studio dei linfociti circolanti.



**Figura 5** Immagine iconografica di una lesione melanocitica sospetta



**Figura 6** Immagine iconografica di prelievo ematico

Il progetto è basato sullo studio nel melanoma primario, ossia in fase di maggiore sviluppo neoplastico in quanto attivo e vivente nell'uomo prima dell'escissione chirurgica radicale che, come noto, riduce la mortalità e migliora la sopravvivenza globale.

Abbiamo analizzato entrambi i campioni di tessuto fresco congelato e del sangue periferico disponibili per la valutazione e la ricerca di questi specifici linfociti T  $\gamma\delta$ .

I primi dati sono stati realizzati su 74 pazienti (32 femmine e 42 maschi), che hanno subito un trattamento chirurgico per il melanoma primario, durante gli anni 2007-2010.

Un follow-up oncologico, dal 2007 al 2013, per più di 5 anni è stato eseguito, dopo l'intervento chirurgico di escissione radicale del melanoma, per controllare e diagnosticare eventuali recidive della neoplasia.

L'età media al momento dell'intervento era di 60 anni (range 26-80 anni). Tutti i soggetti inclusi erano volontari, godevano di buona salute e presentavano parametri di laboratorio nel range fisiologico. La diagnosi di melanoma è stata confermata istologicamente.

Nel gruppo di pazienti arruolati nello studio, i morfotipi del melanoma erano così suddivisi: melanomi a diffusione superficiale (46%), nodulare (35 %), lentiginoso acrale (5 %), lentigo maligna (3 %), spitzoide (3 %) e nevoide (1 %).

Tutti i pazienti sono stati diagnosticati come melanoma cutaneo primario e classificati secondo il nuovo sistema di stadiazione della American Joint Committee on Cancer Staging Melanoma.

Un campione di sangue è stato prelevato poco prima dell'escissione chirurgica.

Secondo la normativa italiana (art. 13 , DLgs n.196/03 ), questo studio non ha avuto bisogno di autorizzazione da parte del comitato etico locale ed è stato eseguito in conformità ai principi fondamentali della Dichiarazione di Helsinki. Tutte i pazienti hanno prestato il proprio consenso scritto a partecipare.

I nuovi dati su 114 pazienti affetti da melanoma cutaneo (46 femmine e 68 maschi), durante gli anni 2007-2013, sono stati studiati e seguiti, come follow-up oncologico per un

periodo di 5 anni dopo l'exeresi chirurgica per dimostrare la caratterizzazione, distribuzione, funzione e valore predittivo positivo dell'infiltrato linfocitario peritumorale nei melanomi cutanei. [2,4]

L'età media al momento dell'intervento era di 62 anni (range 26-82 anni). Soggetti sani sono stati i volontari in buone condizioni cliniche, e con parametri di laboratorio nel range fisiologico. La diagnosi di melanoma è stata confermata istologicamente.

### ***Isolamento delle cellule mononucleate del sangue***

Le cellule mononucleate del sangue (PBMC) sono state ottenute dalla centrifugazione secondo gradiente di densità utilizzando Ficoll - Hypaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svezia). Campioni di tessuto sono stati ottenuti da 114 diversi pazienti sottoposti a procedure chirurgiche standard di cura per il melanoma cutaneo, al momento della chirurgia primaria. Non ci sono state restrizioni, relative allo stadio oncologico ad esempio, sui tessuti inclusi eccetto la conferma diagnostica del melanoma con una revisione patologica con ematossilina ed eosina (H&E specimens) dal campione prelevato per la ricerca dei linfociti T  $\gamma\delta$ . Il tessuto è stato ottenuto fresco e immediatamente trasportato al laboratorio in soluzione salina sterile per l'elaborazione. Il tessuto è stato prima tagliato in piccoli frammenti per poi essere digerito enzimaticamente con collagenasi di tipo IV e DNAasi (Sigma, St. Louis, MO) per 1 ora a 37°C.

Dopo la digestione, le cellule estratte sono state lavate due volte in RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) e le cellule mononucleate infiltranti il tumore sono state ottenute dalla centrifugazione su gradiente di densità con Ficoll - Hypaque. Sia le cellule mononucleate del sangue (PBMC) che le cellule tumorali infiltranti (TILs) sono state colorate per la discriminazione tra cellule vive/morte con Invitrogen LIVE/DEAD kit viola di colorazione delle cellule morte (Invitrogen, Carlsbad, CA). Il blocco del recettore è stato

eseguito con l'immunoglobulina umana (Sigma, 3 mg / ml concentrazione finale) seguita dalla colorazione della superficie con differenti fluoro-cromo-coniugato anticorpi per studiare la composizione delle diverse sottopopolazioni.

L'isotiocianato di fluoresceina (FITC)-, ficoeritrina (PE)-, PE- Cy5- o allophycocyanin (APC)- anticorpi monoclonali coniugati (mAb) utilizzati per la caratterizzazione di tutta la popolazione sono stati i seguenti: anti-CD3 , anti-CD4 , anti-CD8 , anti-CD14, anti- CD19, anti-CD56, cd anti-pan TCR, anti-Vd1, anti-Vd2, anti- CD27 e anti-CD45RA , tutti acquistati da BD Biosciences ( Mountain View, CA).

Espressione di marcatori di superficie è stata determinata mediante citometria a flusso su un FACSCalibur o FACSCanto Il citometro a flusso con l'uso di software FlowJo (BD Biosciences). La strategia di gating ha coinvolto progressivamente la misurazione delle cellule totali; solo delle cellule vitali; dei linfo-monociti e tipi cellulari specifici. Per ogni campione di 100.000 cellule nucleate sono stati acquisiti i valori che sono espressi come percentuale del linfo-monociti vitali.

Valori di controllo negativo non sono stati sottratti, come gli sfondi mediani per anticorpi monoclonali isotipo-abbinato erano 0,0028% (range,0.000%-0,0063%). I campioni sono stati considerati positivi se il numero di celle pari o superiore a 0,01 % e almeno 10 eventi cluster erano evidenti. Questo valore di cut-off empirico è stato previsto per essere per il 90% diverso da quello di fondo. [49]

Le linee cellulari Policlonali V $\delta$ 1 + e V $\delta$ 2 + T sono stati generate dal tumore, con arricchimento infiltrante le cellule, utilizzando un kit T cd di isolamento cellulare (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germania), seguito dalla successiva classificazione nel singolo V $\delta$ 1+ e cellule T V $\delta$ 2+ attraverso un FACSAria (BD Biosciences) con anticorpi monoclonali specifici.

Le cellule estratte (26.103) sono state poi coltivate in ciascun pozzetto di round-fondo, piastre da 96 pozzetti contenenti 26.104 irradiate (40 Gy) allogeneico PBMC, 26.103

irradiate (70 Gy), le cellule EBV-trasformate B, 0,5 mg / ml PHA, e 200 U / ml interleuchina 2 ricombinante (Proleukin, Novartis Pharma, Basilea, Svizzera). Linee di crescita sono state ampliate in 200 U / ml di IL-2 e ristimolati ogni 2 settimane.

Le cellule sono state raccolte dopo 4-6 settimane di coltura per essere poi utilizzate per saggi funzionali in vitro.

La capacità di produzione di citochine di linee cellulari V $\delta$ 2 + T policlonale V $\delta$ 1 + è stata determinata dopo stimolazione con PMA ( BD Biosciences, 20 ng/ml) e ionomicina (BD Biosciences, 1 mM) per 24 h ad una concentrazione cellulare di 10<sup>6</sup>/ml.

Kit ELISA, per la rivelazione di IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , sono stati forniti da BD Pharmingen ed utilizzati secondo le raccomandazioni fornite dal produttore.

Le linee cellulari umane di melanoma maligno A375 crescono in adesione in Dulbecco Modified Eagle Medium (DME) con il 10 % FCS e sono state utilizzate come bersaglio in co-coltura linee cellulari T V $\delta$ 2 + ottenute da 8 pazienti affetti da melanoma policlonale V $\delta$ 1 +. Le cellule T V $\delta$ 1 + e V $\delta$ 2 +, risospese alle concentrazioni finali di 10<sup>6</sup> e 2,5610<sup>6</sup> cellule/ml, sono state aggiunte alle cellule A375 (16.10<sup>5</sup>) per ottenere i E: T ratio di 10:1 e 25:1. Co-culture sono state mantenute per 6 ore al 37°C in presenza del 5% di CO<sub>2</sub>.

In alcuni esperimenti, le cellule tumorali sono state pre-trattate durante la notte con Zoledronato (Novartis Pharma, Basilea, Svizzera, 5 mM concentrazione finale), prima dell'incubazione con linee cellulari T V $\delta$ 1 + o V $\delta$ 2 +.

Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate con PBS, colorate con 10 ml di annexina V FITC e 10 ml di soluzione di PI in 100 ml di tampone di legame 16 (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> e 25 mM) per 15 min a temperatura ambiente al buio, diluite in 400 ml 16 tampone di legame e immediatamente analizzate mediante FACS (10.000 eventi/campione) per stabilire il livello di cellule morte. I campioni sono stati acquisiti su un FACSCalibur e le cellule sono state identificate mediante scatter su cellule bersaglio A375 melanoma. La valutazione dell'attività citotossica è stata basata sul grado di riduzione di

cellule bersaglio vitali (VTC) analizzato attraverso l'espressione di annessina V e propidio ioduro (annexina V2 PI2).

L'analisi immunohistochimica è stata eseguita su campioni di melanoma in sezioni imbibite di paraffina dello spessore di 5 micron. I vetrini sono stati riscaldati per il recupero dell'antigene in 10 mM di citrato di sodio (pH 6,0). Dopo il lavaggio in dH<sub>2</sub>O, inibizione della perossidasi endogena è stata eseguita con 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 min). Dopo due lavaggi in TBS, i vetrini sono stati incubati con siero umano 10 % per 20 minuti in colorazione aspecifica. Dopo l'eliminazione del siero in eccesso, le sezioni sono state quindi esposte ad anticorpi specifici contro CD anti-umano TCR (topo purificato CD anti-umano TCR, IgG1, BD Pharmin- gen) o controlli isotipici - abbinato a diluizioni appropriate, durante la notte a 4°C. Poi le sezioni sono state lavate in TBS e incubate con anticorpo biotinilato anti-topo per 30 minuti a temperatura ambiente e trattate con streptavidina - perossidasi (Kit LSAB2, Dako). La colorazione è stata rivelata con substrato AEC e contro-coloranti con ematossilina. I controlli positivi per la colorazione cd TCR consistevano col normale tessuto linfonodale umano resecato per scopi diagnostici.

### **Analisi statistica**

La significatività tra i gruppi è stata determinata dal Test t di Student.

Pearson  $\chi^2$ , rapporto di verosimiglianza  $\chi^2$ , test statistico di Fischer e una analisi di regressione logistica sono stati applicati per confrontare l'effetto della fase del cancro sul tasso di recupero e la percentuale di cellule T  $\gamma\delta$ . Differenze tra sottogruppi con una probabilità di 0,05 sono state considerate statisticamente significative. Tutti i valori di p sono "two tailed" e tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il pacchetto software STATA.

## RISULTATI

I dati ottenuti su 114 pazienti affetti da melanoma cutaneo hanno dimostrato la presenza dei linfociti T  $\gamma\delta$  nella percentuale del 72,9%. Dati definitivi a 5 anni di controlli post-operatori ed oncologici sono in corso di elaborazione e revisione; il campione di pazienti è aumentato e nuove linee di ricerca sono state suggerite e analizzate.

Dai dati preliminari, le cellule immunitarie infiltranti il tumore sono state rilevate nel 72,9%, di 54 campioni di tessuto, prelevato da pazienti affetti da melanoma primario, e le loro sottopopolazioni sono state studiate. La maggior parte di cellule infiltranti il tumore era costituita da macrofagi (CD14+) essendo la popolazione cellulare predominante, mentre le cellule T CD3+ erano scarsamente rappresentate (4,3%).

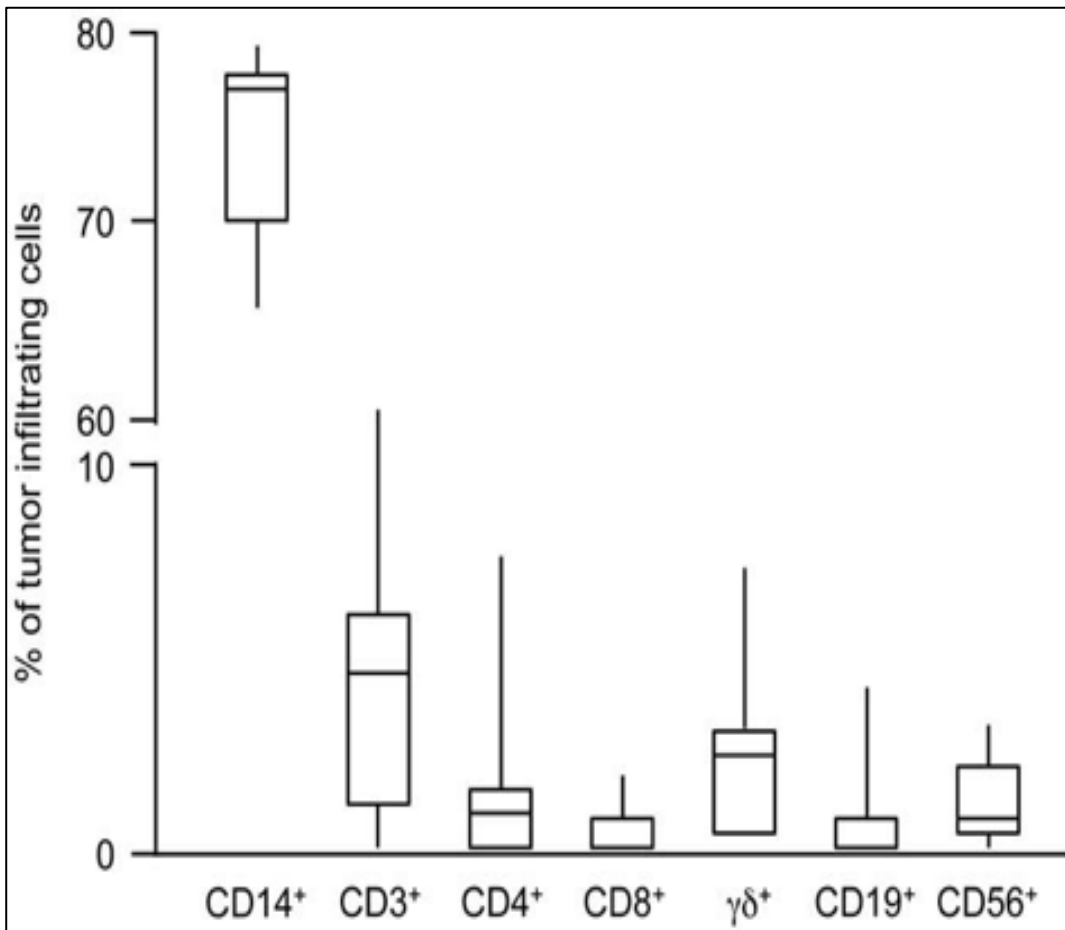
In questa serie di pazienti con melanoma primario, abbiamo identificato le cellule T  $\gamma\delta$ , come sottogruppo di linfociti maggiormente rappresentato, quasi il 50% dei linfociti T CD3+. Queste erano così divise, il maggiore infiltrato erano i linfociti T CD3+, mentre le cellule T V $\delta$ 1 e V $\delta$ 2 erano ugualmente rappresentati.

La maggior parte dei campioni biologici, prelevati da pazienti affetti da melanoma, sono infiltrati da cellule V $\delta$ 1 e  $\delta$ 2 con capacità di esporre una memoria effettrice o terminalmente differenziate con fenotipo memoria effettrice. Questo è indicativo di cellule che si trovano in corrispondenza, o si sono trasferite, al sito di infiammazione e visualizzano la funzione effettrice immediata.

La resa di linfociti T  $\gamma\delta$  isolati da lesioni del melanoma all'inizio era molto bassa e non permetteva degli studi dettagliati funzionali, da cui abbiamo generato un panel di V  $\delta$ 1 e  $\delta$ 2 V policlonale di linee cellulari T  $\gamma\delta$  a partire dalle cellule immunitarie infiltranti il tumore di 8 pazienti.

Tutte le linee cellulari di V  $\delta$ 1 e V $\delta$ 2 testate sono stati in grado di produrre citochine con attività antitumorale comprovata, come fattore di necrosi tumorale alfa (TNF $\alpha$ ) e

l'interferone gamma (IFN  $\gamma$ ) e di uccidere le cellule del melanoma in vitro, suggerendo che sia le cellule V $\delta$ 1 residenti e le cellule T V $\delta$ 2 recentemente migrati possono contribuire al controllo della crescita del tumore.



**Figura 7** Percentuali di cellule infiltranti il tumore (TILs) in pazienti con melanoma primitivo. I boxplot di percentuali di sottoinsiemi di cellule immunitarie in 74 pazienti affetti da melanoma. I box rappresentano 25 al 75 ° percentile. Bar Medio identifica mediana; i baffi mostrano minimo e massimo.

Grazie all'analisi dei differenti sottoinsiemi di linfociti localizzati attorno al margine del sito di crescita del tumore primario abbiamo identificato una sostanziale differenza nell'attività citotossica delle linee cellulari V  $\delta$ 1 e  $\delta$ 2. La maggior parte dei linee cellulari V $\delta$ 1 esercita



un potente effetto citotossico contro le linee cellulari di melanoma in vitro e poche linee di cellule T V  $\delta 2$  sono state in grado di uccidere tali obiettivi.

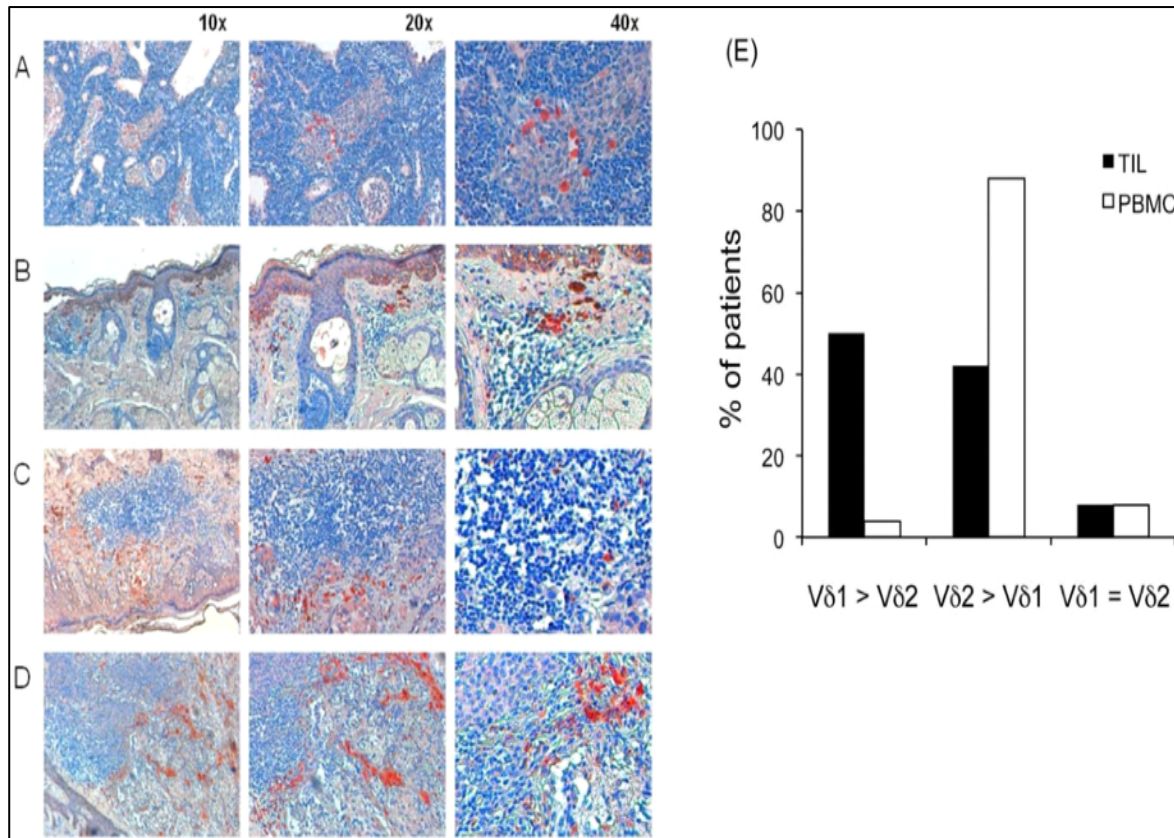
Nel nostro studio, concentreremo la nostra attenzione sulla presenza di cellule T  $\gamma\delta$ , ed in particolare dei sottoinsiemi V $\delta 2$ , tra le cellule immunitarie infiltranti il tumore, significativamente correlate con il melanoma in fase iniziale. Si tratta di una scoperta che potrebbe derivare, almeno in parte, dalla limitata efficacia della risposta immunitaria locale in fase di malattia avanzata.

Dopo l'asportazione chirurgica di 74 melanomi cutanei primari, le cellule immunitarie infiltranti il tumore sono state isolate solo in 54 di essi (72,9 %), e loro sottopopolazioni sono state studiate. Il maggior numero di infiltrato linfocitario di cellule immunitarie erano macrofagi (cellule CD14+), mentre le cellule CD3+ T sono risultate essere scarsamente rappresentate nei melanomi primari analizzati (4,3%). Le cellule T  $\gamma\delta$  isolate rappresentano il principale sottoinsieme dei linfociti essendo circa il 50% della popolazione totale CD3+. Da segnalare, tuttavia, che le cellule T  $\gamma\delta$  sono state trovate solo nel 70% dei pazienti con infiltrazione linfocitaria peritumorale reattiva. Le frequenze di cellule T CD4+ e CD8 + immunitarie infiltranti il tumore erano 37% e il 3% della popolazione CD3+, rispettivamente, e percentuali di linfociti B e NK non addirittura inferiori percentuali di cellule CD3+ (1,2 % sia per cellule CD19+ e CD56+). E' stata riscontrata altissima variabilità in percentuale di cellule recuperate dai campioni dei pazienti con melanoma testati, come rappresentato nella figura 7.

### ***Distribuzione e analisi fenotipica di cellule T $\gamma\delta$ infiltranti il melanoma***

Per valutare la distribuzione di cellule T  $\gamma\delta$  all'interno dei melanomi, abbiamo immunosaggiato sezioni di melanoma da 7 pazienti per pan- $\gamma\delta$  TCR. Come mostrato nella Figura 8, le cellule T  $\gamma\delta$  sono prevalentemente distribuite in periferia, indipendentemente dal fatto

che i pazienti avevano moderate (5 pazienti) o alte (2 pazienti) quantità di linfociti T  $\gamma\delta$  infiltranti il tumore.



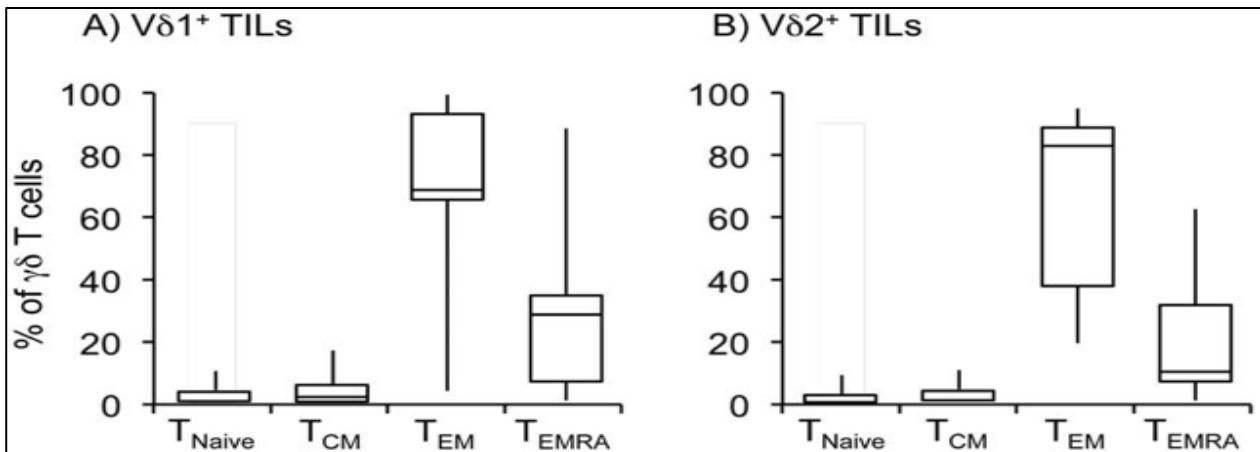
**Figura 8** Localizzazione e sottoinsieme del fenotipo delle cellule T  $\gamma\delta$ -melanoma infiltrante. (A-D) Immunoistochimica colorazione dei tessuti melanoma utilizzando anticorpi diretti contro il recettore  $\gamma\delta$  TCR, come rivelato da AEC (colorazione rossa). I nuclei sono rivelati da ematossilina (colorazione blu). (A) Esempio di colorazione linfonodo di  $\gamma\delta$  TCR, come controllo positivo. Sono rappresentati differenti istotipi di melanoma: melanoma intraepiteliale superficiale (B), melanoma a diffusione superficiale (C) e il melanoma nodulare ulcerato infiltrante il derma (D). Sono mostrati i melanomi con moderate quantità di livelli di cellule T  $\gamma\delta$  + linfociti infiltranti il tumore (B e C) e alta (D). In tutti i casi, le cellule T  $\gamma\delta$ + sono distribuiti in periferia dell'infiltrato. (E) Percentuale sul totale delle cellule T,  $\gamma\delta$  e dei loro sottoinsiemi V  $\delta$ 1 e V  $\delta$ 2 in TIL e PBMC di pazienti con melanoma.

Nel sangue periferico di individui adulti sani, la maggior parte delle cellule T  $\gamma\delta$  esprime il V  $\delta$ 2 TCR, mentre le cellule che trasportano V  $\delta$ 1 dominano tra cellule T  $\gamma\delta$  intraepiteliali. [32]

Le cellule T  $\delta$ 1+ dalla popolazione delle cellule T  $\gamma\delta$  infiltranti il melanoma è stata predominante in 23 pazienti (50%), mentre le cellule che esprimono V $\delta$ 2 hanno prevalso in 19 pazienti (42%); 4 pazienti (8%) avevano uguali percentuali di V $\delta$ 1 + e cellule V $\delta$ 2 (Figura 8). Questo dato non deriva da una distorsione nella popolazione di cellule T  $\gamma\delta$  generale nei pazienti con melanoma dal momento che il rapporto V $\delta$ 1 V $\delta$ 2 nel sangue periferico è basso e simile a quello trovato in individui sani.

Le cellule T  $\gamma\delta$  umane includono quelle con fenotipi Tnaive, CD45RA + CD27+, TCM e CD45RA<sup>2</sup>CD27+ risiedono negli organi linfoidi secondari; in mancanza di funzione immediata i fenotipi linfocitari effettori, quelli con effettori-memoria (TEM, CD45RA<sup>2</sup>CD27<sup>2</sup>) e quelli terminalmente differenziati (Temra, CD45RA + CD27<sup>2</sup>) raggiungono siti di infiammazione e assumono funzioni effettrici immediate come la produzione di citochine e l'attività citotossica.

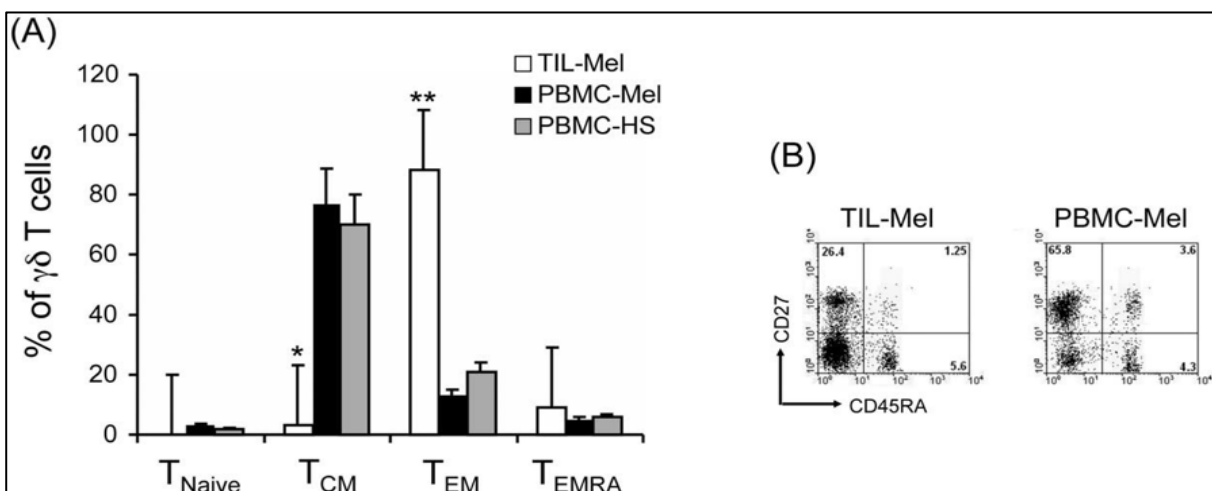
Abbiamo studiato la distribuzione dei sottoinsiemi delle cellule T infiltranti  $\gamma\delta$  memoria, valutando l'espressione di CD27 e CD45RA su V $\delta$ 1 + e le cellule V $\delta$ 2. L'analisi ha dimostrato, che la maggior parte delle cellule di melanoma infiltranti V $\delta$ 1 T aveva un fenotipo TEM (64,9%) e Temra (26,1 %), mentre Tnaive TCM rispettivamente il 2,3 % e 5,3 %, (Figura 9).



**Figura 9** Fenotipo delle cellule memoria ed effettrici Vδ1 e Vδ2 nell'infiltrato linfocitario peritumorale al melanoma, marcate con anticorpi monoclonali anti Vδ1, antiVδ2, antiCD45RA, e CD27. Percentuale dei linfociti Tnaive (CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>), T<sub>CM</sub> (CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), T<sub>EM</sub> (CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>2</sup>) and T<sub>EMRA</sub> (CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>2</sup>) determinati

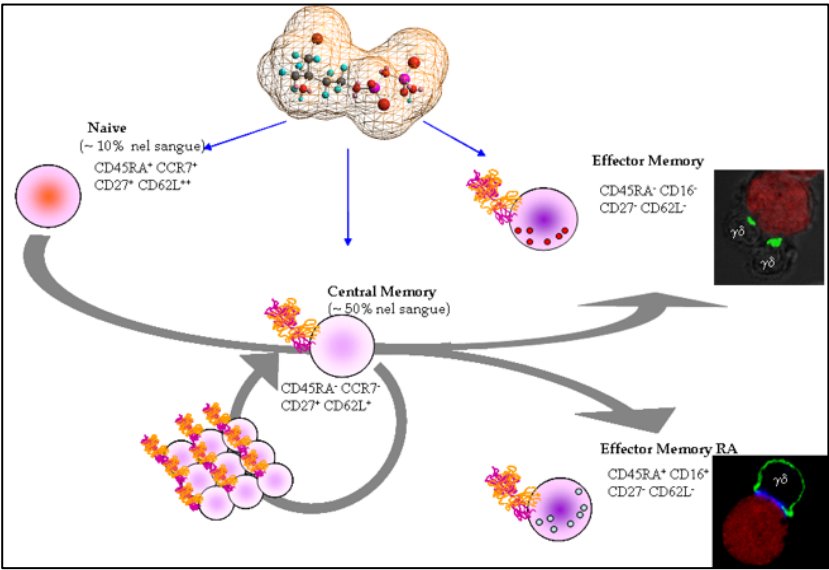
mediante analisi FACS.

Allo stesso modo, le cellule di melanoma infiltranti Vδ2 T erano prevalentemente TEM (84,5 %) e Temra (10,4 %), mentre le sottopopolazioni Tnaive e TCM rappresentavano il 1,2% e 3,7%, rispettivamente.



**Figura 10** Confronto delle linee cellulari T Vδ2 distribuite nell'infiltrato linfocitario peritumorale in pazienti affetti da melanoma e in pazienti sani.

Le sottopopolazioni dei linfociti T sono qui rappresentate in uno schema figurativo.



## PROSPETTIVE CLINICHE

Notevoli evidenze scientifiche indicano che il sistema immunitario gioca un ruolo chiave nella patogenesi del cancro e può contribuire a una progressione della malattia o a una inibizione della crescita tumorale purché si rispettino il meccanismo fisiologico e processi di riparazione cellulare; le cellule presenti nel nostro organismo sono infatti capaci di differenziarsi in cellule effettrici contro i processi neoplastici. [1-6]

Le lesioni tumorali per poter regredire devono essere marcatamente infiltrate dalle cellule mononucleari e la presenza di cellule T è stata associata a una prognosi migliore nei pazienti con diversi tipi di carcinomi [17-19]. Per quanto concerne questo studio, i pazienti con ricco infiltrato linfocitario in melanomi primitivi avevano un minor rischio di metastasi e di morte rispetto ai pazienti con raro infiltrato linfocitario o del tutto assente [ 2,4].

I linfociti T  $\gamma\delta$  sono importanti cellule effettrici del sistema immunitario che giocano un ruolo nella sorveglianza antitumorale in periferia.

Ad esempio, la cute del ratto ospita una grande popolazione di cellule T  $\gamma\delta$ , conosciute come cellule dendritiche epidermiche T (DETCs), che sembrano svolgere un ruolo critico nella sorveglianza del tumore, come evidenziato in topi carenti di cellule T  $\gamma\delta$  [31]. Tuttavia, non è nota la presenza di un analogo delle cellule DETCs nella cute umana, ed è quindi chiaro quali tipi di linfociti possano mediare le funzioni di sorveglianza immunitarie equivalenti.

I risultati mostrano che le cellule T sono la principale popolazione di linfociti infiltranti il melanoma, e le cellule  $V\delta 1 + e + V\delta 2$  sono quelle maggiormente coinvolte.

Questo risultato non è sorprendente poiché riassume le condizioni microambientali che si verificano in condizioni fisiologiche in vivo nell'uomo. Infatti, le cellule  $V\delta 1 + T$  sono una popolazione di cellule T  $\gamma\delta$  prevalente nei tessuti umani, tra cui l'epitelio intestinale e la cute [51]. Il nostro studio dimostra inoltre la presenza di cellule  $V\delta 2 + T$  tra cellule

immunitarie infiltranti il melanoma, che sono la principale popolazione di cellule T  $\gamma\delta$  in circa il 40% dei pazienti. Dato che le cellule  $V\delta 2 + T$  sono assenti dalla cute normale [51], la loro presenza nel contesto di melanoma è fortemente indicativa di un processo migratorio di queste dai tessuti sanguigni o linfatici. Di conseguenza, oltre il 90% delle cellule infiltranti il melanoma  $V\delta 2 + T$  hanno un fenotipo TEM e Temra, indicativo di cellule che sono presenti in siti di infiammazione e che hanno funzioni effettrici immediate come la produzione di citochine o l'attività citotossica [50]. Molto recentemente, un sottoinsieme distinto di cellule proinfiammatorie CLA+, le cellule T CCR6 +  $V\gamma 9V\delta 2$  sono state descritte per la loro capacità di essere rapidamente reclutate dal sangue al compartimento cutaneo [52], ma non abbiamo attualmente prove se le cellule  $V\gamma 9V\delta 2 T$  che infiltrano il melanoma appartengono a questo subset di cellule T  $\gamma\delta$ .

Al contrario, le cellule circolanti T  $V\delta 2 +$  dello stesso paziente hanno un fenotipo predominante TCM, simile a quello che si riscontra in soggetti sani, e che identifica le cellule che sono presenti negli organi linfoidi secondari, pur non manifestando immediata funzione effettrice.

Collettivamente, questi risultati indicano fortemente che mentre le cellule T  $V\delta 1 +$  possono essere attivate localmente nel microambiente tumorale, le cellule T  $V\delta 2 +$  sono molto probabilmente reclutate dal sangue periferico o da organi linfoidi secondari in virtù di un processo migratorio orchestrato da chemochine o altre molecole infiammatorie prodotte dal sito del tumore. Sia le cellule  $V\delta 1 +$  e le cellule  $V\delta 2 + T$  migrate possono contribuire a controllare la crescita del tumore, come suggerito dalla loro capacità di produrre citochine con attività antitumorale provata (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e di uccidere bersagli cellulari di melanoma in vitro. Differenze sostanziali sono state riscontrate nella capacità citotossica delle cellule T  $V\delta 1 +$  e  $V\delta 2 +$ . Mentre la maggior parte delle linee cellulari T  $V\delta 1 +$  esercita un'attività citotossica contro la linea cellulare di melanoma A375, solo due su otto sono state testate per essere in grado di agire su questo tumore. Inoltre, il trattamento con

zoledronato è stato in grado di sensibilizzare bersagli cellulari di melanoma per favorire la citotossicità delle cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

È stato dimostrato che il trattamento delle cellule tumorali con zoledronato porta all'accumulo intracellulare di fosfoantigeni (tipicamente IPP), favorendo così il riconoscimento e l'uccisione delle cellule tumorali da parte dei linfociti reattivi V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T [53,54, 55].

In questo studio, la presenza di cellule  $\gamma\delta$  tra le cellule immunitarie infiltranti il tumore è correlata a melanomi in fase iniziale (fase 0- I-II) e senza metastasi, come indicato dalla più elevata incidenza di cellule T  $\gamma\delta$  isolamento.

Degno di nota il fatto che le cellule  $\gamma\delta$  sono state trovati in minima percentuale, o del tutto assenti, nei pazienti in fase avanzata (stadio III e IV) e nei melanomi metastatici (71,9% non metastatico vs 29,4% metastatico); questo dato è stato particolarmente evidente per le cellule T V $\delta$ 2 che hanno mostrato una correlazione inversa con la fase di melanoma, una scoperta che potrebbe essere associata ad una scarsa efficacia della risposta immunitaria locale alle fasi avanzate di progressione tumorale.

Recenti studi hanno dimostrato una elevata frequenza di cellule T  $\gamma\delta$  tra TIL isolate in pazienti con differenti tipi di cancro, ma la rilevanza clinica di queste cellule T  $\gamma\delta$  intratumorale è sconosciuta.

In contrasto con il presente studio, le percentuali di cellule T  $\gamma\delta$  all'interno dei carcinomi a cellule renali non mostrano correlazione con tutte le caratteristiche prognostiche finora descritte [56]. Per quanto concerne i numeri di cellule T  $\gamma\delta$  intratumorali questi sono correlati positivamente con stadi del tumore avanzato, mentre lo stato di espressione di HER2 sembra essere inversamente correlato con la sopravvivenza libera da recidiva e la sopravvivenza globale dei pazienti con cancro mammario [57]. In realtà possiamo solo formulare ipotesi sulla discrepanza tra il melanoma e il cancro al seno. Le cellule  $\gamma\delta$



comprendono due grandi sottoinsiemi (V $\delta$ 1 e V $\delta$ 2) con differenti fenotipi memoria/effettrici ed eterogenee proprietà funzionali che possono essere individuate mediante l'uso di marcatori aggiuntivi (produzione di citochine, attività citotossica, proprietà migratorie); la correlazione quindi, positiva o negativa rispetto alla prognosi, può dipendere dal sottoinsieme  $\gamma\delta$  specifico assunto al sito del tumore. Inoltre, gli effetti netti biologici delle cellule T  $\gamma\delta$  possono dipendere dal tipo di tumore e dalla sua sede di insorgenza, probabilmente riflettendo differenze sostanziali nel microambiente cellulare.

L'analisi delle risposte dei linfociti infiltranti il tumore (TILs) nei confronti di antigeni tumorali è servita a definire molti dei parametri T pertinenti. L'immunoterapia cellulare adottiva con TIL ha raggiunto finora alcuni dei risultati di immunoterapia più notevoli [ 21], [58]. Ad esempio, alti tassi di risposta clinica sono stati ottenuti in pazienti affetti da melanoma metastatico con protocolli basati su TIL in combinazione con chemioterapia non-mieloablativa (ciclofosfamide e fludarabina) "lymphodepleting" immediatamente prima o aggiunto alla infusione di TIL e alte dosi di IL- 2 terapia [19], [21].

Il nostro studio mostra che le cellule T  $\gamma\delta$  si trovano nella maggior parte delle popolazioni di linfociti infiltranti-melanoma, e sono capaci di riconoscere e uccidere le cellule di melanoma, suggerendo che una risposta immunitaria naturale mediata da questi linfociti possa contribuire all'immunosorveglianza del melanoma maligno. Tali osservazioni potrebbero favorire lo sviluppo di nuove terapie alternative adjuvanti di targeting cellule T  $\gamma\delta$  per il trattamento dei pazienti affetti da melanoma. Ciò può essere ottenuto ad esempio stimolando le cellule T  $\gamma\delta$  in questi pazienti mediante iniezione di zoledronato e IL - 2, come recentemente mostrato dal nostro gruppo nei carcinomi prostatico e mammario [59], [60].

In alternativa, un buon risultato potrebbe essere ottenuto mediante trasferimento adottivo "ex vivo" di cellule T  $\gamma\delta$  autologhe espanse derivate da pazienti affetti da cancro [61], [62].

Sia le cellule T  $\gamma\delta$  sia il trasferimento cellulare e l'infusione di bifosfonati hanno dimostrato di essere ben tollerati [59], [62].

## **CONCLUSIONE**

Nel 1998, la "American Joint Committee on Cancer (AJCC) Melanoma" comitato di gestione temporanea, che comprendeva esperti provenienti da Nord America, Europa e Australia, ha sviluppato un database quale primo ausilio utile nella gestione integrata dei dati prospettici accumulati provenienti da diversi centri e gruppi cooperativi.

L'analisi di questo database ha provocato le maggiori revisioni al sistema di stadiazione Tumor-Nodes-Metastases (TNM) che si riflette nel 6 ° edizione AJCC Cancer Staging Manual pubblicato nel 2002. Più di recente, l'analisi da parte della commissione di un database sul melanoma aggiornato, comprendente i dati prospettici di oltre 50.000 pazienti, ha portato a revisioni pubblicate nella 7 ° edizione AJCC Cancer Staging Manual pubblicato nel 2009. I dati provenienti dalla National Comprehensive Cancer Network guidelines 2012 NCCN dimostrano i diversi trattamenti terapeutici sistemici che risultano essere poco efficaci in pazienti con stadio avanzato.

In conclusione, si può ipotizzare che l'espansione in vitro di cellule T  $\gamma\delta$  e la successiva infusione di queste cellule con zoledronato, in combinazione con altri agenti antitumorali, può essere di beneficio clinico significativo nel trattamento del melanoma. Questo riscontro può, a sua volta, consentire un prolungamento della sopravvivenza dei pazienti affetti da melanoma.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1-** Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, Gulotta G, Moschella F, Cordova A, Gulotta E, Salerno A, Dieli F. Aminobiphosphonates as new weapon for gamma delta T cell based on immunotherapy of cancer. 15(12), 1147-53. *Curr Med Chem* 2008
- 2-** Francesco Dieli, Giorgio Stassi, Matilde Todaro, Serena Meraviglia, Nadia Caccamo and Adriana Cordova. Distribution, function and predictive value of tumor-infiltrating gamma delta T lymphocytes. *Oncoimmunology* 2:4, e23434, April 2013
- 3-** Caccamo N, Todaro M, Sireci G, Meraviglia S, Stassi G, Dieli F. Mechanics underlying lineage commitment and plasticity of human gamma delta cells. *Cell Mol Immunol* 2013, 10, 30-4
- 4-** Adriana Cordova, Francesca Toia, Carmela La mendola, Valentina Orlando, Serena Meraviglia, Gaetana Rinaldi, Matilde Todaro, Giuseppe Cicero, Leonardo Zichichi, Paolo Li Donni, Nadia Caccamo, Giorgio Stassi, Francesco Dieli, Francesco Moschella. Characterization of Human gamma delta T lymphocytes Infiltrating Primary Malignant Melanomas. *Plos One November 2012*
- 5 -** Caccamo Nadia, La mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Todaro M, et al. Differentiation, phenotype and function of interleukine-17 producing human Vgamma9Vdelta2 T cells. 2011 *Blood* 118, 129-138.
- 6-** Meraviglia S, Eberl M, Vermijlen, Todaro M, Buccheri S. In vivo manipulation of Vgamma delta T cells with zolendronate and low dose of IL -2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. 2010 *Clin Exp Immunol* 161, 290-97.
- 7-** Paxton V. Dickson, Jeffrey E. Gershenwald. Staging and Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2011 January; 20(1), 1-17

- 8-** Barth A, Wanek LA, Morton DL. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases [see comments]. *Journal of the American College of Surgeons*. 1995; 181:193. [[PubMed: 7670677](#)]
- 9-** Unger JM, Flaherty LE, Liu PY, et al. Gender and other survival predictors in patients with metastatic melanoma on Southwest Oncology Group trials. *Cancer*. 2001; 91:1148. [[PubMed: 11267960](#)]
- 10** - Speeckaert R, van Geel N, Vermaelen KV, Lambert J, Van Gele M, et al. Immune reactions in benign and malignant melanocytic lesions: lessons for immunotherapy. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 334–344. (2011) [[PubMed](#)]
- 11** - Kalialis LV, Drzewiecki KT, Klyver H (2009) Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res* 19: 275–282. [[PubMed](#)]
- 12** - Ceballos PI, Barnhill RL (1993) Spontaneous regression of cutaneous tumors. *Adv Dermatol* 8: 229–261. [[PubMed](#)]
- 13** - Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, et al. (1996) Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77: 1303–1310. [[PubMed](#)]
- 14** - Rao UN, Lee SJ, Luo W, Mihm MC Jr, Kirkwood JM (2010) Presence of tumor infiltrating lymphocytes and a dominant nodule within primary melanoma are prognostic factors for relapse-free survival of patients with thick (t4) primary melanoma: pathologic analysis of the e1690 and e1694 intergroup trials. *Am J Clin Pathol* 133: 646–653. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 15** - Atkins MB, Kunkel L, Sznol M, Rosenberg SA (2000) High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *Cancer J Sci Am* 6: S11–S14. [[PubMed](#)]

- 16** - Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, et al. (2006) Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol* 24: 4738–4745. [[PubMed](#)]
- 17**- Sasada T, Suekane S (2011) Variation of tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers: controversy on clinical significance. *Immunotherapy* 3: 1235–1251. [[PubMed](#)]
- 18** - Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW (2011) The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer* 105: 93–103. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 19**- Cipponi A, Wieers G, van Baren N, Coulie PG (2011) Tumor-infiltrating lymphocytes: apparently good for melanoma patients. But why? *Cancer Immunol Immunother* 60: 1153–1160. [[PubMed](#)]
- 20**- Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, et al. (2002) Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298: 850–854. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 21**- Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, et al. (2005) Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23: 2346–2357. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 22**- Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, et al. (2008) Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 26: 5233–5239. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 23**- Weber J (2008) Overcoming immunologic tolerance to melanoma: targeting CTLA-4 with ipilimumab (MDX-010). *Oncologist* 13: 16–25. [[PubMed](#)]
- 24**- Ribas A (2008) Overcoming immunologic tolerance to melanoma: targeting CTLA-4 with tremelimumab (CP-675,206). *Oncologist* 13: 10–5. [[PubMed](#)]

- 25-** Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, et al. (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363: 711–723. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 26-** Blank C, Gajewski TF, Mackensen A (2005) Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 54: 307–314. [[PubMed](#)]
- 27-** Berger R, Rotem-Yehudar R, Slama G, Landes S, Kneller A, et al. (2008) Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 14: 3044–3051. [[PubMed](#)]
- 28-** Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, et al. (2010) Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28: 3167–3175. [[PubMed](#)]
- 29-** Romero P, Dunbar PR, Valmori D, Pittet M, Ogg GS, et al. (1998) Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 188: 1641–1650. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 30-** Nishimura MI, Avichezer D, Custer MC, Lee CS, Chen C, et al. (1999) MHC class I-restricted recognition of a melanoma antigen by a human CD4+ tumor infiltrating lymphocyte. *Cancer Res* 59: 6230–6238. [[PubMed](#)]
- 31-** Hayday AC (2009)  $\gamma\delta$  T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* 31: 184–196. [[PubMed](#)]
- 32-** Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, et al. (1989) Human lymphocytes bearing T cell receptor  $\gamma/\delta$  are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* 169: 1277–1294. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]

- 33** - Bonneville M, O'Brien RL, Born WK (2010)  $\gamma\delta$  T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 10: 467–478. [[PubMed](#)]
- 34** - Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, et al. (1994) Stimulation of human  $\gamma\delta$  T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 264: 267–270. [[PubMed](#)]
- 35** - Eberl M, Hintz M, Reichenberg A, Kollas AK, Wiesner J, et al. (2003) Microbial isoprenoid biosynthesis and human  $\gamma\delta$  T cell activation. *FEBS Lett* 544: 4–10. [[PubMed](#)]
- 36** - Tanaka Y, Morita CT, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR (1995) Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human  $\gamma\delta$  T cells. *Nature* 375: 155–158. [[PubMed](#)]
- 37** - Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, et al. (2003) Human T cell receptor  $\gamma\delta$  cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* 197: 163–168. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 38** - Kistowska M, Rossy E, Sansano S, Gober HJ, Landmann R, et al. (2008) Dysregulation of the host mevalonate pathway during early bacterial infection activates human  $\gamma\delta$  TCR cells. *Eur J Immunol* 38: 2200–220. [[PubMed](#)]
- 39** - Sireci G, Espinosa E, Di Sano C, Salerno A, Fournié JJ, et al. (2001) Differential activation of human  $\gamma\delta$  T cells by nonpeptide phosphoantigens. *Eur J Immunol* 31: 1628–1634. [[PubMed](#)]
- 40** - Guo RT, Cao R, Liang PH, Ko TP, Chang TH, et al. (2007) Bisphosphonates target multiple sites in both cis- and trans-prenyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10022–10027. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 41** - Vermijlen D, Ellis P, Langford C, Klein A, Engel R, et al. (2007) Distinct cytokine-driven responses of activated blood  $\gamma\delta$  T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy. *J Immunol* 178: 4304–4314. [[PubMed](#)]
- 42** - Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D (2001) Differentiation of resting human peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol* 212: 110–117. [[PubMed](#)]

- 43-** Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Todaro M, et al. (2011) Differentiation, phenotype and function of interleukin-17-producing human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. *Blood* 118: 129–138. [[PubMed](#)]
- 44-** Meraviglia S, Caccamo N, Salerno A, Sireci G, Dieli F (2010) Partial and ineffective activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells by Mycobacterium tuberculosis-infected dendritic cells. *J Immunol* 185: 1770–1776. [[PubMed](#)]
- 45-** Eberl M, Roberts GW, Meuter S, Williams JD, Topley N, et al. (2009) A rapid crosstalk of human  $\gamma\delta$  T cells and monocytes drives the acute inflammation in bacterial infections. *PLoS Pathog* 5: e1000308. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 46-** Caccamo N, Battistini L, Bonneville M, Poccia F, Fournié JJ, et al. (2006) CXCR5 identifies a subset of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production. *J Immunol* 177: 5290–5295. [[PubMed](#)]
- 47-** Bansal RR, Mackay CR, Moser B, Eberl M (2012) IL-21 enhances the potential of human  $\gamma\delta$  T cells to provide B-cell help. *Eur J Immunol* 42: 110–119. [[PubMed](#)]
- 48-** Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, et al. (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 27: 6199–6206. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 49-** Motulsky H (1995) Choosing an appropriate sample size. *Intuitive Biostatistics* 199–200. Oxford Univ. Press, New York.
- 50-** Dieli F, Poccia F, Lipp M, Sireci G, Caccamo N, et al. (2003) Differentiation of effector/memory V $\delta$ 2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med* 198: 391–397. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 51-** Ebert LM, Meuter S, Moser B (2006) Homing and function of human skin  $\gamma\delta$  T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J Immunol* 176: 4331–4336. [[PubMed](#)]



- 52-** Laggner U, Di Meglio P, Perera GK, Hundhausen C, Lacy KE, et al. (2011) Identification of a novel proinflammatory human skin-homing V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell subset with a potential role in psoriasis. *J Immunol* 187: 2783–2793. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 53-** Li J, MJ Herold, B Kimmel, I Müller, B Rincon-Orozco, et al. (2009) Reduced expression of the mevalonate pathway enzyme farnesyl pyrophosphate synthase unveils recognition of tumor cells by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. *J Immunol* 182: 8118–8124. [[PubMed](#)]
- 54-** Benzaïd I, Mönkkönen H, Stresing V, Bonnelye E, Green J, et al. High phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors promote V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-cell chemotaxis and cytotoxicity in vivo. *Cancer Res* 71: 4562–4572. [[PubMed](#)]
- 55-** Scotet E, LO Martinez, E Grant, R Barbaras, P Jenö, et al. (2005) Tumor recognition following V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* 22: 71–80. [[PubMed](#)]
- 56-** Inman BA, X Frigola, KJ Harris, SM Kuntz, CM Lohse, et al. (2008) Questionable relevance of  $\gamma\delta$  T lymphocytes in renal cell carcinoma. *J Immunol* 180: 3578–3584. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 57-** Ma C, Q Zhang, J Ye, F Wang, Y Zhang, et al. . (2012) Tumor-Infiltrating  $\gamma\delta$  T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. *J Immunol* 189 (published online 3 October 2012). [[PubMed](#)]
- 58-** Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10: 909–915. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- 59-** Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, Caccamo N, Meraviglia S, et al. (2007) Targeting human  $\gamma\delta$  T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 67: 7450–7457. [[PubMed](#)]
- 60-** Meraviglia S, Eberl M, Vermijlen D, Todaro M, Buccheri S, et al. (2010) In vivo manipulation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for

immunotherapy of advanced breast cancer patients. Clin Exp Immunol 161: 290–297.

[\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#)

**61-** Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, Rolland F, Philip I, et al. (2008) Phase-I study of Innacell  $\gamma\delta$ , an autologous cell-therapy product highly enriched in  $\gamma\delta 2$  T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. Cancer Immunol Immunother 57: 1599–1609. [\[PubMed\]](#)

**62-** Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Osaka Y, Nakazawa H, et al. (2007) Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using  $\gamma\delta$  T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. Cancer Immunol Immunother 56: 469–476. [\[PubMed\]](#)

## ELENCO DI FIGURE E TABELLE

**Figura 1** Immagine rappresentativa dei Linfociti T  $\gamma\delta$

**Figura 2** Immagine schematica della via metabolica del mevalonato e del riconoscimento dei Linfociti T  $\gamma\delta$ .

**Figura 3** Immagine rappresentativa dei Linfociti T  $\gamma\delta$

**Figura 4** Schema rappresentativo della via del mevalonato e del meccanismo d'azione sia delle statine sia dei bifosfonati.

**Figura 5** Immagine iconografica di una lesione melanocitica sospetta

**Figura 6** Immagine iconografica di prelievo ematico

**Figura 7** Percentuali di cellule infiltranti il tumore (TILs) in pazienti con melanoma primitivo.

**Figura 8** Localizzazione e sottoinsieme del fenotipo delle cellule T  $\gamma\delta$ -melanoma infiltrante

**Figura 9** Fenotipo delle cellule memoria ed effettrici V $\delta$ 1 e V $\delta$ 2 nell'infiltrato linfocitario peritumorale al melanoma

**Figura 10** Confronto delle linee cellulari T V $\delta$ 2 distribuite nell'infiltrato linfocitario peritumorale in pazienti affetti da melanoma e in pazienti sani.