

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Immunologia, Immunopatologia
Sperimentale e Comparata

Ciclo XXIV

ATTIVAZIONE DELLA RISPOSTA LINFOCITARIA
NATURAL KILLER IN SEGUITO AL TRATTAMENTO DI
TERMOABLAZIONE DI NODULI DI
EPATOCARCINOMA

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Attilio CORRADI

Tutor:
Chiar.mo Prof. Attilio CORRADI

Dottorando: Alessandro ZERBINI

INDICE

1) Riassunto	pag. 3
2) Introduzione	pag. 5
✓ <u>Epidemiologia ed Eziologia del Carcinoma Epatico Primitivo</u>	
✓ <u>Diagnosi e Stadiazione</u>	
✓ <u>Terapia dell'epatocarcinoma Primitivo</u>	
✓ <u>Termoablazione con Radiofrequenza</u>	
✓ <u>Immunità e Tumori</u>	
✓ <u>Termoablazione con Radiofrequenza e Risposta Immunitaria verso il Tumore</u>	
✓ <u>Linfociti Natural Killer</u>	
3) Scopo	pag. 27
4) Materiali e Metodi	pag. 28
✓ <u>Pazienti</u>	
✓ <u>Trattamento</u>	
✓ <u>Conta delle sottopopolazioni linfocitarie periferiche</u>	
✓ <u>Isolamento delle cellule linfo-mononucleate da sangue periferico (PBMC)</u>	
✓ <u>Isolamento delle cellule Natural Killer</u>	
✓ <u>Fenotipizzazione delle cellule Natural Killer e dei linfociti T regolatori</u>	
✓ <u>Analisi dell'espressione di Ki-67</u>	
✓ <u>Test di Citotossicità</u>	
✓ <u>Valutazione dell'espressione di CD107a</u>	
✓ <u>Saggio di citotossicità mediata da anticorpi (ADCC)</u>	
✓ <u>Produzione di IFN-γ da parte delle cellule Natural Killer</u>	
✓ <u>Determinazione dei livelli di IL-15 e HSP-70 sierici</u>	
✓ <u>Analisi statistiche</u>	
5) Risultati	pag. 37
✓ <u>Il trattamento di termoablazione è associato ad un aumento dei linfociti Natural Killer circolanti</u>	
✓ <u>Valutazione della capacità proliferativa dei linfociti Natural Killer</u>	
✓ <u>Valutazione dell'espressione dei recettori di attivazione delle cellule NK in seguito a termoablazione con radiofrequenza</u>	
✓ <u>Aumento della citotossicità NK-mediata dopo termoablazione con radiofrequenza</u>	
✓ <u>Aumento della Citotossicità Cellulare Mediata da Anticorpi (ADCC) dopo termoablazione con radiofrequenza</u>	

- ✓ Aumento della produzione di IFN- γ da parte delle cellule NK dopo termoablazione con radiofrequenza
- ✓ Valutazione dei livelli di Interleuchina 15 e di HSP-70 sierici
- ✓ Analisi della frequenza dei linfociti T regolatori dopo termoablazione con radiofrequenza
- ✓ Parametri clinici e caratterizzazione fenotipica e funzionale delle cellule NK
- ✓ Aumento della citotossicità e della produzione di IFN- γ e tempo alla recidiva

6) Discussione pag. 59

7) Bibliografia pag. 63

RIASSUNTO

Premesse: Il carcinoma epatico primitivo (HCC) costituisce il quinto tipo più comune di tumore maligno nel mondo e la terza fra le cause di morte da neoplasie. La frequenza di HCC è particolarmente elevata in Asia ed in Africa, tuttavia il profilo epidemiologico sta cambiando a causa della stretta correlazione con l'infezione cronica da virus dell'epatite B (HBV) e C (HCV).

La prognosi dell'HCC è migliorata negli ultimi anni grazie ai progressi diagnostici che hanno favorito l'individuazione di tumori allo stadio precoce e quindi la possibilità di ricorso a terapie curative.

Fra le varie opzioni terapeutiche, oltre al trapianto di fegato ed alla resezione chirurgica, negli ultimi anni si stanno sempre più sviluppando tecniche ablativo locali e fra queste, in particolare, la termoablazione con radiofrequenza (RFA), una tecnica minimamente invasiva utilizzata come terapia locale standard per il carcinoma epatocellulare e come seconda linea di trattamento per i tumori epatici metastatici.

Il trattamento di RFA distrugge il tessuto tumorale tramite produzione di calore generando uno stato di necrosi coagulativa localizzata a cui segue un'importante risposta infiammatoria causata principalmente dal rilascio di heat shock proteins (HSPs) e di citochine pro-infiammatorie quali TNF- α e interferoni di tipo I.

Studi precedenti hanno dimostrato come il trattamento di termoablazione sia in grado di generare stimoli infiammatori capaci di potenziare la risposta T linfocitaria specifica per antigeni tumorali ed hanno anche evidenziato un possibile effetto sulla risposta innata ed in particolare sulla risposta linfocitaria Natural Killer (NK).

Scopo di questo studio è stato quello di analizzare l'effetto della termoablazione sul comportamento dei linfociti NK. Sono state, inoltre, analizzate le importanti implicazioni dell'effetto immunomodulante della termoablazione sulla storia naturale dell'HCC, in relazione anche a possibili futuri sviluppi in senso immunoterapeutico.

Metodi: Lo studio ha coinvolto 37 pazienti portatori di uno o più noduli di HCC sottoposti a RFA; la risposta Natural Killer è stata analizzata mediante isolamento delle

cellule linfomononucleate da sangue periferico (PBMC), conta delle sottopopolazioni linfocitarie, isolamento dei linfociti NK e caratterizzazione fenotipica e funzionale di queste cellule. Si sono inoltre valutate le variazioni delle concentrazioni su sangue di citochine coinvolte nella normale omeostasi delle cellule Natural Killer e le frequenze e fenotipi dei linfociti T regolatori.

Risultati e conclusioni: Lo studio ha evidenziato un aumento, sia in termini percentuali che assoluti, dei linfociti NK a seguito del trattamento di termoablazione. Tali cellule hanno mostrato un'aumentata espressione dei recettori di attivazione parallelamente a una riduzione di quelli inibitori e marcata attivazione funzionale con amplificazione della attività citotossica (diretta e mediata da anticorpi) e della produzione di interferone- γ . Non è stata rilevata, invece, alcuna variazione significativa delle concentrazioni sistemiche di IL-15 e HSP-70, né alcuna influenza dei linfociti T regolatori (CD4+/CD25+/FoxP3+) su espansione e attivazione delle cellule Natural Killer.

L'aumentata capacità citotossica e di produzione di Interferone- γ sembra correlare sul piano clinico con una maggiore durata della sopravvivenza libera da malattia, suggerendo un ruolo attivo di queste cellule nel controllo della patologia neoplastica.

I risultati ottenuti possono essere rilevanti per lo sviluppo di strategie di immunoterapia adiuvante che abbiano come scopo il potenziamento della risposta NK contro i tumori.

In particolare, il potenziamento della risposta citotossica anticorpo-dipendente (ADCC) suggerisce la possibilità di sviluppare terapie innovative basate sulla combinazione della termoablazione di lesioni epatiche, non solo primitive ma anche metastatiche, e di anticorpi monoclonali antitumorali, già ampiamente utilizzati nella pratica clinica.

INTRODUZIONE

EPIDEMIOLOGIA ED EZIOLOGIA DEL CARCINOMA EPATICO PRIMITIVO

Il carcinoma epatico primitivo (Hepatocellular Carcinoma, HCC) costituisce il quinto tipo più comune di tumore maligno al mondo e la terza fra le cause di morte da neoplasie (1,2). Ogni anno tale tumore viene diagnosticato in più di mezzo milione di persone nel mondo, con circa 20.000 nuovi casi negli Stati Uniti. 1 (3,4). L'Italia occupa una posizione intermedia per tassi di incidenza e mortalità e l'epatocarcinoma rappresenta la settima causa di morte per tumore, con circa 5.000 decessi annui, ossia circa il 3% delle morti per tumore. Le più alte incidenze di malattia sono a carico dei paesi del sud-est asiatico e dell'Africa sub-sahariana in cui l'infezione da virus dell'epatite B è endemica (5). In queste aree, lo stato di portatore di HBV inizia nel periodo infantile con la trasmissione verticale del virus da parte di madri infette, fatto che conferisce nell'età adulta un rischio di HCC aumentato di circa 200 volte.

Nei paesi occidentali dove l'HBV non è prevalente, il carcinoma epatico primitivo si sviluppa in oltre il 90% dei casi su un fegato cirrotico, di solito nel contesto di altre malattie epatiche croniche, in particolare in pazienti affetti da infezione cronica da HCV (6). Negli ultimi venti anni, l'incidenza dell'epatocarcinoma negli Stati Uniti è più che triplicata (4). Sulla base di questo aumento e di quanto è già stato osservato in Giappone (7), per i prossimi anni è ragionevole prevedere che in Europa e negli Stati Uniti si possa assistere ad una ulteriore rapida crescita del numero dei soggetti affetti da HCC.

Oltre che ai virus epatitici, che rendono conto della stragrande maggioranza dei casi di epatocarcinoma, la cirrosi e, conseguentemente l'HCC, possono associarsi a numerose altre condizioni, quali l'emocromatosi, il deficit di α_1 -antitripsina, la malattia di Wilson, la tirosinemia, la cirrosi biliare primitiva e, soprattutto, l'abuso di alcool. Altri possibili fattori eziologici sono rappresentati dalle epatiti autoimmuni e le condizioni di

insulino-resistenza, come il diabete mellito, la steatoepatite non alcolica (NASH) e la patologia del fegato grasso non alcolico (NAFLD).

Per quanto riguarda l'azione diretta e indipendente di HBV e HCV nella epatocarcinogenesi, le evidenze sono numerose e i meccanismi complessi e solo in parte noti. Sono esemplificativi in questo senso la capacità del DNA di HBV di integrarsi nel DNA cellulare e indurre il fenomeno della "mutagenesi inserzionale", che non sembra tuttavia rappresentare una modalità prevalente di trasformazione neoplastica (8, 9); o ancora il ruolo di diverse proteine virali (HBx di HBV, le proteine Core e NS5a di HCV) nel modulare fattori trascrizionali, proto-oncogeni, fattori di crescita, fino all'inattivazione di geni oncosoppressori quali p53, pRB e altri ancora (10, 11).

Ciò che rende particolarmente importante l'epidemiologia dell'epatocarcinoma primitivo non è soltanto la dimensione numerica del problema, quanto il fatto che esso è, dopo il tumore del polmone, notoriamente associato al tabacco, una delle neoplasie le cui cause sono meglio definite, perciò, almeno in linea teorica, più immediatamente prevenibili.

La prognosi dei pazienti affetti da HCC fino a circa vent'anni fa era inferiore ad 1 anno per la maggior parte dei pazienti in quanto diagnosticati in stadio avanzato di malattia. Attualmente oltre il 30-40% delle diagnosi di HCC sono relative ad uno stadio precoce di malattia che permette di intervenire con un trattamento radicale in grado di registrare un tasso di sopravvivenza del 50-70% a 5 anni nei pazienti con buona funzione epatica (12). Quindi la identificazione dell'HCC in stadio precoce costituisce un obiettivo clinico prioritario nei pazienti a rischio.

Tuttavia la frequenza di recidiva rimane molto alta, con circa il 40% dei pazienti trattati che sviluppano recidiva tumorale entro un anno dal trattamento (13). Ciò è probabilmente imputabile allo sviluppo tumorale multifocale nel contesto del fegato

cirrotico e alla precoce invasione micro vascolare osservata anche in noduli di ridotte dimensioni (14).

Ad oggi restano comunque numerosi i casi di pazienti con HCC in stadio intermedio e avanzato per i quali non è possibile intervenire con un trattamento curativo radicale per motivi quali diagnosi tardiva, insorgenza multifocale della patologia, spiccata tendenza alla recidiva e all'andamento progressivo nei soggetti precedentemente trattati.

DIAGNOSI E STADIAZIONE

La diagnosi di epatocarcinoma si basa sulla combinazione di dati clinici, laboratoristici, strumentali e anatomopatologici (15).

Di fronte al riscontro di un nodulo epatico si procede con la caratterizzazione, a meno che il suo diametro sia inferiore ad 1 cm, poiché in questo caso, per il basso rischio di malignità e l'inadeguatezza delle metodiche d'immagine, si opta per uno stretto monitoraggio.

L'ecografia, in modo particolare l'esame eco-contrastografico, rappresenta la metodica di prima istanza per la diagnosi precoce di HCC e viene attuata seguendo precisi protocolli di sorveglianza nei soggetti con cirrosi epatica (16, 17). Esiste infatti una corrispondenza piuttosto precisa tra natura del nodulo e caratteristiche eco-contrastografiche, per cui nel passaggio da nodulo di rigenerazione a nodulo displastico a basso grado, a nodulo displastico ad alto grado, ad epatocarcinoma, si assiste alla progressiva scomparsa degli spazi portalì e allo sviluppo del microcircolo arterioso, elemento chiave per la diagnosi.

TC spirale e RM dinamica, oltre ad essere necessarie come esami di conferma nei noduli con dimensioni comprese tra 1 e 2 cm, trovano applicazione nella stadiazione intraepatica dell'epatocarcinoma (18), non consentendo l'ecografia con mezzo di contrasto l'esplorazione completa del parenchima epatico durante la breve fase arteriosa.

La biopsia epatica transcutanea si rende necessaria esclusivamente nel caso in cui all'esame eco-contrastografico e/o alla TC o alla RM non si evidenzi il tipico pattern vascolare, richiedendosi quindi una conferma istologica.

L'alfa-fetoproteina è l'unico marker sierologico comunemente usato nella diagnosi, ma ha una scarsa sensibilità che varia dal 39% al 65% e una specificità tra il 76% e il 97% (19); tale variabilità è legata ai differenti cut-offs utilizzati nei diversi studi. Per valori superiori a 500 µg/l può essere considerata un efficace marker tumorale, tuttavia la percentuale di pazienti con valori così elevati è piuttosto bassa; livelli inferiori si possono riscontrare, oltre che nell'HCC, in caso di metastasi di grosse dimensioni da neoplasie gastriche o del colon e in alcuni pazienti affetti da epatite acuta o cronica.

L'indicazione al tipo di trattamento si basa sulla stadiazione della malattia; tuttavia tale indicazione deve tenere conto non solo dello stadio della neoplasia, ma anche della funzione epatica associata. Esistono diversi sistemi di stadiazione che tengono in considerazione sia le caratteristiche del tumore che lo stadio dell'epatopatia, tra i quali il Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) risulta essere il più accreditato ed utilizzato (12). La stadiazione secondo il sistema BCLC definisce 4 stadi: A precoce, B intermedio, C avanzato e D terminale. Le terapie curative risultano indicate solo per lo stadio A, mentre negli stadi B e C il trattamento assume carattere palliativo e nello stadio D viene indicata la terapia sintomatica e di supporto.

TERAPIA DELL'EPATOCARCINOMA PRIMITIVO

Le strategie terapeutiche dell'HCC vengono convenzionalmente suddivise in curative e palliative. I trattamenti curativi sono eseguiti con l'obiettivo di indurre una risposta clinica completa nella maggior parte dei pazienti e di migliorarne la sopravvivenza. I trattamenti palliativi invece sono eseguiti con l'obiettivo di indurre una citoriduzione della neoplasia in grado di determinare risposte cliniche non necessariamente complete, ma che possono comunque rallentare il decorso spontaneo e migliorare la sopravvivenza. I trattamenti curativi sono indicati per i soli pazienti in stadio A e

comprendono il trapianto di fegato, la resezione chirurgica e le tecniche ablativo locali (1).

HCC è l'unica neoplasia solida in cui il trapianto ortotopico svolge un ruolo terapeutico significativo, ma la scarsa disponibilità di organi e la rigidità dei criteri di inclusione dei pazienti rendono possibile l'esecuzione del trapianto di fegato in un numero di casi relativamente esiguo. A prescindere dal trapianto, la resezione chirurgica costituisce il trattamento curativo di prima scelta.

Le indicazioni alla resezione sono tuttavia anch'esse limitate dalla patologia epatica su cui origina l'HCC, poiché il difetto di funzionalità del fegato cirrotico limita la massa epatica resecabile, le complicanze della cirrosi possono facilmente instaurarsi nel post-operatorio ed i difetti emocoagulativi sono una caratteristica costante della insufficienza epatica. Per questa serie di motivi i pazienti che possono giovare della resezione chirurgica sono purtroppo una minoranza rispetto alla quota di soggetti che necessita di un trattamento curativo.

La introduzione delle tecniche ablativo locali ha offerto una ulteriore opzione terapeutica meno invasiva rispetto alla resezione chirurgica tradizionale (20). In particolare, negli ultimi anni la termoablazione con radiofrequenza (RFA) (altrimenti definita termoablazione interstiziale a radiofrequenza o RITA) ha avuto una diffusione considerevole, dimostrando una efficacia che può competere persino con la resezione chirurgica (21). La termoablazione con radiofrequenza è una tecnica invasiva, ma non altrettanto demolitiva come la chirurgia, che presenta il vantaggio sostanziale di essere eseguibile in un più ampio gruppo di soggetti. In generale, la termoablazione con radiofrequenza è una procedura sicura e ben tollerata che può essere applicata anche in più di una seduta per rendere completa l'ablazione del tessuto tumorale in relazione alle dimensioni ed alla multifocalità delle lesioni. La indicazione alla RFA è costituita quindi dal trattamento di lesioni epatiche maligne di dimensioni inferiori a 6 cm di diametro che non risultano aggredibili chirurgicamente in relazione alla collocazione della lesione, alla multifocalità, o alla inadeguatezza della funzione epatica residua per la coesistenza di una cirrosi (22, 23).

Il carcinoma epatico è scarsamente responsivo alle chemioterapie convenzionali. Ad oggi, l'unico farmaco registrato per il trattamento di HCC è rappresentato dal Sorafenib un inibitore multichinasico attivo per via orale che agisce come agente anti-proliferativo e anti-angiogenetico. In monoterapia, sorafenib prolunga la sopravvivenza e ritarda il tempo alla progressione nei pazienti con epatocarcinoma avanzato che non sono candidati a trattamenti potenzialmente curativi o alla chemioembolizzazione transarteriosa (24).

TERMOABLAZIONE A RADIOFREQUENZA

Negli ultimi anni la termoblazione a radiofrequenza (RFA) ha avuto una diffusione considerevole (25), dimostrando una efficacia che può competere con la resezione chirurgica (26) e che si sta dimostrando migliore rispetto alla tradizionale introduzione intralasionale di alcol (21).

L'impiego della termoblazione nel trattamento dei tumori epatici sfrutta l'effetto necrotizzante esercitato dal calore sui tessuti biologici. E' noto, infatti, che temperature di 43-45°C producono un danno reversibile degli enzimi cellulari che diviene irreversibile per tempi di esposizione superiori ai 25 minuti (27). L'entità della lesione è tanto più evidente nei tessuti ad alto grado di proliferazione come i tumori. Temperature superiori ai 60°C determinano in pochi minuti una necrosi coagulativa dei tessuti, mentre a temperature superiori a 100°C si verificano rapidamente fenomeni di evaporazione e successiva carbonizzazione. L'ipertermia della lesione tumorale può essere indotta mediante diverse fonti di energia, quali le onde a radiofrequenza, le microonde e il laser. Queste tecniche prevedono l'introduzione di un ago-elettrodo o di una fibra laser all'interno della neoplasia per indurre l'effetto termico. Le onde a radiofrequenza (RF) comprendono una banda di radiazioni elettromagnetiche suddivise in onde a bassa frequenza (<300 kHz), a media frequenza (<3 MHz), ad alta frequenza (<300 MHz) e microonde (2.500 MHz). Solitamente si utilizzano generatori con una frequenza di 480-500 kHz. In un circuito elementare monopolare, l'elettrodo attivo è costituito dall'estremità dell'ago posto all'interno della lesione epatica, mentre l'elettrodo dispersivo è costituito da una piastra posta sulla superficie cutanea della

coscia. L'elettrodo, cioè la punta esposta dell'ago, determina il passaggio di una corrente alternata al tessuto circostante con agitazione degli ioni e conseguente riscaldamento resistivo del tessuto.

Studi condotti su tessuto epatico e muscolare, hanno identificato i fattori che influenzano l'estensione dell'area di necrosi, che risulta correlata al diametro dell'ago-elettrodo, alla lunghezza della punta esposta e alla durata dell'applicazione dell'energia termica e, in ultima analisi, alla temperatura media locale ottenuta durante la procedura (28). Una necrosi ottimale viene ottenuta con temperature comprese fra i 70 e i 95°C, mentre per temperature superiori ai 100°C si verificano fenomeni di carbonizzazione del tessuto, che comportano un aumento eccessivo dell'impedenza tessutale, limitando conseguentemente la trasmissione di energia termica e l'area di necrosi. Per aumentare l'area di necrosi, sono stati sperimentati diversi accorgimenti tecnici, alcuni dei quali rivolti ad aumentare la superficie radiante quali: a) l'infissione di elettrodi multipli (29), b) l'impiego di due elettrodi con tecnica bipolare (30), c) l'impiego di aghi provvisti di uncini che fuoriescono dalla punta dell'ago all'interno del tumore (31) (figura 1), d) l'impiego di elettrodi con tre aghi coassiali (*cluster*) distanziati di 5 mm uno dall'altro (32).

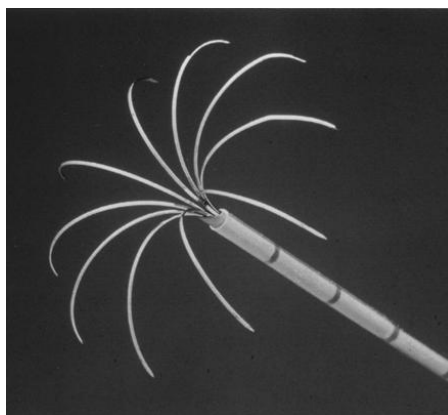


Figura 1: Immagine di un ago provvisto di uncini prodotto da Radiotherapeutics, Mountain View, CA.

La conducibilità elettrica e termica del tessuto tumorale può essere aumentata mediante l'infusione di soluzione fisiologica all'interno del tumore durante il trattamento. Questa procedura si è dimostrata in grado di produrre sperimentalmente lesioni superiori a 5,5 cm (33), tuttavia presenta lo svantaggio di determinare un focolaio di necrosi di forma irregolare e di estensione difficile da prevedere (34). Per prevenire i fenomeni di carbonizzazione e il conseguente aumento dell'impedenza tessutale, è stata proposta l'applicazione di corrente RF pulsata, che aumenta la dissimulazione di energia termica nel tessuto attorno all'elettrodo mediante brevi periodi di dissipazione del calore (35).

Fra le tecniche di termoablazione, la più utilizzata è quella che impiega le radiofrequenze come sorgente di energia termica, per una serie di vantaggi operativi riconducibili essenzialmente alla possibilità di trattare efficacemente una lesione tumorale mediante l'infissione di un singolo ago. La procedura di termoablazione con radiofrequenze viene eseguita, solitamente, introducendo l'ago-elettrodo per via percutanea sotto guida ecografia.

E' peraltro possibile effettuare la manovra anche sotto guida TC o RM, pur risultando tali modalità più complesse e costose senza offrire vantaggi oggettivi. Nel corso della manovra, eseguita sotto guida ecografica, si produce una nuvola iperecogena dovuta ai fenomeni di vaporizzazione, che tende a mascherare talvolta i confini della lesione e non fornisce indicazioni precise sull'estensione della necrosi (figura 2).

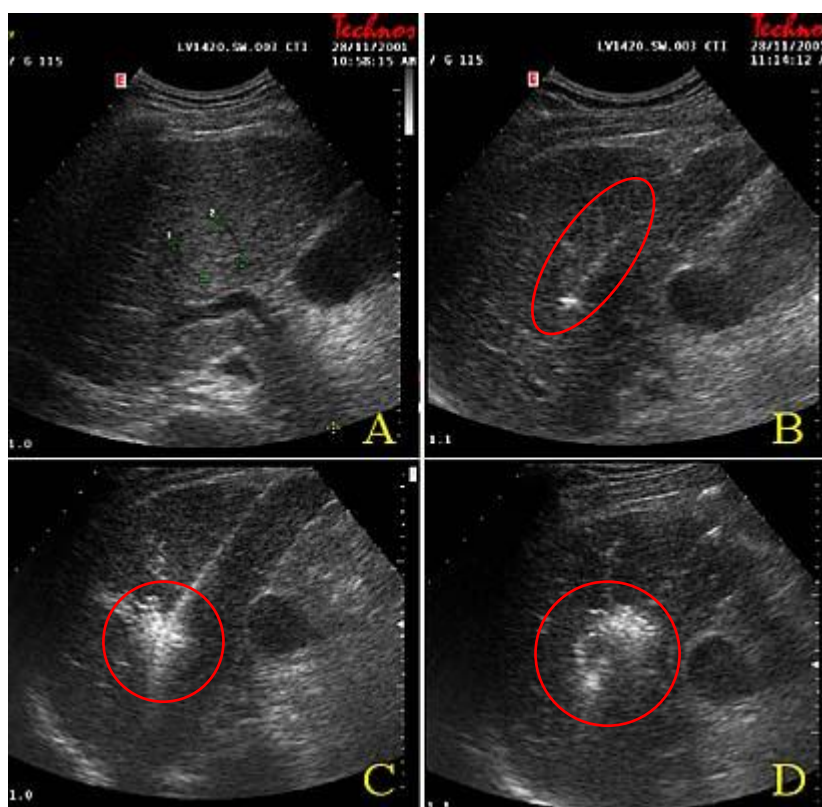


Figura 2: Trattamento di termoablazione di piccolo nodulo di epatocarcinoma del lobo destro epatico. Una volta identificata la lesione da trattare (A), l'ago-elettrodo viene inserito al suo interno sotto guida ecografica (B) e si attiva successivamente il generatore di radiofrequenze: durante il trattamento i fenomeni di vaporizzazione associati all'effetto termico determinano la formazione di un'area iperecogena (C) che si estende progressivamente a tutto il nodulo.

Nel caso di lesioni di dimensioni maggiori, che richiedano posizionamenti multipli dell'ago, esso deve essere inserito inizialmente nelle porzioni più profonde e, quindi, retratto nella parte più superficiale del tumore per evitare che la modificazione dell'aspetto ecografico determinata dal trattamento mascheri le porzioni residue del tumore da trattare. Il paziente viene sottoposto a una sedazione cosciente con Fentanyl o Midazolam somministrati per via endovenosa, modulata in base alla tolleranza alla manovra. Raramente, nel caso di lesioni grandi o di ridotta tolleranza al dolore, si ricorre all'anestesia generale. Le dosi di energia e i tempi di applicazione vengono adattati sulla base delle dimensioni della lesione e delle modificazioni dell'impedenza tissutale, che, se troppo elevata, produce quei fenomeni di carbonizzazione che impediscono la diffusione del calore e l'estensione della necrosi. Per tumori di dimensioni fino a 3 cm di diametro si utilizzano solitamente correnti di

1.000-1.500 mA con tempi di esposizione di 8-12 minuti. Il controllo dell'efficacia del trattamento viene effettuato solitamente mediante TC spirale con mezzo di contrasto o RM, effettuate a distanza di un mese.

IMMUNITA' E TUMORI

La crescita dei tumori maligni è condizionata in larga parte dalla capacità delle cellule tumorali di proliferare ed invadere i tessuti dell'ospite metastatizzando in siti distanti dal luogo di origine sottraendosi ai meccanismi di difesa dell'ospite. La possibilità di ottenere l'eradicazione dei tumori tramite risposte immunitarie specifiche ha stimolato una massa enorme di lavoro, dando origine alla branca dell'immunologia definita come immunologia dei tumori.

L'idea che il sistema immunitario sia in grado di controllare e combattere l'insorgenza dei tumori è oggetto di discussione da più di un secolo. Nel 1909 Paul Erlich per primo ipotizzò che il sistema immunitario potesse proteggere l'organismo dallo sviluppo di tumori, che altrimenti sarebbero stati molto più frequenti (36). Nel 1959 Thomas suggerì che la principale funzione delle cellule del sistema immunitario fosse quella di difendere l'organismo dalle malattie neoplastiche mantenendo così l'omeostasi cellulare dello stesso (37).

La forma più radicale di teoria del controllo immune si deve a Burnet, nel corso degli anni '70 e sotto la spinta della scoperta dei meccanismi immunologici del rigetto dei trapianti da parte dei linfociti T, ed è nota come "teoria dell'immunosorveglianza" (39). Burnet ipotizzò che i meccanismi di rigetto, estremamente precisi ed efficienti, fossero in realtà deputati all'eliminazione delle cellule potenzialmente neoplastiche. Così coniò il termine "sorveglianza immunologica" per definire la capacità dell'ospite di riconoscere tempestivamente i cloni cellulari maligni emergenti, in modo da distruggerli prima che la massa tumorale possa raggiungere dimensioni critiche.

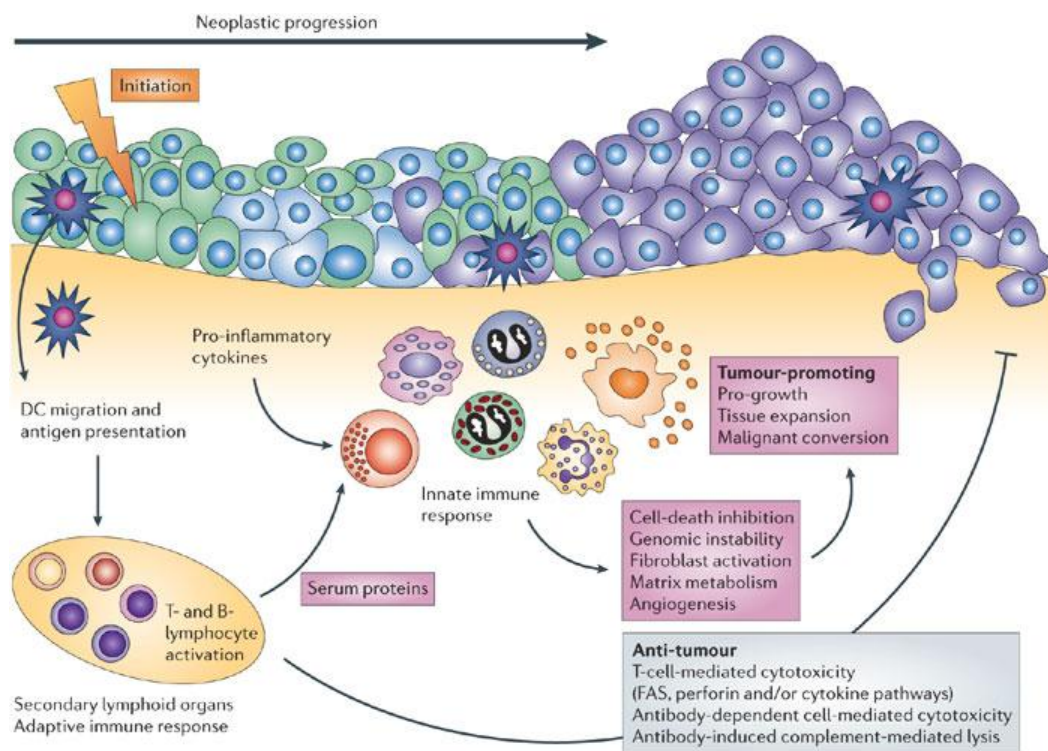
Tra il 1970 e il 1990 la scoperta delle cellule Natural Killers (NK) comportò un notevole entusiasmo per la possibilità che queste potessero funzionare da cellule effettrici dei processi di immunosorveglianza (40).

Tra il 1994 e il 1998 due importanti scoperte rinnovarono l'interesse nei confronti del processo di immunosorveglianza. Primo, si dimostrò che la produzione endogena di interferon γ (INF γ) proteggeva l'ospite dalla crescita di tumori trapiantati e dalla formazione di neoplasie spontanee o indotte. Utilizzando il trapianto di tumore, si dimostrò che i fibrosarcomi crescevano più rapidamente e più efficacemente nei topi trattati con anticorpi monoclonali neutralizzanti INF γ (41). Secondo, si osservò che i topi (129/SvEv) con deficit nella sintesi di perforina sviluppavano più facilmente tumori chimicamente indotti rispetto alla controparte wilde-type. La perforina è una proteina contenuta nei granuli intracellulari dei linfociti T e delle cellule NK e possiede una importante funzione nell'eliminazione di diverse cellule target tra cui le cellule neoplastiche (41, 42). Questi studi non solo definivano l'importanza di un controllo immunitario sullo sviluppo dei tumori ma suggerivano anche l'esistenza di una doppia componente, innata e acquisita, nell'ambito dell'immunosorveglianza. Deficit genetici, immunochimici o funzionali di NK, delle cellule natural killer T (NKT), dei linfociti T $\gamma\delta$, dei linfociti T $\alpha\beta$, INF γ o dell'interleuchina 12 (IL12) conducevano ad un'aumentata suscettibilità dell'ospite allo sviluppo di tumori; tra i diversi studi, uno in particolare concentrava l'attenzione sulla popolazione dei linfociti T che giocano un importante ruolo nell'immunosorveglianza: il contributo determinato dai linfociti T $\gamma\delta$ e dai linfociti T $\alpha\beta$ era supportato dall'evidenza che topi con deficit nella sintesi della catena β o della catena δ del T cell receptor (TCR) mostravano un'aumentata incidenza di fibrosarcomi e carcinomi spinocellulari rispetto alla controparte wilde-type (43). Questi risultati suggerirono che l'immunosorveglianza è rappresentata da un processo eterogeneo richiedente l'intervento di diversi effettori del sistema immunitario in relazione al tipo di cellule da cui origina il tumore, dal meccanismo di trasformazione, dalla localizzazione anatomica e dai meccanismi immunologici di riconoscimento.

I tumori, esprimono antigeni riconosciuti dal sistema immunitario, ma la maggior parte di essi ha solo debole immunogenicità e le risposte dell'ospite non sono in grado di prevenire o contrastare la crescita della neoplasia. La maggior parte dei tumori

esprime, infatti, solo pochi antigeni riconoscibili come non-self ed inoltre la rapida crescita e diffusione del tumore può travolgere le capacità di difesa del sistema immunitario (44) (figura 3).

Le risposte immunitarie capaci di distruggere le cellule tumorali coinvolgono principalmente i linfociti T citotossici CD8+ (CTL), le cellule NK e i macrofagi attivati. Gli antigeni tumorali riconosciuti dai CTL sono i principali induttori dell'immunità anti-tumorale e ne rappresentano il bersaglio primario (44). Tali antigeni comprendono il prodotto di forme mutate di oncogeni e di altri geni cellulari (es. mutazioni di *Ras*, iperespressione di *Her-2/Neu*), proteine normali la cui espressione sia sregolata od aumentata nelle cellule tumorali (es. MAGE, AFP, BAGE, NY-ESO-1) e prodotti di virus oncogeni (es. antigene T del Virus SV40) (45).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Figura 3: Modello della risposta innata ed adattativa durante lo sviluppo della neoplasia. da Visser KE et al. (2006) *Paradoxical roles of the immune system during cancer development* Nat. Rev. Cancer. **6**: 24–37.

L'immunosorveglianza si configura, quindi, come un processo eterogeneo che richiede l'azione di diversi effettori immuni, in maniera dipendente dal tipo cellulare tumorale di origine, dal meccanismo di trasformazione, dalla localizzazione anatomica del tumore e dal riconoscimento immunologico prevalente (46).

Studi recenti dimostrano come il concetto dell'immunosorveglianza, inteso inizialmente come un processo di protezione dell'ospite, agente solo nelle fasi precoci della comparsa del tumore, sia in realtà riduttivo. Il sistema immunitario sembra infatti avere un duplice effetto, in alcuni casi di protezione e di controllo della crescita tumorale, ma in altri casi può essere in grado di selezionare varianti tumorali con un fenotipo più aggressivo, varianti che metastatizzano e sfuggono definitivamente al controllo immunitario, in maniera simile a quanto avviene con virus, batteri e parassiti. Tale concetto viene definito "*cancer immunoediting*" e ha recentemente assorbito la teoria dell'immunosorveglianza; considera la dinamicità dei molteplici eventi che avvengono durante i cambiamenti genetici e fenotipici della cellula trasformata a cui segue una continua modulazione della risposta immunitaria nelle varie fasi della malattia (figura 4) (44, 45, 47).

Esperimenti con tumori trapiantabili in topi parentali ("wild-type") o RAG-2^{-/-}, hanno mostrato che i tumori sviluppati in assenza di un sistema immunitario intatto sono più immunogenici di tumori cresciuti in ospiti immunocompetenti (48). Linfomi derivati da topi perforina^{-/-} crescono rapidamente se trapiantati su altri topi perforina^{-/-}, ma venivano invece rigettati se trapiantati su topi wild-type (49). L'ambiente immunologico, quindi, seleziona varianti tumorali che hanno maggiori possibilità di sopravvivere in un ospite immunocompetente, per la ridotta immunogenicità o perché hanno acquisito meccanismi di evasione o soppressione del sistema immunitario. Questo processo è favorito dall'instabilità genetica intrinseca delle cellule tumorali e la selezione interessa soprattutto i geni codificanti per antigeni tumorali, per componenti del complesso maggiore di istocompatibilità o per componenti della via di segnalazione del recettore per l'IFN- α (50). Verosimilmente il rimodellamento immunologico del

tumore avviene continuamente, anche se gli effetti maggiori di quest'azione si hanno nelle fasi precoci di crescita, quando il tumore è istologicamente, ma non clinicamente rilevabile. L'immunogenicità dei tumori che vengono diagnosticati, quindi, risulta già modificata dall'interazione con il sistema immunitario, il quale non solo protegge l'individuo dallo sviluppo dei tumori, ma agisce anche sottoponendo il tumore ad una pressione selettiva che ne altera le caratteristiche primarie, talvolta generando tumori più aggressivi.

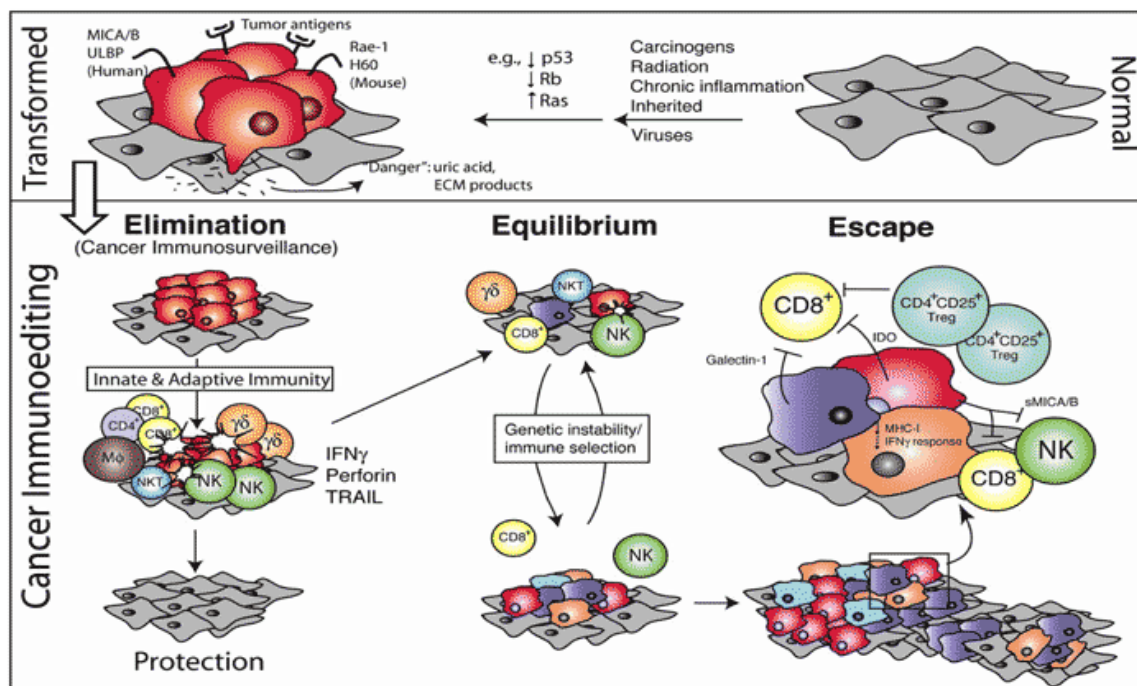


Figura 4 : Le tre fasi del processo di *immunoediting* dei tumori. Quando il tumore è individuato dal sistema immunitario, il suo destino finale dipende dal fatto che questo: a) venga eliminato dall'azione protettiva del sistema immunitario dell'ospite, b) sia mantenuto in uno stato di equilibrio, c) riesca a sfuggire dal controllo rendendosi scarsamente immunogenico o tramite la sintesi di molecole immunosoppressive. da Dunn G: et al. *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting* Immunity 2004, 21: 137-148

L'evasione è una diretta conseguenza delle alterazioni delle cellule tumorali, che riguardano soprattutto i meccanismi di elaborazione e presentazione antigenica o la via di segnalazione del recettore per IFN-γ.

In questa fase, le cellule tumorali che hanno acquisito la capacità di eludere il controllo da parte del sistema immunitario, possono emergere e dare origine ad una massa tumorale in crescita.

L'evasione delle cellule tumorali può avvenire attraverso diversi meccanismi (51, 52) che riducono, da una parte, il riconoscimento e l'eliminazione degli antigeni tumorali ("tumor ignorance") ed attivano, dall'altra, la capacità delle cellule neoplastiche di ostacolare le funzioni protettive del sistema immunitario.

La ridotta espressione di antigeni tumorali rappresenta uno dei meccanismi di evasione dal controllo immunitario meglio studiati e può avvenire principalmente attraverso tre vie:

- (i) attraverso la selezione di cellule tumorali che hanno perso gli antigeni maggiormente immunogenici,
- (ii) attraverso la perdita o riduzione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità deputate alla presentazione degli antigeni tumorali ai linfociti T tumore-specifici,
- (iii) attraverso l'inibizione della funzione di processazione dell'antigene necessaria per la produzione dell'epitopo antigenico e il suo posizionamento all'interno della molecola MHC di classe I.

Tali alterazioni sono il risultato della combinazione fra l'instabilità genetica propria delle cellule tumorali e il processo di immunoselezione. (53, 54). Il risultato finale è la generazione di varianti cellulari attraverso un processo di generazione Darwiniana che diventano invisibili al sistema immunitario e hanno la capacità di aumentare progressivamente.

In alternativa l'evasione può risultare dall'instaurarsi di una condizione immunosoppressiva nell'ambito del microambiente tumorale (55). Le cellule tumorali possono promuovere lo sviluppo di tale stato attraverso la produzione di citochine immunosoppressive quali vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- β (TGF- β), galectina-1, IDO (indoleamina 2,3-diossigenasi) (56) e/o reclutando cellule regolatorie con funzioni immunosoppressive (57).

I linfociti t regolatori (Treg cells) e le cellule soppressive di derivazione mieloide (MDSCs) rappresentano i due più importanti tipi di popolazioni leucocitarie ad azione immunosoppressive che giocano un ruolo chiave nell'inibizione della risposta protettiva antitumorale.

I linfociti Treg sono linfociti CD4⁺ che esprimono in modo costitutivo CD25 e il fattore di trascrizione Foxp3; quando stimolate, inibiscono la funzione dei linfociti T tumore-specifici e dei linfociti Natural Killer per mezzo della produzione di citochine immunosoppressive quali IL-10 e TGF- β ; o esprimendo le molecole costimolatorie negative CTLA-4, PD-1, e PD-L1, o ancora, tramite il consumo di IL-2 citochina essenziale per il mantenimento delle funzioni dei linfociti T citotossici. La deplezione di queste cellule *in vivo*, mediante l'impiego di anticorpi anti-CD25 (PC61), aumenta l'immunosorveglianza mediata da CTL tumore-specifici, CD4⁺ e cellule NK, induce il rigetto di diversi tumori immunogenici in vari ceppi murini ed aumenta l'efficacia di vaccini anti-tumoral (58).

Le cellule mieloidi soppressive (MDSC), invece, inibiscono la funzionalità linfocitaria attivando le cellule Treg cells; producendo TGF- β ; sequestrando gli aminoacidi arginina, triptofano o cisteina richiesti per la funzionalità linfocitaria. Tali cellule sono inoltre in grado di sintetizzare ossido nitrico che può regolare negativamente le proteine coinvolte nella segnalazione intracellulare.

Nei linfociti T l'ossido nitrico agisce bloccando la fosforilazione, e quindi l'attivazione, di proteine coinvolte nelle tre principali vie di segnalazione del recettore per l'IL-2 (JAK/STAT, Ras/MAPK, fosfoinositolo 3-chinasi/Akt), quali JAK1, JAK3, STAT5, ERK e AKT (59).

Il tumore può inoltre impiegare a suo vantaggio i meccanismi atti a controllare la attivazione del sistema immunitario e ad indurre tolleranza verso le cellule T autoreattive, ad esempio, inducendo un differenziamento alterato delle cellule dendritiche (DC) in fenotipi più immaturi non funzionali (iDC). In pazienti affetti da tipi diversi di tumore è stata riscontrata una notevole diminuzione delle DC ed una prevalenza, tra queste, di fenotipi immaturi che esprimono livelli bassi o nulli di molecole costimolatorie (CD80, CD86). Un numero ridotto di cellule presentanti l'antigene (APC) rende la stimolazione immune poco efficace e la presenza di iDC, che non forniscono un adeguato segnale costimolatorio alle cellule T, può provocare anergia dei linfociti T. È stato proposto che diversi fattori derivanti dal tumore, tra cui

VEGF, IL-10, IL-6 e M-CSF, attivando costitutivamente il fattore trascrizionale STAT3 ed inibendo NF- κ B (nuclear factor κ B), siano responsabili di questo blocco maturativo delle DC che contribuisce alla soppressione di risposte immuni tumore-specifiche (60).

Il concetto del "*Cancer Immunoediting*" ci fornisce quindi una visione dinamica dell'interazione tra sistema immunitario e tumore, tale per cui le cellule tumorali sottoposte alla pressione selettiva del sistema immunitario tendono a selezionare patrimoni genetici codificanti caratteristiche fenotipiche via via sempre più aggressive, capaci alla fine di sfuggire al controllo del sistema stesso. Questa caratteristica deve esser sempre tenuta presente nell'iniziare qualsiasi approccio immunoterapico e soprattutto nel giudicare l'efficacia dell'approccio stesso.

TERMOABLAZIONE CON RADIOFREQUENZA E RISPOSTA IMMUNITARIA VERSO IL TUMORE

Il trattamento di termoaablazione con radiofrequenza (RFA) può generare stimoli infiammatori in grado di fornire i segnali di "pericolo" al sistema immune per attivare la risposta T linfocitaria diretta verso antigeni di natura tumorale. Studi nel modello animale (61, 62) hanno mostrato un aumento della risposta cellulo-mediata antitumorale in seguito a termoaablazione intraepatica associata a un ricco infiltrato T cellulare in corrispondenza delle lesioni trattate. Queste osservazioni indicano che l'applicazione di calore e il tessuto necrotico generato di conseguenza, sono in grado di attivare la risposta immunitaria anti-tumorale attraverso diverse vie, come l'attivazione del sistema del complemento, l'up-regolazione di molecole tipo MHC-I sulla superficie delle cellule tumorali e la produzione "*heat shock proteins*" (*hsp*), forti attivatori della maturazione delle cellule dendritiche. Inoltre è stato dimostrato che il materiale antigenico derivato dalle lesioni tumorali sottoposte a termoaablazione, è in grado di determinare una efficiente maturazione di monociti derivati dagli stessi pazienti, attivati con il fattore di crescita granulocito-monocitario GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor). Tali monociti attivati sono in grado di

presentare antigeni di HCC inducendo una efficiente risposta T linfocitaria HCC-specifica (63).

Mentre gli effetti della RFA sui diversi aspetti della risposta T linfocitaria sono stati ben delineati (64, 65), le informazioni riguardanti l'impatto di tale trattamento sulla popolazione delle cellule Natural Killer sono preliminari e contrastanti. (66, 67, 68).

Oltre a distruggere il tessuto neoplastico, la termoablazione, che trova sempre maggiore utilizzo nella terapia dei tumori solidi, induce quindi una risposta immunitaria cellulo-mediata contro gli antigeni tumorali, che potrebbe essere sfruttata per diverse strategie di immunoterapia.

LINFOCITI NATURAL KILLER

I linfociti Natural Killer (NK) costituiscono il 10-15% dei linfociti circolanti e hanno un ruolo cruciale nell'immunità innata attraverso la lisi delle cellule target e il rilascio di molecole immunoregatorie, senza che ci sia il riconoscimento di un antigene specifico o una pregressa sensibilizzazione. Inizialmente erano stati denominati "large granular lymphocytes" (LGL) per il loro aspetto (69, 70).

Dal punto di vista fenotipico tali linfociti sono caratterizzati dall'espressione degli antigeni di superficie CD56 (NKH-1, Leu-19) e CD16 (Fcγ R III) e dalla negatività per l'antigene CD3 (69). L'antigene CD56, isoforma della molecola di adesione delle cellule neuronali NCAM, è responsabile dell'interazione tra le cellule NK e le cellule bersaglio, mentre il CD16, come recettore a bassa affinità della porzione Fc delle immunoglobuline G, è coinvolto nella citotossicità cellulare anticorpo mediata. In base alla densità di superficie degli antigeni CD56 e CD16 si possono individuare due sottopopolazioni di linfociti NK: le cellule che esprimono CD56 a bassa intensità (CD56^{dim}) e CD16 ad alta intensità (circa 90%) e le cellule che esprimono CD56 ad alta intensità (CD56^{bright}) e sono negative per CD16 o lo esprimono a bassa intensità. Le cellule CD56^{dim} svolgono prevalentemente un'azione citotossica, mentre le cellule CD56^{bright} sono principalmente cellule secernenti citochine (71).

Le cellule NK intervengono nelle prime fasi della risposta immunitaria tramite 2 meccanismi principali:

- ✓ Secrezione di citochine, quali TNF- β , INF- γ , IL-10, IL-13 e GM-CSF; al fine di modulare l'immunità adottiva ed indurre la maturazione delle cellule dendritiche.
- ✓ Attività citotossica mediata da recettori di membrana denominati Recettori Natural Killer (NKR) e anticorpo mediata (ADCC) col fine di eliminare le cellule infettate da virus e cellule tumorali (71). La citossicità "anticorpo-indipendente non-MHC-restricted" è mediata dai recettori NK di superficie mentre la ADCC è mediata dall'antigene CD16.

Il comportamento funzionale delle cellule NK è finemente regolato da un'ampia serie di recettori di attivazione e di inibizione (Tabella 1) (72).

La funzione dei recettori inibitori come KIR (recettore Ig-like delle cellule NK) e KLR (recettore lectin-like delle cellule NK) è di prevenire l'uccisione di cellule normali, riconosciute in base all'espressione di alti livelli di MHC e limitare la produzione di IFN- γ , GM-CSF e TNF- α da parte delle NK.

Oltre ai recettori inibitori MHC-specifici esistono vari recettori di attivazione implicati nei processi di citotossicità: NKp46, NKp30 e NKp44 appartengono ad un gruppo di recettori di citotossicità naturale noti come NCR la cui densità di superficie correla in modo diretto con l'abilità dei linfociti NK ad attaccare il tumore. NKG2D condivide la stessa funzione e può agire in modo sinergico, complementare o in certi casi indipendente dai NCR. Lo stesso CD16 (Fc γ RIII) rappresenta un recettore di attivazione, essendo in grado di legare la frazione costante degli anticorpi e di mediare così i processi di citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC). Tra le molecole di superficie si trovano corecettori (2B4 e NKp80) che intervengono ulteriormente nella regolazione dell'attivazione dei linfociti NK (70).

Tabella 1**Activating and inhibitory receptors on human NK cells** (da Sutlu T, Alici E. J Intern Med. 2009;266:154-81)

CD	Alternative name	Type of signal	Ligand	Distribution on NK cells
CD2	LFA-2	Activation	CD58 (LFA-3)	All
CD7	LEU-9	Activation	SECTM1, Galectin	All
CD11a	LFA-1	Activation	ICAM-1,-2,-3,-4,-5	All
CD11b	Mac-1	Activation	ICAM-1, Fibrinogen	All
CD16	FcγRIII	Activation	IgG	Mainly CD56 ^{dim} Negative/dim on CD56 ^{bright}
CD27	TNFRSF7	?	CD70	Mainly on CD56 ^{bright} Negative/dim on CD56 ^{dim}
CD44	Hyaluronate receptor	Activation	Hyalouronan	All
CD59	Protectin	Activation	C8, C9	All
CD69	CLEC2C	Activation	Unkown	Activated
CD85j	ILT-2	Inhibition	HLA-A, -B, -G	Subset
CD94/CD159a	CD94/NKG2A	Inhibition	HLA-E	Most
CD94/CD159c	CD94/NKG2C	Activation	HLA-E	Most
CD96	TACTILE	Activation	CD155	Activated low expression on resting
CD160	BY55	Activation	HLA-C	All
CD161	NKR-P1	Activation/Inhibition	LLT1	Subset
CD223	Lag3	Activation	HLA Class II	Activated
CD226	DNAM-1	Activation	CD112, CD155	All
CD244	2B4	Activation/Inhibition	CD48	All
CD314	NKG2D	Activation	MICA, MICB, ULB-1,-2,-3,-4	All
CD319	CRACC	Activation	CRACC	Mature NK cells
CD328	Siglec-7	Inhibition	Sialic acid	Subset
CD329	Siglec-9	Inhibition	Sialic acid	Subset
CD335	NKp46	Activation	Viral haemagglutinin	All
CD336	NKp44	Activation	Viral haemagglutinin	Activated
CD337	NKp30	Activation	Viral haemagglutinin	All
Various	KIR2DS, KIR3DS	Activation	HLA Class I	Subsets
Various	KIR2DL, KIR3DL	Inhibition	HLA Class I	Subsets
–	NTB-A	Activation	NTB-A	All
–	KLRG1	Inhibition	E-,N-,P-cadherin	All

Il comportamento funzionale dei linfociti NK è fortemente influenzato dal microambiente citochinico in cui si trovano, così come dall'interazione con altre cellule del sistema immunitario quali linfociti T, cellule dendritiche e macrofagi (73). Gli interferoni di tipo I, IL-2, IL-12, IL-18 e IL-15 sono potenti attivatori della funzione effettrice delle cellule NK e delle loro capacità proliferativa (74).

Il comportamento dei linfociti Natural Killer può anche essere regolato dai linfociti T regolatori tramite contatto diretto per mezzo del recettore CTLA-4 e PD-1, o attraverso la secrezione del TGF- β e di IL-10 (75, 76, 77, 78).

Gli stessi linfociti NK possono poi agire da cellule regolatorie influenzando altri tipi cellulari quali le cellule dendritiche, i linfociti T e B e le cellule endoteliali. Studi recenti su modello murino hanno dimostrato che la deplezione selettiva di cellule NK permette la maturazione e differenziamento di linfociti T CD8⁺ tumore specifici conseguendo il controllo di neoplasie indotte (79, 80).

Come precedentemente accennato, lo sviluppo di un tumore è contrastato dalla immunosorveglianza dei linfociti Natural Killer oltre che di altre componenti del sistema immunitario.

Le cellule NK possono principalmente interagire con le cellule tumorali in due modi: possono entrare in contatto diretto con i loro bersagli in modo non specifico e non mediato da anticorpi, oppure possono legare, con il recettore specifico CD16, anticorpi IgG fissati sulla superficie della cellula tumorale; la conseguente lisi della cellula bersaglio mediante ADCC non coinvolge il complemento bensì un certo numero di meccanismi citotossici: le NK secernono il fattore di necrosi tumorale (TNF- α) dotato di effetto citotossico, contengono dei granuli citoplasmatici di perforina capace di danneggiare la membrana cellulare, inoltre la capacità tumoricida è potenziata da citochine quali gli interferoni, IL-2 e IL-12 (81).

Le neoplasie emergenti possono sottrarsi al controllo da parte dei linfociti Natural Killer attuando differenti strategie; in particolare, nel caso dell'epatocarcinoma vari

studi hanno mostrato una diminuzione dell'attività citotossica ed una ridotta espressione dei recettori di attivazione dei linfociti NK (82, 83).

Sono stati condotti molti studi utilizzando citochine ricombinanti (IL-2, Interferoni di tipo I e II, IL-12, IL-15 etc.) ed è stata dimostrata la loro efficacia nell'indurre la mobilitazione acuta e l'attivazione massiva delle cellule NK in pazienti affetti da cancro, ma in presenza di effetti avversi di tale intensità e frequenza da renderne impossibile l'utilizzo nell'ambito di terapie standard (84, 85).

D'altra parte, l'effetto clinico di alcuni anticorpi monoclonali specifici per antigeni espressi sulla superficie della cellula tumorale dipende almeno in parte dall'attivazione dei linfociti NK mediata dal legame del recettore CD16 FcγRIIIa a cui fa seguito la citotossicità ADCC, come osservato nel caso di anti-Her2/neu per il tumore della mammella e di anti-CD20 nel caso dei linfomi (86, 87).

Altre strategie finalizzate all'attivazione delle cellule NK per scopi terapeutici sono al momento oggetto di importanti trial clinici e comprendono l'infusione di linfociti NK alloreattivi, l'induzione dell'espressione di TRAIL dopo stimolazione citochinica o, ancora, il blocco dei pathway di inibizione.

SCOPO DELLO STUDIO

Scopo dello studio è stata la valutazione dell'effetto del trattamento di termoablazione con radiofrequenza per noduli di epatocarcinoma sulla sottopopolazione linfocitaria Natural Killer circolante, estendendo le precedenti conoscenze relative all'effetto sulla risposta immunitaria innata e adattativa. Sono stati inoltre valutati i possibili effetti della modulazione della risposta NK sull'andamento clinico dei pazienti trattati in funzione di possibili applicazioni future del potenziamento della risposta NK-mediata nell'ambito delle terapie anti-tumorali.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto presso il Laboratorio di Immunopatologia Virale della Divisione di Malattie Infettive, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma.

Pazienti. Nel periodo compreso fra gennaio 2002 e ottobre 2009 sono stati arruolati 37 pazienti, 11 donne, 26 uomini, affetti da cirrosi epatica ed epatocarcinoma (HCC).

Il periodo di osservazione dei pazienti per ricorrenza di malattia (ovvero il tempo alla recidiva) era compreso tra 13 e 94 mesi. Come mostrato nella Tabella 2, il campione studiato aveva un'età compresa tra 49 e 83 anni (età media 71 anni) e una storia di cirrosi epatica attribuibile ad infezione da HCV in 26 pazienti, ad HBV in 3, a coinfezione HBV/HCV in un unico paziente, ad alcool in 5 pazienti e alla combinazione di alcool e HCV in 2 pazienti.

I noduli trattati, di diametro variabile da 15 a 55 mm (diametro medio 22 mm), erano presenti come nodulo singolo in 29 pazienti e multinodulari nei restanti 8.

Ai fini dello studio, è stato effettuato un prelievo di sangue il giorno precedente al trattamento di termoablazione, a una e a 4 settimane di distanza dal trattamento.

Ogni partecipante ha regolarmente sottoscritto il Consenso Informato. Il protocollo di studio (approvato dal Comitato Etico Locale) era conforme alle Linee Guida della Dichiarazione di Helsinki (1975).

Paziente	Sesso	Età	Eziologia	Numero noduli	Diametro cumulativo	Trattamenti Precedenti
1	F	79	HCV	2	25 mm	✓
2	M	76	HCV	2	41 mm	-
3	M	65	HCV	1	25 mm	✓
4	M	65	HCV	1	20 mm	-
5	M	77	HCV-ALCOL	1	20 mm	✓
6	F	69	HBV-HCV	2	38 mm	-
7	M	72	HCV	1	15 mm	-
8	M	70	HCV	2	40 mm	✓
9	M	82	HBV	1	24mm	✓
10	F	76	HCV	1	40 mm	-
11	M	73	HBV	1	15 mm	✓
12	F	83	HCV	1	22 mm	-
13	M	77	HCV	1	40 mm	-
14	M	63	HBV	1	30 mm	✓
15	M	68	HCV	1	18 mm	-
16	M	83	HCV	2	20 mm	✓
17	M	63	ALCOL	1	15 mm	-
18	F	75	HCV	1	18 mm	-
19	M	68	HCV	1	20 mm	-
20	M	55	HCV	1	20 mm	-
21	M	63	HCV	1	28 mm	-
22	M	73	ALCOL	1	23 mm	✓
23	M	81	HCV	1	23 mm	✓
24	M	69	ALCOL	1	25 mm	✓
25	F	80	HCV	3	50 mm	-
26	F	72	ALCOL	1	20 mm	-
27	M	77	HCV	1	19 mm	-
28	M	59	HCV-ALCOL	1	45 mm	✓
29	F	81	HCV	1	25 mm	-
30	M	79	HCV	1	18 mm	-
31	F	61	HCV	4	70 mm	-
32	F	82	HCV	1	20 mm	-
33	M	79	HCV	1	25 mm	-
34	M	52	ALCOL	1	18 mm	-
35	M	49	HCV	3	80 mm	-
36	M	65	HCV	1	35 mm	✓
37	F	72	HCV	1	55 mm	✓

Tabella 2: caratteristiche dei pazienti studiati

Trattamento. Ciascun paziente, completata la sedazione cosciente, è stato sottoposto al trattamento di Termoablazione con Radiofrequenze (RFA) sotto guida ecografica, tramite aghi di 14 G (1,6 mm) dotati di nove elettrodi attivi (Starburst XL) connessi ad un generatore di radiofrequenza (Model 1500_RF generator, Rita Medical System, Inc., Mountain View, CA). Prima di concludere il procedimento, al fine di evitare l'impianto di cellule tumorali, l'emissione di radiofrequenza è stata continuata lungo il tragitto di uscita dell'ago.

A distanza di un mese, oltre al controllo clinico, è stata eseguita una tomografia computerizzata (TC) con contrasto volta a verificare la completa necrosi del nodulo tumorale; il follow-up ha previsto successivamente controlli ultrasonografici con ecografia con mezzo di contrasto (contrast enhancement - CEUS) ogni 3 mesi e TC ogni 6 mesi.

Conta delle sottopopolazioni linfocitarie periferiche. Per ogni prelievo è stata effettuata la conta assoluta delle popolazioni linfocitarie periferiche (linfociti T CD3+, CD4+, CD8+, linfociti B CD19+ e cellule NK CD3-/CD16+56+).

A tal fine sono state utilizzate le seguenti combinazioni di anticorpi monoclonali (mAbs) marcati con fluorocromi (isotiocianato di fluoresceina FITC, ficoeritrina PE, peridinin chlorophyll protein PerCP, allofococianina APC):

- CD3-FITC / CD8-PE / CD45-PerCP / CD4-APC
- CD3-FITC / CD19-PE / CD45-PerCP
- CD3-FITC / CD16/56-PE / CD45-PerCP

(tutti BD Biosciences, San Josè, CA).

40 microlitri di sangue sono stati incubati al buio e a temperatura ambiente con 20 µL di ciascuna miscela di mAbs per 15 minuti all'interno di tubi Trucount™ (BD Biosciences) contenenti un numero noto di microsfere fluorescenti. Al termine di questa incubazione gli eritrociti sono stati lisati utilizzando 450 µL di FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences) e dopo altri 15 minuti di incubazione si è proceduto con

l'analisi in citofluorimetria a flusso (BD Biosciences FACSCalibur). Per la conta è stato utilizzato il software Multiset (BD Biosciences).

Isolamento delle cellule linfo-mononucleate da sangue periferico (PBMC). Dai campioni di sangue fresco eparinato sono state isolate le PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) mediante centrifugazione su gradiente di densità Ficoll-Hipaque; Il campione di sangue è stato stratificato su Ficoll-Hipaque (in un rapporto di 3 volumi di sangue per 1 di Ficoll-Hipaque) e centrifugato a 2500xg per 20 minuti. Le PBMC ottenute sono state sottoposte a ripetuti lavaggi con phosphate buffered saline (PBS) e risospese in una soluzione di RPMI 1640 integrato con HEPES 25 mmol/L, L-glutamina 2 mmol/L, Gentamicina 50 µg/mL e 8% siero umano. Le PBMC non testate immediatamente sono quindi state congelate in azoto liquido in terreno costituito da 90% FCS + 10% DMSO.

Isolamento delle cellule Natural Killer. Le cellule NK sono state isolate per selezione negativa dalle PBMC utilizzando il saggio NK Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Auburn CA) seguendo le istruzioni del produttore. Tale metodo prevede la selezione negativa delle NK, usando un cocktail di anticorpi biotina-coniugati contro antigeni non espressi dalle cellule NK e usando successivamente anticorpi anti-biotina coniugati con MicroBeads. Tali biglie magnetiche permettono di trattenere le cellule marcate sulle pareti di una colonna posta all'interno di un campo magnetico lasciando passare le cellule NK che vengono quindi raccolte all'uscita della colonna stessa. Il grado di purezza delle cellule NK ottenute è stato mediamente il 95%.

Fenotipizzazione delle cellule Natural Killer e dei linfociti T regolatori. Per la caratterizzazione fenotipica sono stati impiegati anticorpi monoclonali specifici per diversi antigeni cellulari. Le PBMC sono state dapprima incubate al buio e a temperatura ambiente in 100 µl di PBS con miscele dei seguenti anticorpi: CD56-FITC, CD56-APC, CD16-FITC, CD3-PerCP CD25-FITC, FOXP3-PE, CTLA4-PerCP ,CD4-APC (BD Biosciences – Pharmingen, San José, CA), NKG2D-PE, NKG2A-PE (R&D Systems, Inc.,

Minneapolis, MN), NKp46-PE, NKp30-APC, CD158a-FITC, CD158b-PE, CD158e-FITC (Miltenyi Biotec) rispettando le seguenti combinazioni.

	1	2	3	4
FITC	<u>CD158a</u>	CD56	<u>CD158e</u>	<u>CD25</u>
PE	<u>NKG2A</u>	<u>NK P46</u>	<u>CD158b</u>	<u>FOXP3</u>
PerCP	CD3	CD3	CD3	CTLA4
APC	CD56	<u>NK P30</u>	CD56	CD4

Dopo lavaggio con 4 ml di PBS+0,1% FCS le cellule sono state risospese in 200 µl di PBS+0,1% FCS e analizzate al citofluorimetro (BD Biosciences FACSCalibur) utilizzando il software FACSDiva (BD Biosciences).

Analisi dell'espressione di Ki-67. La marcatura con un anticorpo monoclonale diretto contro l'antigene nucleare Ki-67 ha permesso la quantizzazione percentuale di cellule Natural Killer proliferanti.

Per l'analisi Ki-67, le cellule sono state prime marcate con i marcatori di superficie CD56-APC e CD3-PerCP nelle modalità precedentemente illustrate. In seguito le PBMC sono state marcate per Ki-67 utilizzando il kit "Ki-67 FITC Mouse Anti-Human Ki-67 Set" (BD Pharmingen) seguendo le istruzioni del produttore che prevedono la fissazione e la permeabilizzazione delle cellule. Al termine della marcatura le cellule sono state risospese in 200 µl di PBS+0,1% FCS e analizzate al citofluorimetro (BD Biosciences FACSCalibur) utilizzando il software FACSDiva (BD Biosciences).

Test di Citotossicità. L'efficienza citotossica delle cellule NK è stata valutata in base all'entità di rilascio del cromo-51 (^{51}Cr) in un periodo di 4 ore usando come target una linea di cellule K562, linea cellulare leucemica, NK sensibile, derivata da un paziente con leucemia mieloide cronica in crisi blastica e caratterizzate da deficit di MHC di classe I (medium: RPMI-1640 arricchito con 10% di siero fetale bovino

scomplementato, 1% di L-Glutammina e 1% di penicillina/streptomicina) e come effettori PBMC ottenute dal sangue periferico dei pazienti. Le PBMC sono state incubate “overnight” in presenza o meno di IL-15 (R&D System, Abingdon, UK) (1 mg/mL) citochina che stimola selettivamente l’attivazione di cellule NK.. Il giorno successivo le cellule bersaglio K562 sono state incubate con 100 μ Ci di ^{51}Cr (GE healthcare, UK) per un’ora alla temperatura di 37 °C, con una percentuale di CO₂ del 5%. Le cellule target sono quindi state lavate con la soluzione di Hank per rimuovere l’eccesso di radioattività e risospese nel terreno di coltura. 3×10^3 cellule K562 per pozzetto sono state distribuite in piastre da 96 pozzetti con fondo a U e sono state aggiunte le PBMC da testare in rapporti effettori:target (E/T) compresi tra 20:1 e 5:1 in 200 μ L di RPMI-1640 più siero bovino fetale al 10% per 4 ore a 37°C con CO₂ al 5%. Al termine delle 4 ore, 25 μ L di supernatante sono stati raccolti e seminati in piastre per scintillazione e contati con il contatore TopCount NXT gamma (Packard-PerkinElmer, Boston, MA, USA).

La percentuale di citolisi è stata calcolata sulla base della seguente formula:: $100 \times [(\text{rilascio sperimentale} - \text{rilascio spontaneo}) / (\text{rilascio totale} - \text{rilascio spontaneo})]$. Col termine “rilascio spontaneo” si intende la liberazione di Na₂ $^{51}\text{CrO}_4$ nel mezzo di coltura in assenza di cellule effettrici, mentre con “rilascio totale” si intende la radioattività rilasciata dopo alcuni cicli di lisi tramite passaggi di gelo/scongelo delle cellule target. L’efficienza citotossica delle cellule NK è stata poi calcolata come rapporto tra la percentuale di lisi e la frequenza di cellule NK totali stimata mediante analisi citofluorimetrica sulle PBMC.

Valutazione dell’espressione di CD107a (marker surrogato di citotossicità). CD107a (LAMP-1) rappresenta un marker di attivazione funzionale per le cellule NK. Dopo stimolazione risulta up-regolato sulla superficie delle cellule e la sua espressione correla sia con la secrezione di citochine sia con la lisi NK-mediata.

Per la valutazione di CD107a 1×10^6 PBMC sono state incubate per 16 ore a 37°C con CO₂ al 5%. in presenza o in assenza di 1 ng/ml di IL-15 (R&D System) in 500 μ L di

terreno completo. Al termine delle 16 ore sono state addizionate alla coltura di PBMC cellule K562 mantenendo un rapporto effettori:targets (E/T) di 5:1 e l'anticorpo monoclonale CD107a-PE. Dopo un'ora di incubazione è stata aggiunta Brefeldina A (Sigma) (10 µg/mL) al fine di bloccare i passaggi di vescicole dal Golgi al citoplasma, infine, trascorse altre 3 ore a 37°C le cellule sono state sottoposte a colorazione per i markers di superficie (CD3-FITC, CD56-APC). Dopo lavaggio con PBS+0,1% FCS le cellule sono state analizzate al citofluorimetro (BD Biosciences FACSCalibur) utilizzando il software FACSDiva (BD Biosciences).

Saggio di citotossicità mediata da anticorpi (ADCC). L'ADCC è stata valutata in base all'entità di rilascio del cromo-51 (^{51}Cr) in un periodo di 4 ore usando come target una linea di cellule di carcinoma mammario HER2/neu positive (MDA-MB-361) e come effettori le cellule mononucleate ottenute dal sangue periferico dei pazienti. Le cellule tumorali sono state incubate con 100 µCi di ^{51}Cr (GE healthcare, UK) per un'ora alla temperatura di 37 °C, con una percentuale di CO₂ del 5%. Le cellule sono state quindi lavate con soluzione di Hank e incubate per 30 minuti a 37°C, in 5% di CO₂, in presenza dell'anticorpo monoclonale anti-Her2neu (Trastuzumab®), o di anti-CD20 (Rituzimab®) (mAb IgG1 di controllo) o solo con terreno di coltura. L'eccesso di anticorpo è stato rimosso attraverso il lavaggio con soluzione di Hank. 5000 cellule MDA-MB-361 marcate con ^{51}Cr e le cellule effettrici sono state coincubate con rapporti di concentrazione (Effector:Target ratio[E:T]) differenti (12.5:1; 25:1; 50:1; 100:1) in 200 µL di RPMI-1640 più siero bovino fetale al 10% per 4 ore a 37°C con CO₂ al 5%. Al termine delle 4 ore, 25 µL di supernatante sono stati seminati in piastre per scintillazione e contati con il contatore TopCount NXT gamma (Packard-PerkinElmer, Boston, MA, USA). Il rilascio massimo di ^{51}Cr è stato determinato con o senza anticorpo monoclonale attraverso ripetuti cicli di congelamento-scongelo delle cellule target. La percentuale di citolisi è stata calcolata sulla base della seguente formula: citotossicità (%): $[(\text{conta di rilascio ottenuta per minuto (cpm)} - \text{rilascio spontaneo cpm}) / (\text{massimo rilascio cpm} - \text{spontaneo rilascio cpm})] \times 100$. L'ADCC veniva calcolata

secondo la seguente formula: ADCC (%) = citossicità (%) – citossicità cellulare antigene-indipendente (AICC; %), dove AICC rappresenta la citotossicità non specifica in assenza di anticorpo. Per comparare i differenti campioni, l'ADCC è stata normalizzata dividendo le specifiche lisi dalla frequenza delle cellule CD16 positive calcolata sul totale delle cellule mononucleate del sangue periferico.

Produzione di IFN- γ da parte delle cellule Natural Killer. Per quantificare la produzione di interferone- γ 1×10^6 PBMC sono state incubate per 18 ore in presenza di IL-12 (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) da sola o in combinazione con IL-18 (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (entrambe Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); allo scadere della terz'ultima ora di incubazione è stata aggiunta Brefeldina-A (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inibitore del trasporto intracellulare delle proteine che fa sì che l'interferone sintetizzato non venga secreto all'esterno della cellula ma che si accumuli nell'apparato del Golgi. Al termine dell'incubazione le cellule sono state marcate con gli anticorpi di superficie CD56-FITC e CD3-PerCP. Dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente e al buio le PBMC sono state lavate con 4 ml di PBS e quindi fissate e permeabilizzate utilizzando i reagenti Fix&Perm (Caltag Laboratories, Burlingame, CA). Al termine della permeabilizzazione è stato aggiunto l'anticorpo monoclonale anti-IFN- γ PE (Sigma) per 15 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state lavate con PBS e infine sottoposte all'analisi citofluorimetrica (BD Biosciences FACSCalibur) utilizzando il software FACSDiva (BD Biosciences).

Determinazione dei livelli di IL-15 e HSP-70 sierici

I livelli di IL-15 e HSP-70 nel siero dei pazienti sono stati analizzati mediante saggi immunoenzimatici ELISA. Questi prevedono una prima incubazione dei campioni da analizzare su apposite piastre adsorbite con anticorpi specifici per un epitopo della citochina da rilevare, seguita da una seconda incubazione con anticorpi diretti contro un altro epitopo della stessa citochina. Questi ultimi sono coniugati ad un enzima, la perossidasi, capace di sviluppare una reazione colorimetrica, la cui intensità è proporzionale alla quantità di citochina presente nei sopranatanti. I livelli di citochine rilasciati sono stati espressi in pg/ml.

IL-15 è stata valutata col Kit commerciale “MaxDiscovery Human IL-5 ELISA Test Kit” (BIOO Scientific, Austin TX, USA) , mentre per HSP-70 è stato utilizzato il kit “Human HSP70 ELISA Kit” (RayBiotech, Cedex, France). In entrambi i casi sono state seguite le indicazioni dei produttori.

Analisi statistiche. Per confrontare l’espressione dei marcatori di superficie delle cellule NK prima e dopo il trattamento sono stati utilizzati il test “t” di Student per dati appaiati o il test di Wilcoxon.

Il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman ha permesso di calcolare le correlazioni tra dimensione dei noduli e parametri funzionali delle cellule NK.

Il Log Rank test è stato usato per individuare differenze statisticamente significative nelle curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier; $p < .05$ è stata considerata significativa per tutte le analisi.

RISULTATI

Il trattamento di termoblazione è associato ad un aumento dei linfociti Natural Killer circolanti

Al fine di indagare l'effetto del trattamento di termoblazione sull'omeostasi delle popolazioni linfocitarie circolanti, i valori assoluti dei linfociti B, dei linfociti T e relative sottopopolazioni CD4⁺ e CD8⁺ e delle cellule NK sono stati valutati in campioni di sangue intero prelevato ai pazienti il giorno precedente trattamento e una e quattro settimane dopo il trattamento stesso. La frequenza dei linfociti NK era significativamente maggiore in entrambi i punti-tempo post-trattamento (figura 5); le frequenze dei linfociti T CD4⁺ e i linfociti B erano pressoché invariate mentre i linfociti T CD8⁺ mostravano un aumento dopo 4 settimane dalla terapia che, tuttavia, non raggiungeva la significatività statistica (figura 5).

Le cellule CD3⁺ CD56⁺ (linfociti NK) sono state oggetto di ulteriori analisi che, oltre a confermare l'incremento numerico, hanno mostrato che le due sottopopolazioni CD56^{dim} e CD56^{bright} avevano dinamiche opposte, in quanto le prime aumentavano in modo significativo, mentre le seconde diminuivano (figura 6). La termoblazione dei noduli di epatocarcinoma determina quindi un significativo incremento delle cellule NK sostenuto in particolare della sottopopolazione CD56^{dim}.

Valutazione della capacità proliferativa dei linfociti Natural Killer

Al fine di definire se l'incremento numerico dei linfociti NK fosse conseguenza di una reale proliferazione cellulare o di una redistribuzione o di entrambi i meccanismi, in 10 pazienti selezionati casualmente è stata valutata l'espressione di Ki-67, antigene nucleare presente in elementi cellulari proliferanti. Non è stato riscontrato alcun aumento della percentuale di cellule Ki-67 positive né nei linfociti NK né sulla sottopopolazione CD56^{bright} (figura 7). Tale risultato indica come improbabile una recente espansione cellulare, mentre sono a supporto dell'ipotesi di differenziazione di cellule CD56^{bright} a cellule CD56^{dim}, sia periferica, sia in organi linfoidi secondari o a livello epatico; questa ipotesi è avvalorata dalla simultaneità della riduzione delle cellule CD56^{bright} e dell'incremento di quelle CD56^{dim}.

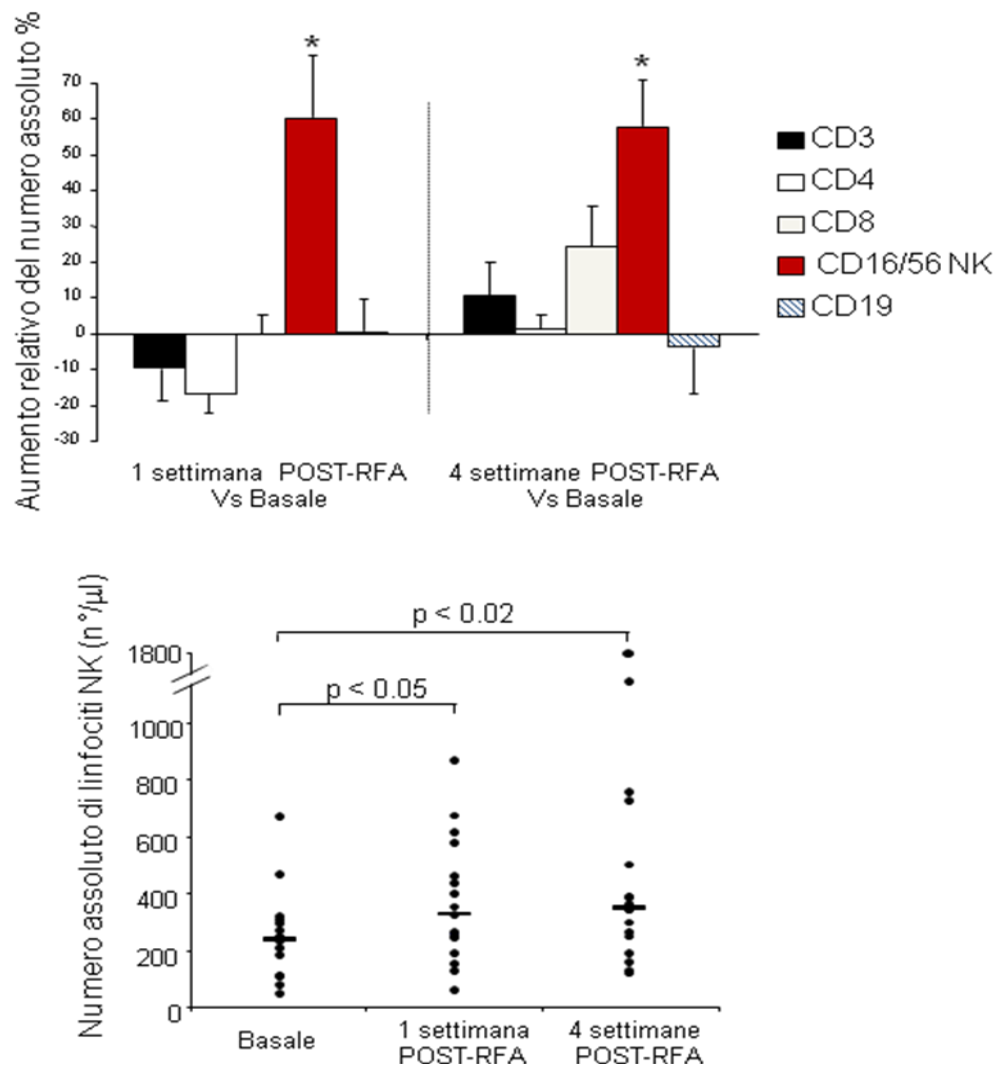


Figura 5: Aumento della frequenza e numero assoluto delle cellule NK dopo termoablazione.

In 19 pazienti è stato valutato il numero assoluto e la frequenza delle sottopopolazioni linfocitarie analizzate il giorno precedente e 1 e 4 settimane dopo il trattamento. La sottopopolazione di cellule NK è quella che mostra il maggiore incremento dopo RFA, come si può vedere nel pannello superiore che mostra le variazioni, espresse in percentuale, del numero dei linfociti rispetto ai valori basali. Nel pannello inferiore sono mostrati gli incrementi statisticamente significativi del numero delle cellule NK ad 1 e 4 settimane dal trattamento (t-test per dati appaiati).

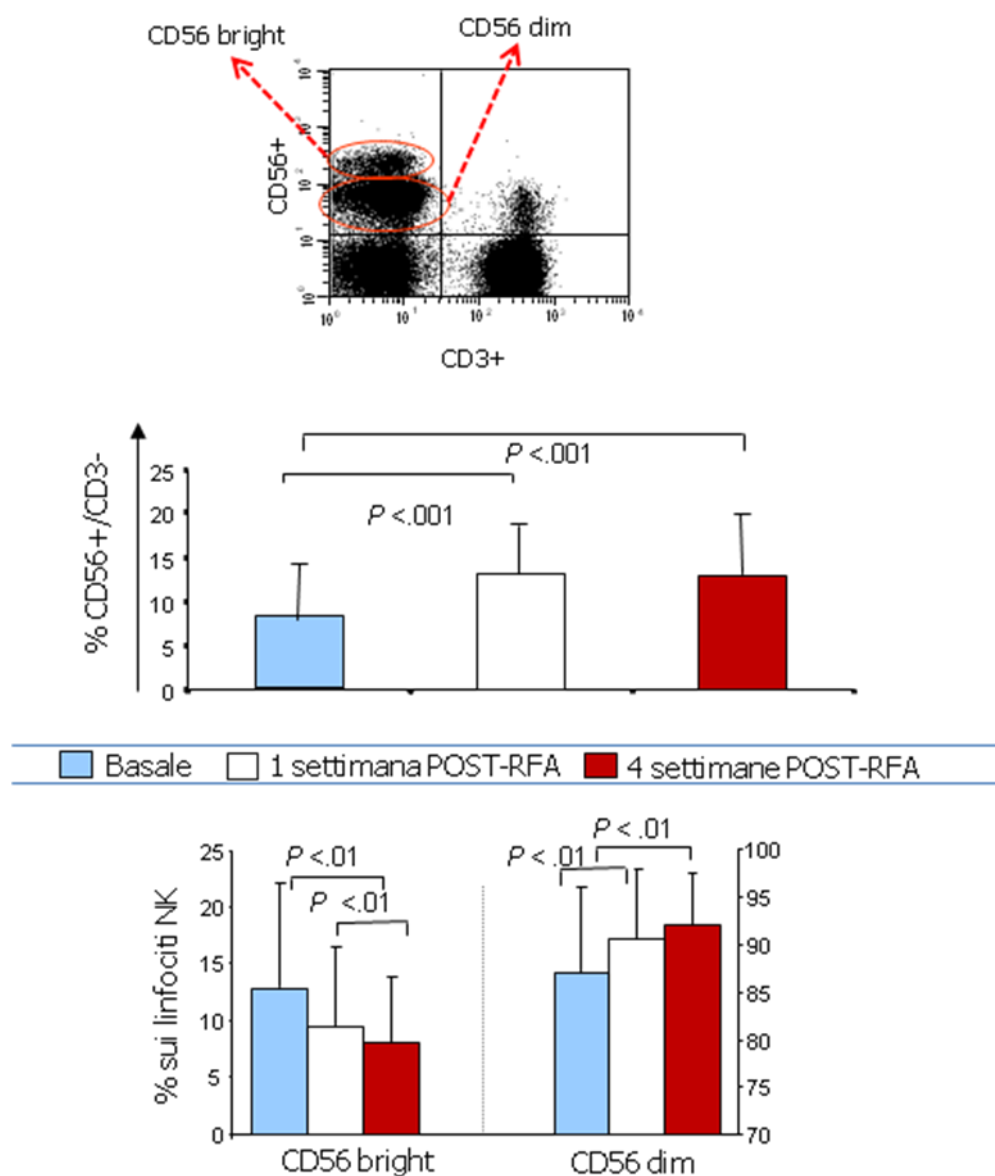


Figura 6: Incremento relativo della sottopopolazione CD56^{dim} dopo termoablazione.

L'analisi delle sottopopolazioni NK mostrava un incremento delle CD56^{dim} e una consensuale riduzione delle CD56^{bright}. Nel pannello superiore viene riportato un citogramma esemplificativo dell'analisi. In basso sono indicate le modificazioni statisticamente significative delle percentuali dei linfociti NK totali e delle sottopopolazioni CD56^{dim} e CD56^{bright} (t-test per dati appaiati).

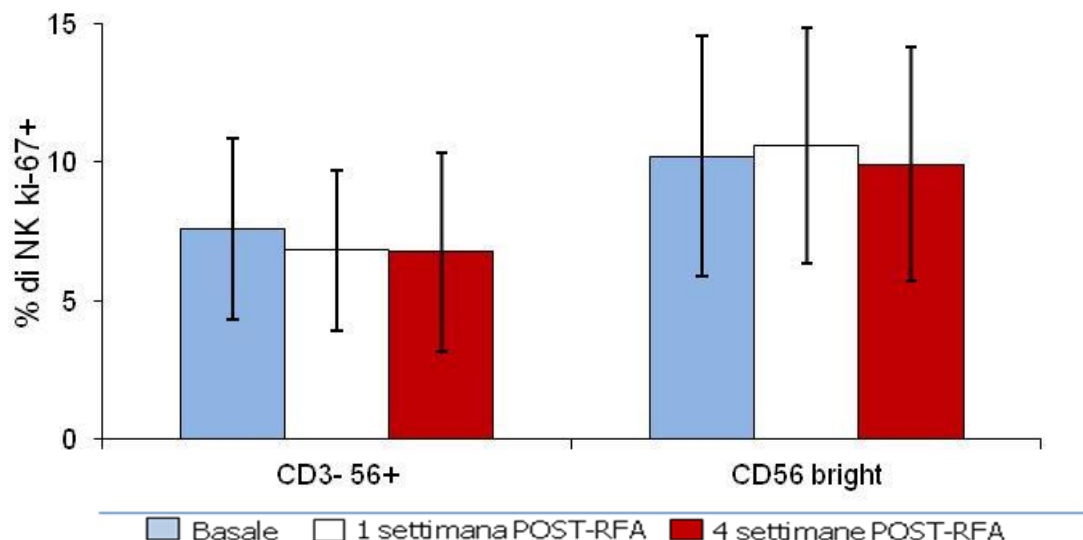


Figura 7: Espressione dell'antigene nucleare Ki-67 nelle cellule Natural Killer.

L'espressione di Ki-67 è stata valutata in 10 pazienti al fine di valutarne la capacità proliferativa. Non è stato riscontrato alcun aumento della percentuale di cellule ki67 positive né nei linfociti NK né sulla sottopopolazione CD56^{bright} (t-test per dati appaiati).

Valutazione dell'espressione dei recettori di attivazione delle cellule NK in seguito a termoablazione con radiofrequenza

L'attività delle cellule NK è determinata dal bilancio fra segnali positivi e negativi mediati dai recettori di attivazione (quali NKG2D, CD16, NKp44, NKp46, NKp30) e di inibizione (quali NKG2A, CD158a, CD158b, CD158e) espressi sulla superficie cellulare. Per definire in modo più dettagliato l'effetto della termoablazione sulle cellule NK è stata pertanto valutata l'espressione di questi recettori sulle stesse. L'espressione del recettore NKG2D è risultata aumentata sia alla prima che alla quarta settimana dal trattamento, mentre dopo 4 settimane era aumentata sia l'espressione di CD16 (FcγRIIIa) che quella dei Natural Cytotoxicity Receptors NKp30 e NKp46 (figura 8). NKp30 e NKp46 hanno mostrato anche un aumento dei livelli di espressione per singola cellula (intensità media di fluorescenza M.F.I. di NKp30: 1552±1274 prima del trattamento e 1622±1345 dopo quattro settimane, $P<.01$; M.F.I. di NKp46: 1713±1429 prima del trattamento e 1864±1445 dopo quattro settimane, $P<.01$; dati non

mostrati). All'aumentata espressione dei recettori di attivazione è corrisposto un significativo decremento del recettore inibitorio NKG2A in entrambe le osservazioni post-trattamento, mentre non si sono osservate modificazioni rilevanti a carico dei Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIRs, CD158a, CD158b and CD158e) (figura 9).

I dati ottenuti dimostrano che il trattamento di termoablazione stimola l'espansione e l'espressione dei recettori di attivazione delle cellule NK, inibendo nel contempo i recettori di inibizione determinando così l'attivazione della loro funzione effettrice citotossica.

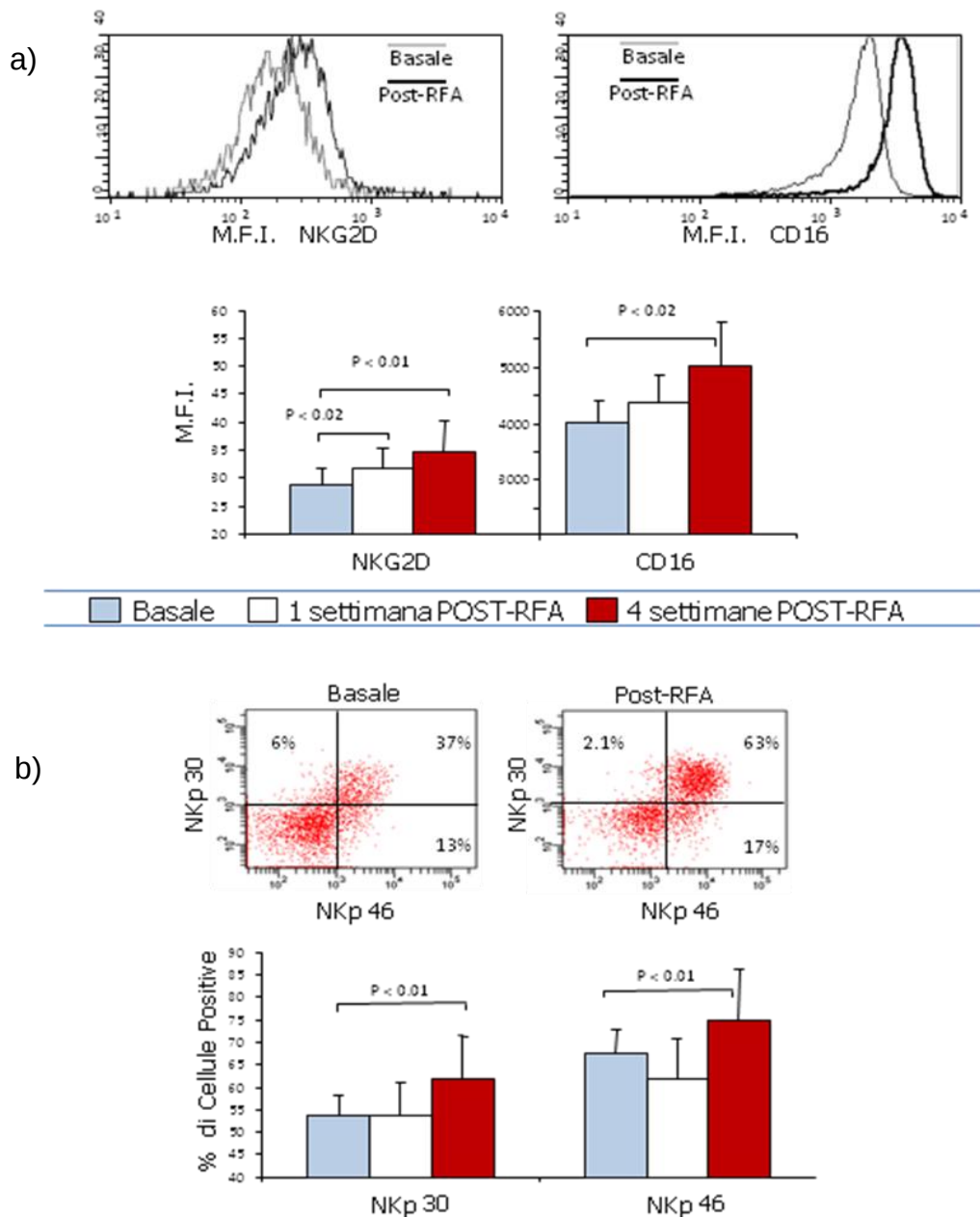


Figura 8: Caratterizzazione fenotipica delle cellule NK. Recettori di Attivazione.

a) Analisi dei livelli di espressione (intesi come intensità media fluorescenza) di NKG2D e CD16 e b) della percentuale dei linfociti NK positivi per NKp30 e NKp46. L'intensità media di fluorescenza è stata calcolata sottraendo i valori ottenuti col controllo isotipico. Sono riportati citogrammi esemplificativi dell'analisi in entrambi i casi (t-test per dati appaiati).

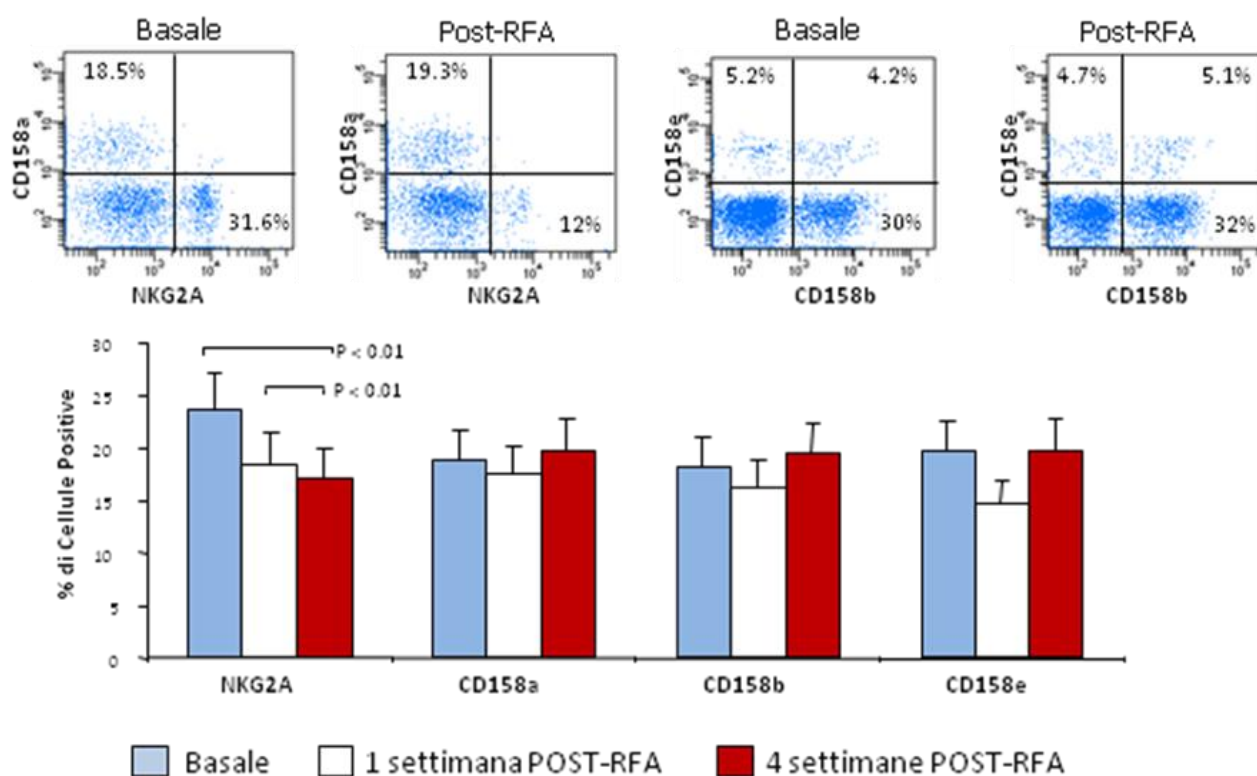


Figura 9: Caratterizzazione fenotipica delle cellule NK: Espressione dei recettori di inibizione. Esempio di analisi della percentuale dei linfociti NK positivi per i recettori di inibizione studiati (NKG2A, CD158a, CD158b, CD158e) (in alto). Nella parte inferiore viene mostrata l'analisi statistica dell'espressione dei recettori di inibizione NK nella popolazione complessiva. NKG2A mostra una riduzione statisticamente significativa ad 1 e 4 settimane dal trattamento (t- test per dati appaiati).

Aumento della citotossicità NK-mediata dopo termoablazione con radiofrequenza

La capacità funzionale dei linfociti NK è stata valutata dapprima come capacità citotossica nei confronti di cellule target K562, linea cellulare priva di MHC di classe I.

Il test di citotossicità è stato eseguito su PBMC di 24 pazienti a rapporti effettore-target (E/T) crescenti (2.5:1, 5:1, 10:1, 20:1 and 40:1),

Come atteso, in accordo con l'analisi fenotipica, la lisi delle cellule K562 era significativamente maggiore dopo 4 settimane dal trattamento sia ex-vivo che dopo attivazione overnight con IL-15 delle PBMC (figura 10)

L'aumento della capacità citotossica si è mantenuto significativo anche dopo normalizzazione delle percentuali di lisi in rapporto alla frequenza delle NK di ciascun

paziente ad ogni punto-tempo (efficienza di citolisi). L'aumento dell'efficienza di citolisi indotta da termoablazione non era più dimostrabile con le PBMC pre-incubate in vitro con IL-15, suggerendo che le cellule NK ottenute dopo trattamento erano meno sensibili all'attivazione da IL-15 rispetto alle cellule ottenute al tempo basale probabilmente perché già parzialmente attivate.

A conferma delle risposte ottenute con le PBMC in toto, i linfociti NK sono stati purificati per selezione negativa da 5 pazienti scelti casualmente. Il profilo di risposta ottenuto con NK purificate ha confermato l'aumentata capacità citolitica (figura 11).

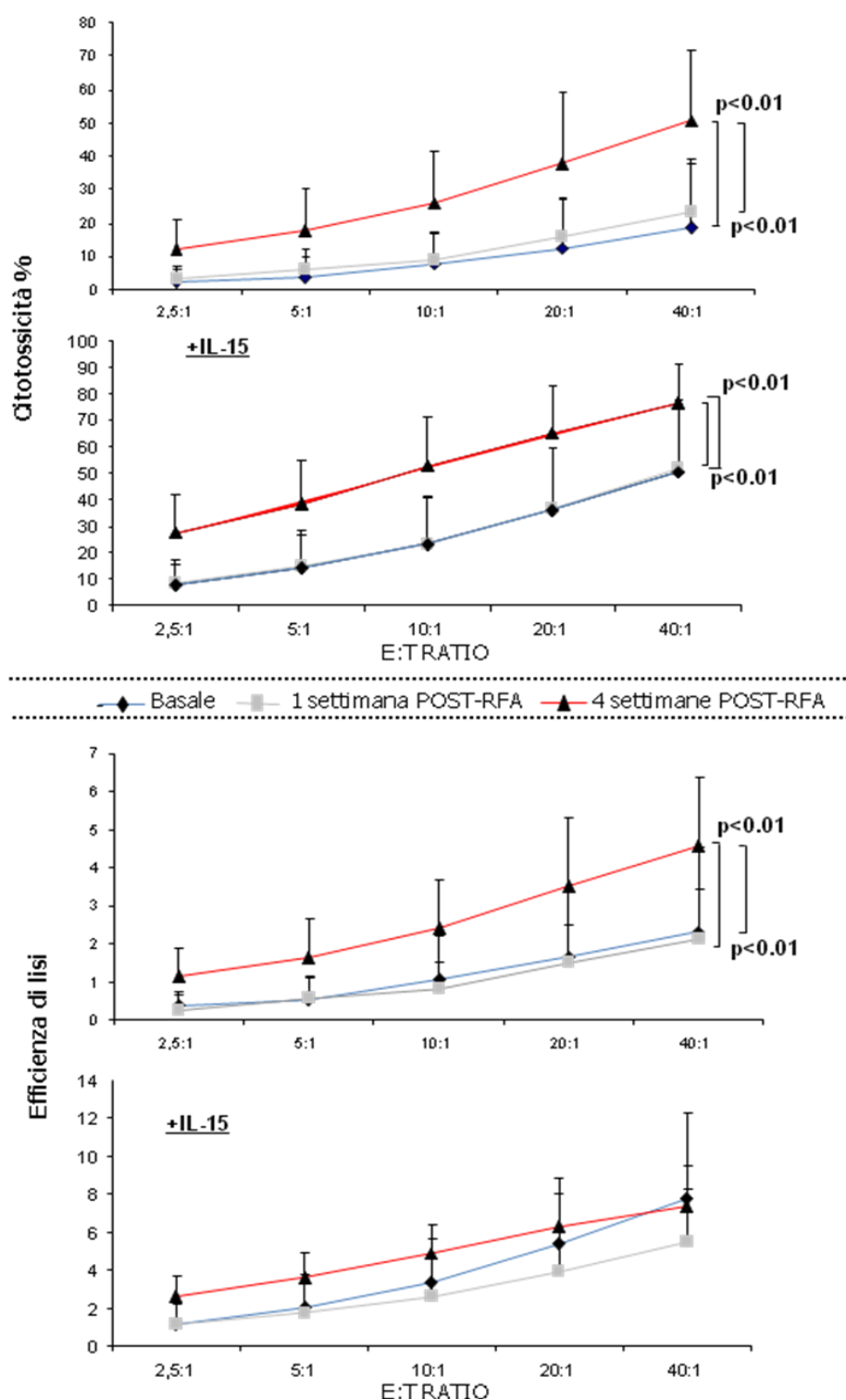


Figura 10: Aumento della citotossicità NKG2D mediata dopo 4 settimane dal trattamento di termo ablazione. Valutazione della citotossicità delle cellule NK contro cellule bersaglio (linea cellulare di eritroleucemia K562) a diversi rapporti effetttore-target (E/T). Nel pannello superiore sono mostrati i valori medi di citotossicità ottenuti ex-vivo e dopo stimolazione per 12 ore con IL-15. Nel pannello inferiore sono riportati i valori di citotossicità normalizzati in relazione alla frequenza delle cellule NK (% di lisi delle cellule target / % CD3-CD56+). La tendenza all'incremento significativo viene meno dopo esposizione a IL-15 delle cellule effettrici in vitro.

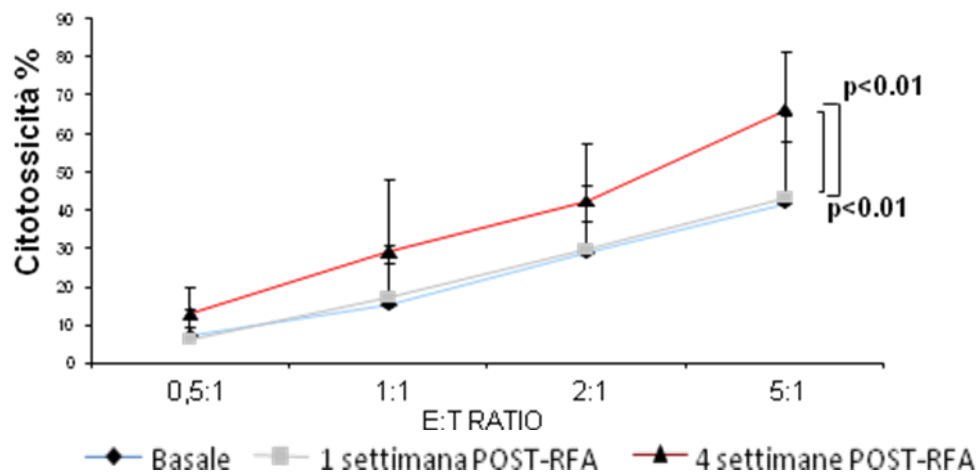


Figura 11: Valutazione della citotossicità naturale con NK purificate. I valori di citotossicità relativi alle cellule NK purificate mediante selezione negativa confermano la risposta ottenuta con le PBMC (t-test per dati appaiati).

Ad ulteriore conferma dell'aumentata citotossicità dei linfociti Natural Killer dopo termoablazione è stata valutata l'espressione di CD107a sulle cellule NK dopo pre-incubazione delle PBMC con le cellule target K562 in 12 pazienti selezionati casualmente.

Tale approccio ha confermato l'aumento di risposta citotossica NK a 4 settimane dal trattamento (figura 12).

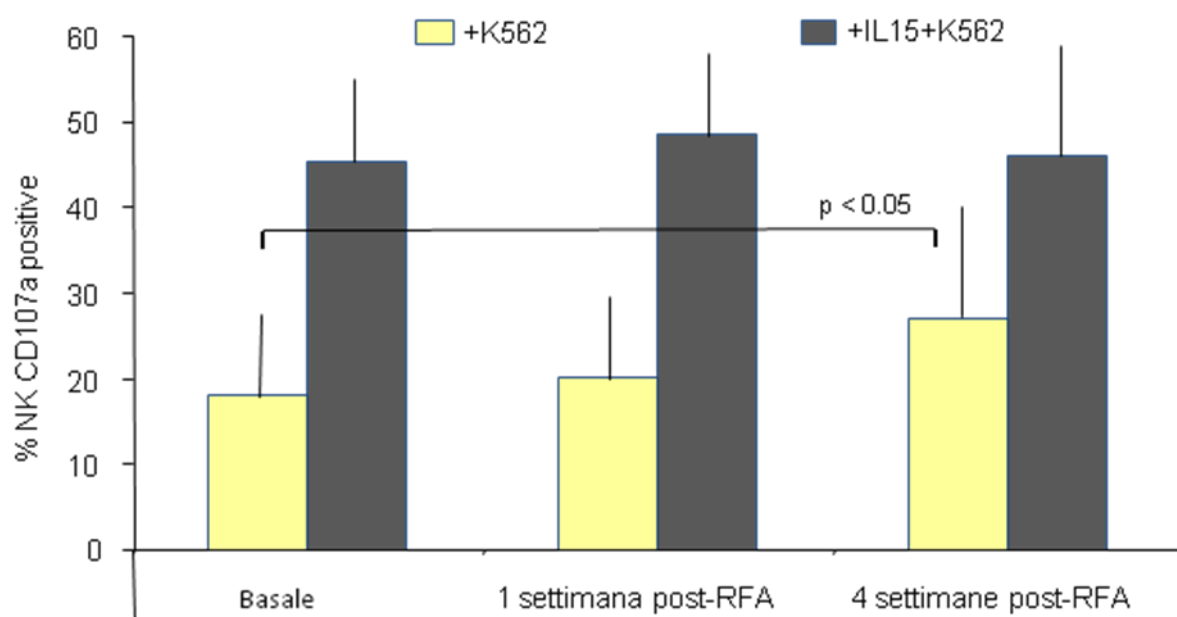


Figura 12: Analisi dell'espressione di CD107a come marker surrogato di citotossicità dopo 4 settimane dal trattamento di termo ablazione. L'aumento dell'espressione di CD107a ha confermato i dati di aumentata capacità citotossica delle cellule NK dopo trattamento di RFA. L'incremento significativo viene meno dopo esposizione a IL-15 delle cellule effettrici in vitro (t-test per dati appaiati).

Aumento della Citotossicità Cellulare Mediata da Anticorpi (ADCC) dopo termoablazione con radiofrequenza

I linfociti NK possiedono un recettore a bassa affinità per le IgG noto come CD16 o FcγIIIa, in grado di legare cellule opsonizzate da IgG ed indurre la distruzione per stimolazione dell'attività citolitica NK.

Al fine di valutare l'effetto della termoablazione sulla citotossicità cellulare mediata da anticorpi, abbiamo co-incubato le PBMC prelevate da 10 pazienti con la linea cellulare MDA-MB-361 di tumore mammario che esprime alti livelli di Her2; tali cellule sono state in parte pretrattate con anti-Her2 (trastuzumab - Herceptin®) e in parte con un anticorpo di controllo (anti-CD20, Rituximab®).

Come aspettato, l'anticorpo di controllo non mediava attività di ADCC, mentre un incremento significativo ($p < 0.01$) della lisi delle cellule MDA-MB-361 incubate con anti-Her2 era osservabile con le PBMC ottenute dopo 4 settimane dal trattamento (figura 13). L'incremento della ADCC si è mantenuto significativo ($p < 0.02$) anche dopo aver

calcolato l'efficienza di citolisi normalizzando il dato per la frequenza delle cellule Natural Killer.

L'aumento della capacità di citotossicità ADCC concordava con l'aumentata espressione di FcγRIIIa (CD16) ed è stato ulteriormente confermato utilizzando le cellule NK purificate ottenute da 4 pazienti selezionati in modo casuale (Figura 13, in basso).

Complessivamente, queste osservazioni dimostrano che il trattamento di termoablazione determina un aumento dell'efficacia della citotossicità cellulare mediata da anticorpi NK-mediata suggerendo una potenziale sinergia tra termoablazione con radiofrequenza e terapia con mAbs capaci di indurre ADCC, il cui utilizzo è in forte aumento in diversi tipi di tumori.

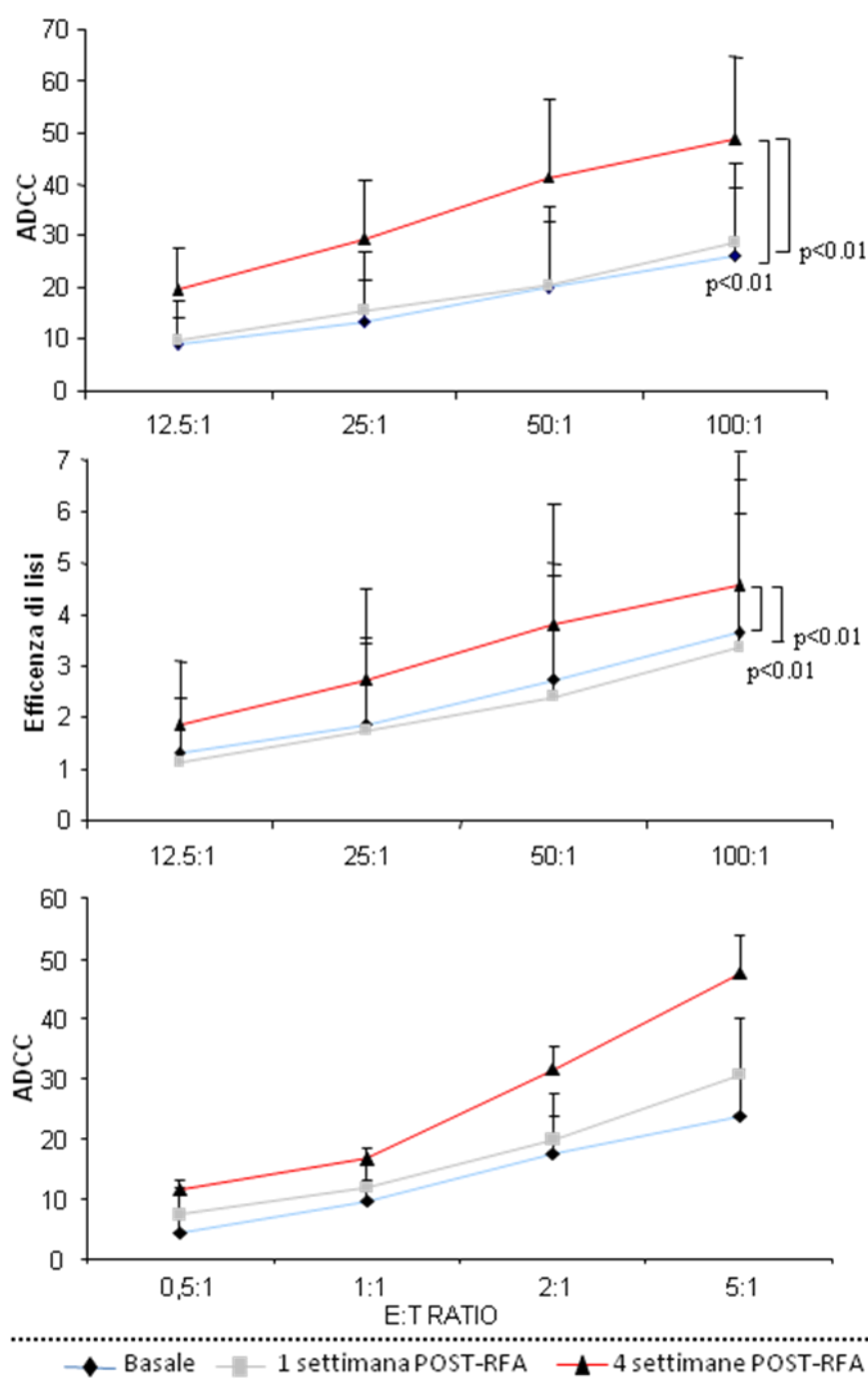


Figura 13: Aumento della Citotossicità Cellulare Mediata da Anticorpi (ADCC) dopo 4 settimane dal trattamento.

Le PBMC derivate da 10 pazienti sono state coincubate con cellule di tumore mammario Her2neu+ (MDA-MB-361) pretrattate con anti-Her2neu (Trastuzumab- Herceptin®) o con anticorpi di controllo (anti-CD20- Rituzumab®). Nel pannello superiore si possono osservare le percentuali medie di ADCC ottenute con PBMC ex vivo e, al centro, dopo normalizzazione in rapporto alla frequenza delle cellule NK CD3-CD56+. Nel pannello inferiore sono riportati i dati relativi alle cellule NK, purificate mediante selezione negativa dalle PBMC di 4 pazienti, allo scopo di confermare le risposte ottenute con le PBMC. (t-test per dati appaiati)

Aumento della produzione di IFN- γ da parte delle cellule NK dopo termoablazione con radiofrequenza

Le PBMC di 14 pazienti sono state stimulate “overnight” con IL-12 o con l’associazione IL-12/IL-18 al fine di stimolare la produzione di interferone- γ (IFN- γ) da parte delle cellule NK ed in particolare dei 2 subset CD56^{bright} e CD56^{dim}. Come atteso la popolazione di linfociti NK CD56^{bright} ha mostrato i maggiori livelli di produzione di IFN- γ (figura 14).

Un aumento significativo della frequenza di cellule NK CD56^{bright} capaci di produrre IFN- γ è stato osservato nelle PBMC prelevate a 4 settimane dalla termoablazione in particolare nella frazione stimolata con IL-12 ($p < .01$); mentre minore è risultato l’aumento ($p < .05$) dopo stimolo con IL-12/IL-18 (figura 14). Per quanto riguarda le cellule NK CD56^{dim}, si è potuta evidenziare solo una tendenza all’aumento dopo stimolazione con IL-12 a 4 settimane dal trattamento, ed un incremento minimo utilizzando la combinazione IL-12/IL-18. Questi risultati confermano i maggiori livelli di attivazione dei linfociti NK ad un mese dal trattamento di RFA.

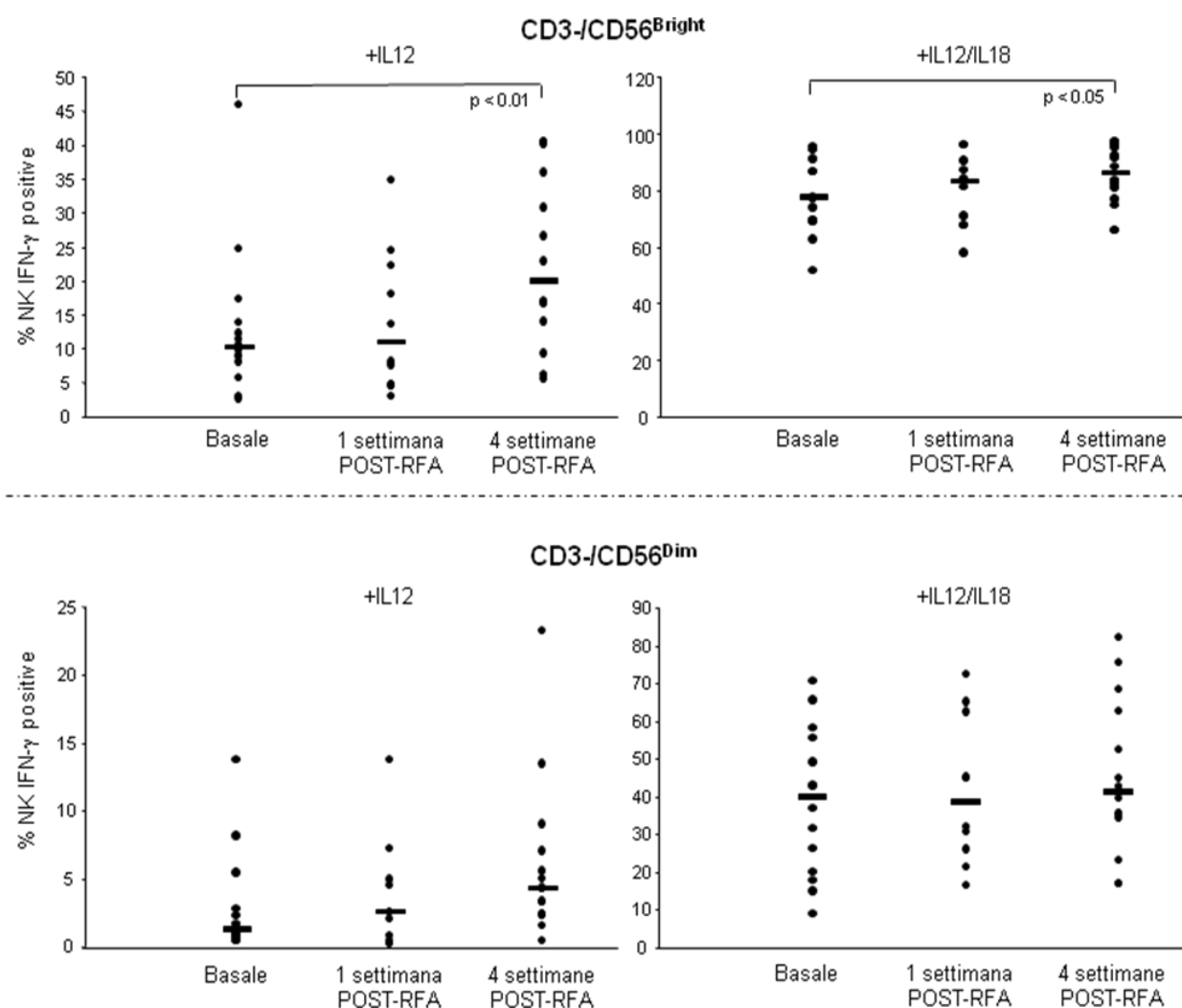


Figura 14: Aumento della produzione di IFN-γ da parte delle cellule NK CD56^{bright} dopo Termoablazione.

Le PBMC sono state incubate per 12 ore con IL-12 o con la combinazione IL-12/IL-18; nelle ultime tre ore è stata aggiunta Brefeldina A. Successivamente le cellule sono state marcate con anticorpi monoclonali per identificare le cellule NK IFNγ+ (CD56+CD3-). Nel pannello superiore sono mostrate le percentuali di cellule NK IFNγ+ CD56^{dim}CD3- dopo stimolazione con IL-12 e IL-12/18. Nel pannello inferiore sono indicate le percentuali di cellule NK IFNγ+ CD56^{bright}CD3- dopo stimolazione con IL-12 e IL-12/18 (t-test per dati appaiati).

Valutazione dei livelli di Interleuchina 15 e di HSP-70 sierici

La concentrazione serica di Interleuchina 15 e di HSP-70 (heat shock proteins 70) è stata valutata in 17 pazienti in cui era disponibile una aliquota di siero in tutti i punti tempo studiati al fine di cercare di definire il meccanismo responsabile della stimolazione delle cellule NK dopo termoablazione. IL-15 è una citochina che riveste un importante ruolo nell'espansione e nell'attivazione dei linfociti Natural Killer, mentre HSP-70 è una proteina della famiglia delle chaperonine che può essere rilasciata da stimoli quali il calore prodotto durante la termoablazione con radiofrequenze e che può giocare un ruolo importante nell'attivazione delle cellule NK.

Non sono stati osservati aumenti o riduzioni significativi dei livelli sierici delle due molecole dopo trattamento di termoablazione (figura 15). I livelli di IL-15 hanno mostrato un incremento a 4 settimane dal trattamento di RFA che, tuttavia, non raggiungeva la significatività statistica. Lo studio della correlazione fra le concentrazioni nel siero di IL-15 e di HSP-70 non ha mostrato alcuna associazione significativa né col numero di linfociti NK, né con i loro parametri fenotipici e funzionali.

Il mancato incremento IL-15 e di HSP-70 dopo trattamento può trovare varie spiegazioni quali cinetiche temporali differenti e/o l'espressione prevalente a livello del tessuto epatico delle due molecole.

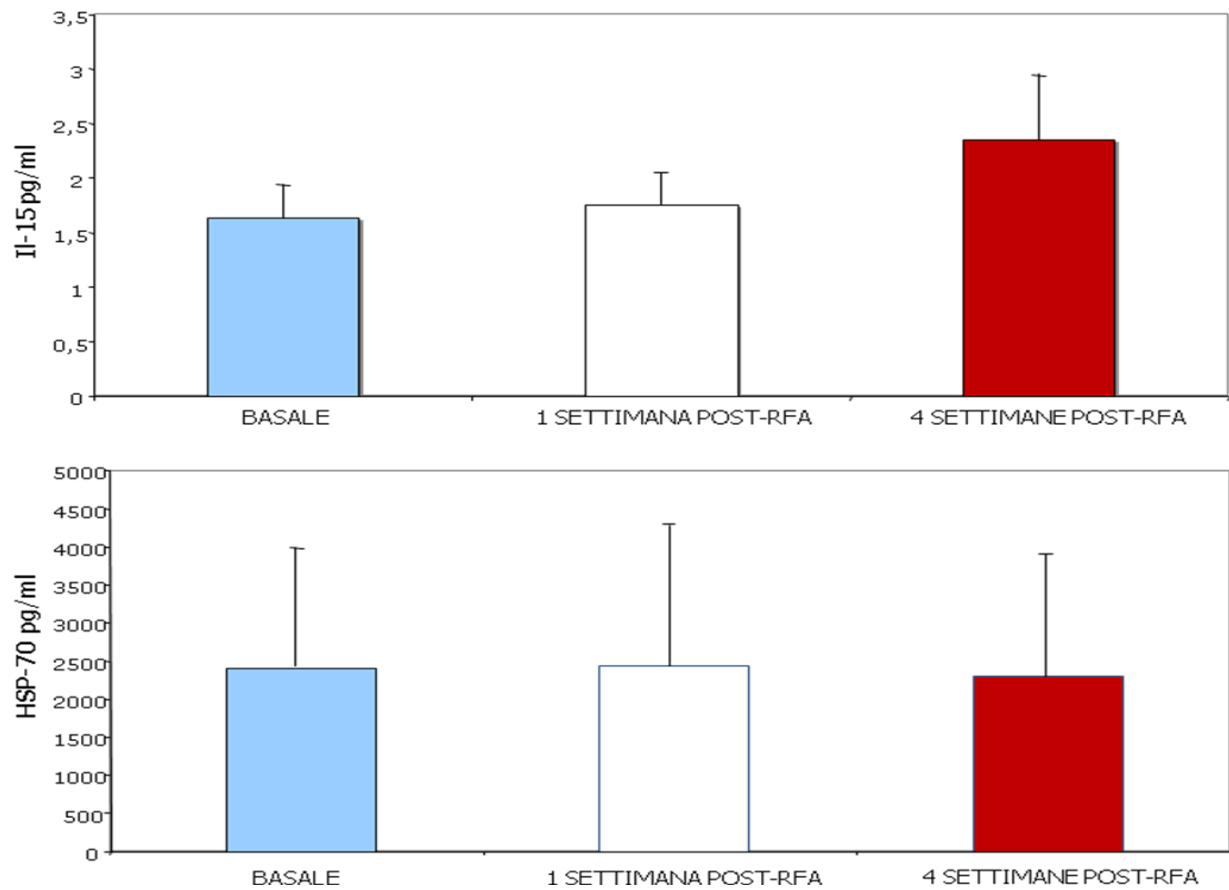


Figura 15: Analisi dei livelli di espressione sierica di Interleuchina 15 e di HSP-70. La concentrazione serica di Interleuchina 15 e di HSP-70 (heat shock proteins 70) è stata valutata in 17 pazienti nei punti tempo studiati. Non è stata individuata alcuna variazione significativa della concentrazione delle due molecole dopo trattamento di termoablazione (t-test per dati appaiati).

Analisi della frequenza dei linfociti T regolatori dopo termoablazione con radiofrequenza

I linfociti T regolatori CD4+/CD25+/FoxP3+ (Treg) sono in grado di inibire la funzionalità delle cellule Natural Killer e la loro capacità di espansione principalmente tramite meccanismi CTLA-4 mediati e TGF- β mediati. E' stata quindi valutata la frequenza dei linfociti Treg ai punti tempo analizzati e l'espressione CTLA-4 e TGF- β sulla superficie di questi.

Non è stata osservata alcuna variazione significativa nel numero di linfociti T regolatori dopo trattamento di RFA, sia se analizzato nell'ambito dei linfociti CD4+ sia sui linfociti CD3+ (figura 16).

Analogamente, la percentuale di linfociti Treg esprimenti il recettore CTLA-4 si è mostrata relativamente stabile sia in termini di frequenze di cellule positive sia in termini di intensità di espressione del recettore (figura 16, pannello inferiore).

Non è stato possibile determinare la percentuale e i livelli di TGF- β sulle cellule regolatorie in quanto sempre inferiori ai limiti di sensibilità strumentali (dato non mostrato).

Le frequenze delle cellule Treg sono state analizzate in funzione del numero dei linfociti Natural Killer e relativi parametri fenotipici e funzionali senza che emergesse alcuna correlazione statisticamente significativa.

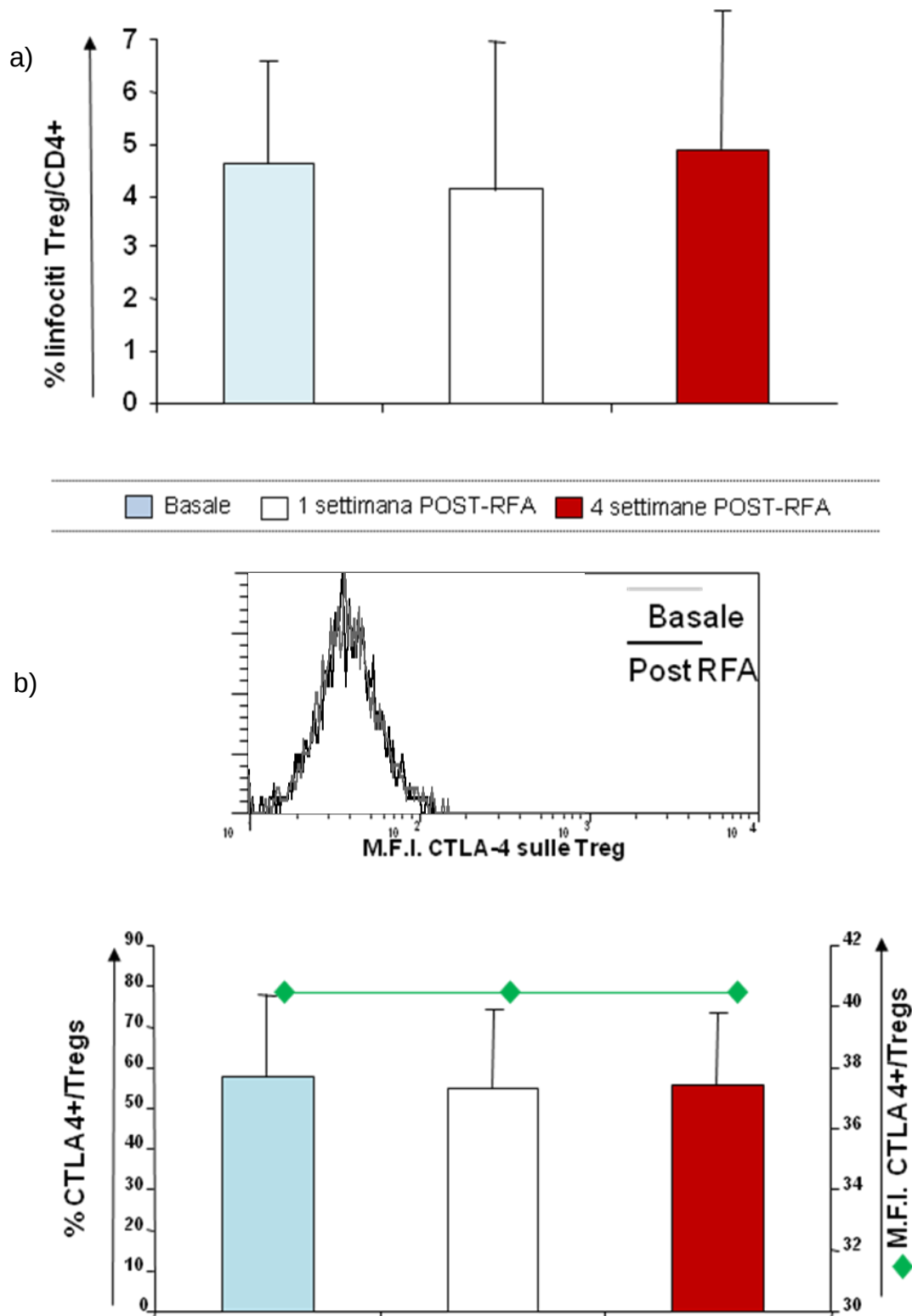


Figura 16: Analisi dei linfociti T regolatori. a) sono riportate le frequenze medie di linfociti T regolatori rilevate nei tre punti tempo studiati. Non è emersa alcuna variazione significativa dopo trattamento di RFA b) Esempio di analisi della intensità media di fluorescenza (M.F.I.) di CTLA4 sui linfociti Treg. (in alto). La frequenza di linfociti Treg esprimenti il recettore CTLA-4 non ha mostrato variazioni sia in termini di frequenze di cellule positive sia in termini di intensità di espressione del recettore (t- test per dati appaiati).

Parametri clinici e caratterizzazione fenotipica e funzionale delle cellule NK

Tutti i parametri fenotipici e funzionali indagati sono stati confrontati fra gruppi di pazienti al tempo basale, a una settimana e ad un mese dal trattamento di termoablazione.

I pazienti sono stati suddivisi in relazione alla eziologia della malattia di fegato su cui era insorto l'epatocarcinoma (HCV, 29 pazienti; non HCV, sia alcool che HBV, 8 pazienti), al sesso, alla mediana dell'età e delle dimensioni dei noduli.

Dividendo i pazienti sulla base delle dimensioni dei noduli di HCC (maggiore o minore di 24mm, dato che rappresentava la mediana dei diametri tumorali) è risultato che i soggetti con noduli tumorali di diametro maggiore presentavano un numero inferiore di cellule CD56 positive rispetto ai pazienti con noduli di minori dimensioni al tempo basale ($p < 0.05$, Mann Whitney U test) (Figura 17).

Dal momento che la risposta linfocitaria NK può essere deficitaria nei pazienti affetti da tumore, è stato ritenuto necessario escludere l'ipotesi che l'aumento del numero e della funzionalità dei linfociti NK dipendesse dalla riduzione del tessuto neoplastico, determinato dalla ablazione, piuttosto che dalla immunostimolazione indotta dalla termoablazione. Tuttavia, eseguendo una correlazione (test di Spearman) tra le dimensioni dei noduli e le modificazioni fenotipiche e funzionali dei linfociti NK, non si è osservato alcun dato significativo, escludendo così questa ipotetica interpretazione dei risultati.

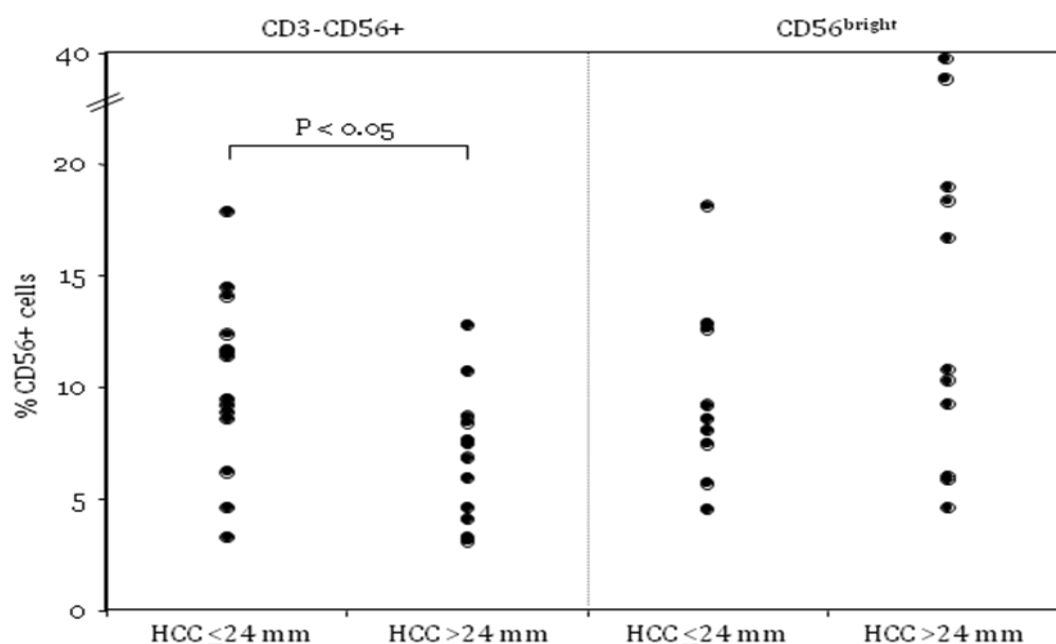


Figura 17: Riscontro di frequenze significativamente più alte di linfociti NK nei pazienti con tumori di dimensioni ridotte al tempo basale.

Le frequenze delle cellule CD6+CD3- era significativamente più alta nei pazienti coi minori diametri dei noduli di HCC. I pazienti sono stati divisi sulla base delle dimensioni dei noduli di HCC: maggiori o minori del valore mediano del diametro cumulativo (24 mm) dei noduli di HCC. Le frequenze dei linfociti NK CD56^{bright}/CD16+CD3- hanno mostrato un andamento opposto, ma in questo caso le differenze non raggiungevano la significatività statistica (correlazione per ranghi di Spearman).

Aumento della citotossicità e della produzione di IFN-γ e tempo alla recidiva

Un mese dopo aver eseguito il trattamento di termoablazione i pazienti sono stati sottoposti ad un primo controllo mediante TC con contrasto, volto ad accertare la completa necrosi del nodulo o dei noduli di epatocarcinoma; il follow-up mirato alla diagnosi precoce dell'eventuale recidiva si è basato sull'esecuzione di CEUS e TC a intervalli rispettivamente di 3 e 6 mesi.

Per comparare le variazioni dell'attività delle cellule NK e il tempo alla recidiva il campione dei pazienti è stato suddiviso in gruppi: pazienti con basso (50° percentile al di sotto della mediana) ed elevato (50° percentile al di sopra della mediana) aumento della citotossicità verso cellule K562; pazienti con basso (<50° percentile) e alto (>50° percentile) incremento della produzione di IFN-γ dopo stimolo con IL-12. I soggetti che

presentavano segni di malattia residua al primo controllo e quelli che avevano già subito in passato trattamenti ablativi sono stati esclusi da questa analisi.

Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier rappresentate nella figura 18 mostrano un periodo libero da malattia significativamente più lungo nei pazienti con maggiore aumento della citotossicità e produzione di IFN- γ a 4 settimane dal trattamento.

Al fine di escludere che tale prolungamento possa in realtà dipendere da noti fattori prognostici dell'epatocarcinoma, abbiamo operato dei confronti nei diversi gruppi di pazienti in base a numero e dimensioni dei noduli tumorali, età e livelli di α -fetoproteina: nessuno di questi parametri ha dimostrato di influire significativamente sul tempo di recidiva (dati non mostrati).

Pur con il limite del numero di pazienti studiati, lo studio suggerisce che l'attivazione della risposta Natural Killer indotta dal trattamento di termoablazione rappresenti un fattore capace di contribuire al controllo della recidiva di malattia.

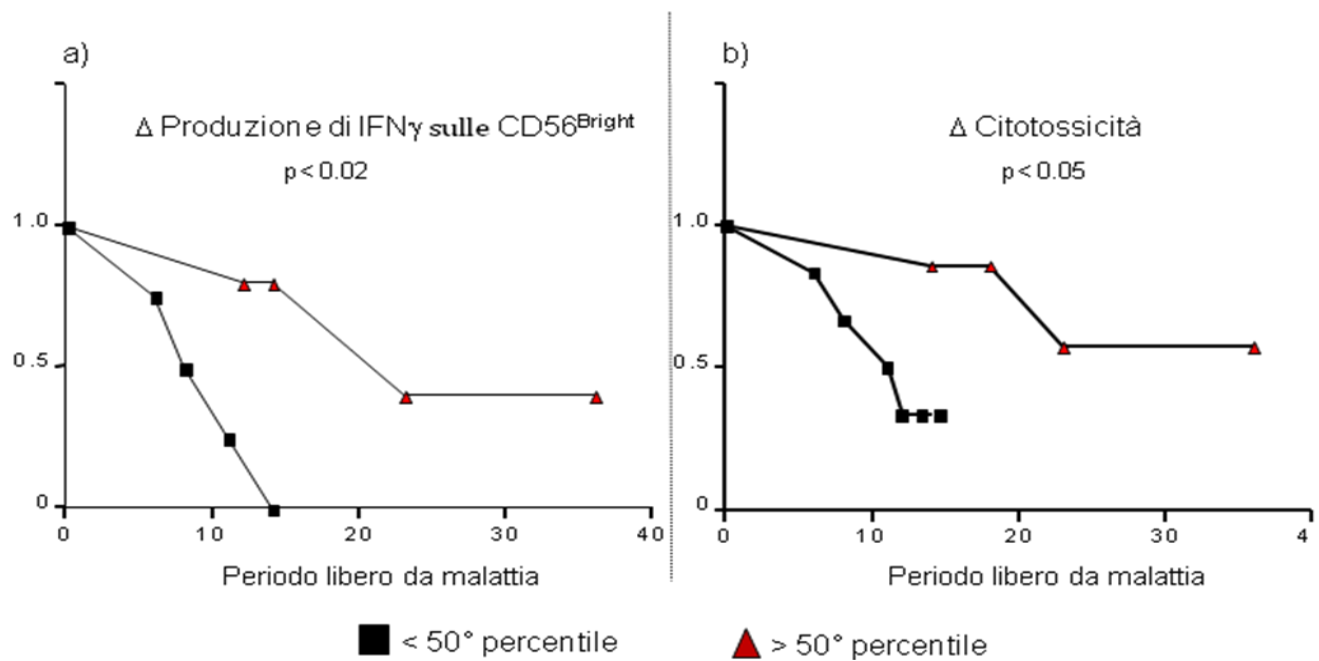


Figura 18: Attivazione funzionale delle cellule NK e tempo alla recidiva.

I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi in relazione all'alto (>50° percentile al di sopra della mediana) o basso (<50° percentile al di sotto della mediana) incremento della produzione di IFN- γ da parte delle cellule NK CD56^{bright} dopo stimolazione con IL-12 e all'alto o basso (al di sopra o al di sotto del valore mediano) incremento della citotossicità naturale nei confronti di cellule K562.

Le curve di Kaplan-Meier mostrano tempi alla recidiva statisticamente differenti dopo osservazione per un periodo compreso tra 12 e 38 mesi (Log Rank test).

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio dimostrano che il trattamento di termocoagulazione con radiofrequenza di noduli di HCC determina l'espansione di linfociti Natural Killer attivati nel sangue periferico estendendo le precedenti conoscenze relative all'effetto di tale terapia sulla risposta immunitaria innata e adattativa (67, 88, 89, 90).

Il trattamento di RFA non determina semplicemente a una mobilitazione periferica delle cellule NK; è stata infatti dimostrata una espansione dei linfociti NK CD56^{dim} dotate di fenotipo di cellule effettrici, caratterizzate dall'aumento dell'espressione dei recettori attivatori e dalla concomitante riduzione dell'espressione di quelli inibitori. Ne risultano un potenziamento della risposta citotossica naturale e anticorpo mediata e inoltre una maggiore capacità di secrezione di IFN- γ . Nel complesso, ogni modificazione osservata a carico delle cellule NK ha contribuito a delineare un fenotipo attivato, altamente differenziato, caratteristico di cellule effettrici/citotossiche.

Non è certo se l'incremento dei linfociti NK periferici osservato in questo studio sia l'esito di una vera e propria espansione di precursori localizzati negli organi linfoidi o di forme differenziate, o se rifletta piuttosto la mobilitazione e il passaggio in circolo di elementi preesistenti. Qualunque sia il preciso meccanismo, la termocoagulazione induce comunque una prolungata modificazione fenotipica e funzionale di tali cellule. Questo incremento numerico e funzionale dopo trattamento è in accordo con il fatto che il fegato è un organo particolarmente ricco di linfociti NK: questi rappresentano circa il 30-50% di tutti i linfociti infiltranti (91, 92), sono attivati e presentano un potenziale citotossico antitumorale superiore agli NK circolanti e di derivazione splenica, come è stato dimostrato sia nel topo (93) che nell'uomo (94). Quindi i linfociti NK che entrano in circolo dopo termocoagulazione potrebbero rappresentare la frazione periferica di un pool cellulare ricircolante tra il sangue periferico e il fegato e coinvolgente forse il tumore stesso. Tale fenomeno potrebbe essere indiretto, ovvero derivante da una riduzione della massa tumorale, oppure potrebbe essere una diretta conseguenza della termocoagulazione, per esempio attraverso il rilascio di fattori solubili ad azione

stimolatoria. Nel momento in cui è stata esaminata l'ipotesi dell'azione indiretta derivante dalla ablazione della massa tumorale, abbiamo trovato una relazione inversa tra le dimensioni del tumore e la frequenza di NK circolanti prima del trattamento, ma questa correlazione non sussisteva a 4 settimane dal trattamento. Inoltre, un precedente studio aveva già evidenziato che l'attività NK non è influenzata dall'asportazione chirurgica del tessuto neoplastico (95). Quindi la sola riduzione della massa tumorale non è in grado di aumentare il numero dei linfociti circolanti.

L'analisi delle frequenze e dei fenotipi dei linfociti T regolatori non ha evidenziato alcuna correlazione significativa col numero e coi parametri fenotipico funzionali dei linfociti NK, non lasciando quindi presupporre un'azione di regolazione su queste ultime, contrariamente a quanto osservato in altri modelli (96, 97). Restano comunque da definire altre modalità di regolazione quali l'interazione PD1-PDL1 che sono attualmente oggetto di studio nell'ambito di questo stesso progetto (98).

Diversi meccanismi possono spiegare l'effetto della reazione infiammatoria indotta dalla termoablazione: i linfociti NK possono essere reclutati sia dal TNF-alfa che dalle Heat Shock Proteins (HSPs); in seguito possono essere attivati localmente da citochine proinfiammatorie, come IL-2, IL-7, IL-1 e interferoni di tipo I, ed ancora dalle HSPs (99-105) che sono rilasciate dal calore nel corso del trattamento. Dopo questa prima fase di attivazione, il calore è in grado di aumentare l'espressione di MHC class I-related chains A and B (MICA/B) che possono interagire direttamente con il recettore NKG2D, attivando la risposta citotossica dei linfociti NK (106-108). Inoltre le HSPs possono anche attivare ed espandere i linfociti NK attraverso un'interazione diretta con questi elementi cellulari (109, 110).

Al momento sono poche le terapie capaci di indurre e attivare la popolazione Natural Killer in pazienti affetti da cancro. Sono stati condotti molti studi utilizzando citochine ricombinanti (IL-2, Interferoni di tipo I e II, IL-12, IL-15 etc) ed è stata dimostrata la loro efficacia nell'indurre la mobilitazione acuta e l'attivazione massiva delle cellule NK, ma in presenza di effetti avversi di tale intensità e frequenza da renderne impossibile l'utilizzo nell'ambito di terapie standard (111, 112). Questo è esattamente l'opposto di

quanto accade dopo termoablazione: espansione e attivazione mostrano intensità moderata ma protratta nel tempo e soprattutto sono apparentemente prive di qualsiasi effetto avverso.

I risultati riportati in questo studio possono rappresentare la base per lo sviluppo di nuove terapie destinate a soggetti portatori di tumori epatici primitivi e metastatici.

Come è stato mostrato, le cellule NK ottenute dopo RFA presentano un maggiore potenziale di ADCC diretto su cellule di carcinoma mammario che esprimono elevati livelli di Her2. Supponendo che lo stesso fenomeno osservato per l'epatocarcinoma possa essere riprodotto in pazienti con malattia epatica metastatica da carcinoma della mammella o da cancro del colon-retto suscettibili di trattamento di termoablazione, l'utilizzo combinato di questo trattamento ablativo e di anticorpi monoclonali, come lo stesso anti-Her2 (Trastuzumab), o anti-EGFR come Cetuximab e Panitumumab, potrebbe potenziare i meccanismi ADCC *in vivo* con una maggiore efficacia terapeutica rispetto all'uso indipendente delle due strategie terapeutiche (113).

Inoltre, recenti studi hanno mostrato che inibitori dei proteosomi come Bortezomib sono in grado di rendere HCC e altri tipi di tumori maggiormente sensibili alla lisi cellulare mediata da NKG2D o TRAIL (114, 115). Sfruttando questo meccanismo l'effetto della termoablazione potrebbe quindi favorire la risposta anti-tumorale NK.

Lo sviluppo di un efficiente ed efficace immunoterapia attiva prevede comunque che molti meccanismi negativi siano superati; l'esaurimento (exhaustion) funzionale T linfocitario come la carenza di risposta T helper, le cellule regolatorie o l'inadeguata o debole costimolazione, devono ancora essere risolte (115-119). Gli stessi linfociti NK possono agire da cellule regolatorie influenzando altri tipi cellulari. Studi recenti hanno dimostrato che la deplezione selettiva di cellule NK permette la maturazione e differenziamento di linfociti T CD8+ tumore specifici conseguendo il controllo di neoplasie indotte (79, 80).

Benché lo studio non sia stato concepito con l'intenzione di definire gli effetti della risposta NK sul decorso clinico, i risultati ottenuti sono tali da suggerire che

l'attivazione della risposta NK indotta dalla termoablazione, possa essere un indicatore predittivo della risposta clinica al trattamento termoablativo dell'HCC (120). Sarà quindi necessario realizzare nuovi studi di tipo prospettico volti a definire il ruolo dell'attività NK nel controllo della recidiva dell'HCC nei pazienti sottoposti a trattamento di termoablazione.

In conclusione, il trattamento di termoablazione con radiofrequenza non si limita a distruggere il tessuto tumorale epatico mediante necrosi termoindotta e a determinare la mobilitazione di cellule linfoidi nei distretti periferici durante la risposta di fase acuta, ma è anche in grado di indurre il rilascio di segnali di pericolo che attivano la risposta immunologica cellulo-mediata in modo duraturo e con potenziale impatto clinico.

BIBLIOGRAFIA

1. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2003; 362:1907-17.
2. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557-76.
3. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. International Agency for Research on Cancer CancerBase no. 5. Lyon, France: IARC Press, 2001.
4. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. SEER*Stat database: incidence — SEER 9 Regs research data, Nov 2009 Sub (1973-2007). Bethesda, MD: National Cancer Institute, April 2010.
5. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2008. (<http://globocan.iarc.fr>.)
6. Colombo M. Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*. 1999; 19:263-9.
7. El-Serag HB, and Mason AC. Rising Incidence of Hepatocellular Carcinoma in the United States. *N Eng J Med* 1999; 340:745-750.
8. Block TM, Mehta AS, Fimmel CJ, Jordan R. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 5093- 5107.
9. Wang XW, Hussain SP, Huo TI, Wu CG, Forgues M, Hofseth LJ, Brechot C, et al. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002; 181-182: 43-47.
10. Feitelson MA, Sun B, Satioglu Tufan NL, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 2593-2604.
11. Chirillo P, Pagano S, Natoli G, Puri PL, Burgio VL, Balsano C, Levrero M. The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8162-8167.
12. Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 329-338.
13. Rossi S, Ravetta V, Rosa L, Ghittoni G, Viera FT, Garbagnati F, Silini EM, Dionigi P, Calliada F, Quaretti P, Tinelli C. Repeated radiofrequency ablation for management of patients

with cirrhosis with small hepatocellular carcinomas: a long-term cohort study. *Hepatology*. 2011 ;53:136-47.

14. Kojiro M. Focus on dysplastic nodules and early hepatocellular carcinoma: an Eastern point of view. *Liver Transpl*. 2004 ;10:S3-8.

15. Verslype C, Van Cutsem E, Dicato M, Arber N, Berlin JD, Cunningham D, De Gramont A, Diaz Rubio E, Ducreux M, Gruenberger T, Haller D et al: The management of hepatocellular carcinoma. Current expert opinion and recommendations derived from the 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2008, *Annals of oncology* 20 suppl 7: 71-75, 2009.

16. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E; EASL Panel of Experts on HCC. Clinical Management of Hepatocellular Carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. *J Hepatol* 2001; 35: 421–30.

17. Colombo M, Sangiovanni A. The European approach to hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 12-16.

18. Choi D, Kim SH, Lim JH, Cho JM, Lee WJ, Lee SJ, Lim HK. Detection of hepatocellular carcinoma: combined T2-weighted and dynamic gadolinium-enhanced MRI versus combined CT during arterial portography and CT hepatic arteriography. *J Comput Assist Tomogr* 2001; 25:777-85.

19. Giannelli G, Antonaci S: New frontiers in biomarkers for hepatocellular carcinoma, *Digest liver disease* 38: 854-859, 2006.

20. Pinedo HM, van Groenigen CJ. Emerging new opportunities for patients with hepatic metastases from colorectal cancer or primary hepatocellular cancer. *Oncologist*. 2001; 6:12-3.

21. Lencioni RA, Allgaier HP, Cioni D, Olschewski M, Deibert P, Crocetti L, Frings H, Laubenberger J, Zuber I, Blum HE, Bartolozzi C. Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radiofrequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection. *Radiology* 2003 228:235-40.

22. Curley SA. Radiofrequency ablation of malignant liver tumors. *Oncologist*. 2001; 6:14-23.

23. Bilchik AJ, Wood TF, Allegra DP. Radiofrequency ablation of unresectable hepatic malignancies: lessons learned. *Oncologist*. 2001; 6:24-33.

24. Keating GM, Santoro A. Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma. *Drugs*. 2009 ;69:223-40.

25. Lau WY, Lai EC. The current role of radiofrequency ablation in the management of hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Ann Surg.* 2009; 249:20-5.
26. Gillams AR, Lees WR. Five-year survival in 309 patients with colorectal liver metastases treated with radiofrequency ablation. *Eur Radiol* 2009 ;19:1206-13.
27. Steger AC, Lees WR, Masters A, Walmsley K, Bown SG. Interstitial laser hyperthermia. *BMJ* 1989; 299: 1219-20.
28. Goldberg SN, Gazelle GS, Dawson SL et al. Tissue ablation with radiofrequency: effect of probe size, gauge, duration, and temperature on lesion volume. *Acad Radiol* 1990; 2: 399-404.
29. Goldberg SN, Gazelle GS, Dawson SL, Rittman WJ, Mueller PR, Rosenthal DI. Tissue ablation with radiofrequency: effect of probe size, gauge, duration, and temperature on lesion volume. *Acad Radiol.* 1995 ;2:399-404.
30. McGahan JP, Wei-Zhong G, Brock JM, Tessluk H, Jones CD. Hepatic ablation using bipolar radiofrequency electrocautery. *Acad Radiol* 1996; 3:418-22.
31. Rossi S, Di Stasi M, Buscarini E, Quaretti P, Garbagnati F, Squassante L, Paties CT, Silverman DE, Buscarini L. Percutaneous RF interstitial thermal ablation in the treatment of hepatic cancer. *AJR Am J Roentgenol.* 1996 ;167:759-68.
32. Goldberg SN, Solbiati L, Hahn PF et al. Radio-frequency tumor ablation using a clustered electrode technique: results in animals and patients with liver metastases. *Radiology* 1998; 209: 371-79.
33. Miao Y, Ni Y, Mulier S, Wang K, Hoey MF, Mulier P, Penninckx F, Yu J, De Scheerder I, Baert AL, Marchal G. Ex vivo experiment on radiofrequency liver ablation with saline infusion through a screw-tip cannulated electrode. *J Surg Res.* 1997 15;71:19-24.
34. Livraghi T, Goldberg SN, Monti F, Bizzini A, Lazzaroni S, Meloni F, Pellicanò S, Solbiati L, Gazelle GS. Saline-enhanced radio-frequency tissue ablation in the treatment of liver metastases. *Radiology.* 1997 ;202:205-10.
35. Goldberg SN, Stein M, Gazelle GS, Kruskal JB, Clouse ME. Percutaneous radiofrequency tissue ablation: optimization of pulsed-RF technique to increase coagulation necrosis. *J Vasc Interv Radiol* 1999; 10: 907-16
36. Enrich, P. Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneeskd* 1909; 5: 273-290.
37. Thomas L. In cellular and Humoral Aspects of the Hipersensitive states (ed. Lawrence H.S) 1959; 529-532.

38. Burnet F.M: The concept of immunological surveillance. Prog. Exp. Tumor Res.1970; 13: 1-27.
39. Herberman R.B. and Holden H.T. Natural cell-mediated immunity. Adv. Cancer Res. 1978; 27: 305-377.
40. Dighe A.S. Richard E, Old L.J, Schreiber R.D. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative INF γ receptors. Immunity. 1994 1: 447-456.
41. Russel J H, Ley T J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. Annu . Rev. Immunol. 2002; 20: 323-370.
42. van de Broek, M. F et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. J. Exp. Med. 1996; 184: 1781-1790.
43. Girardi, M. et al. Regulation of cutaneous malignancy by $\gamma\delta$ T cells. Science. 2001; 294: 605-609.
44. Rosenberg SA, Yang CJ, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. Nat Med. 2004; 10: 909-915
45. Coulie GC, Hanagiri T, Takenoyama M. From tumor antigens to immunotherapy. Int J Clin Oncol 2001; 6:163–170
46. Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol. 2002 3: 991-8.
47. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD The three ES of cancer immunoediting Annu. Rev. Immunol.2004; 22: 329-360
48. Shankaran, V., H. Ikeda, et al.. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. Nature 2001; **410**: 1107-11
49. Street, S. E., E. Cretney, et al.. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis." Blood. 2001; **97**: 192-7.
50. Dunn, G. P., C. M. Koebel, et al. Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat Rev Immunol 2001; **6**: 836-48.
51. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. Annu Rev Immunol. 2011; 23:235-71.
52. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. Nat Rev Immunol. 2006 ; 6:715-27.

53. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002; 3:991-8.
54. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol.* 2002; 3:999-1005.
55. Radoja S, Rao TD, Hillman D, Frey AB. Mice bearing late-stage tumors have normal functional systemic T cell responses in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2000; 164:2619-28.
56. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med.* 2003; 9:1269-74.
57. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011; 23:29:235-71.
58. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1999; 59:3128-33.
59. Mazzone A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, Zanovello P, Segal DM. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol.* 2002 Jan 15;168(2):689-95.
60. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol.* 2004 ;4:941-52.
61. Wissniowski TT, Hansler J, Neureiter D, Frieser M, Schaber S, Esslinger B, Voll R, Strobel D, Hahn EG, Schuppan D, Wissniowski TT, Hunsler J. Activation of tumor-specific T lymphocytes by radio-frequency ablation of the VX2 hepatoma in rabbits. *Cancer Res.* 2003 63: 6496-500.
62. den Brok MH, Suttmuller RP, van der Voort R, Bennink EJ, Figdor CG, Ruers TJ, Adema GJ. In situ tumor ablation creates an antigen source for the generation of antitumor immunity. *Cancer Res.* 2004 ;64:4024-9.
63. Zerbini A, Pilli M, Laccabue D, Pelosi G, Molinari A, Negri E, Cerioni S, Fagnoni F, Soliani P, Ferrari C, Missale G. Radiofrequency thermal ablation for hepatocellular carcinoma stimulates autologous NK-cell response. *Gastroenterology.* 2010 ;138 :1931-42.
64. Goldberg SN, Gazelle GS, Dawson SL et al. Tissue ablation with radiofrequency: effect of probe size, gauge, duration, and temperature on lesion volume. *Acad Radiol* 1990; 2: 399-404.

65. Goldberg SN, Solbiati L, Hahn PF et al. Radio-frequency tumor ablation using a clustered electrode technique: results in animals and patients with liver metastases. *Radiology* 1998; 209: 371-79.
66. Gravante G, Sconocchia G, Ong SL, et al. Immunoregulatory effects of liver ablation therapies for the treatment of primary and metastatic liver malignancies. *Liver Int* 2009; 29:18-24.
67. Zerbini A, Pilli M, Penna A, et al: Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma liver nodules can activate and enhance tumor-specific T-cell responses. *Cancer Res* 2006; 66:1139-1146.
68. Napoletano C, Taurino F, Biffoni M, et al. RFA strongly modulates the immune system and anti-tumor immune responses in metastatic liver patients. *Int J Oncol* 2008;32:481-90.
69. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005;23:225-74.
70. Moretta L, Bottino C, Pende D, et al. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol* 2006; 18:151-8.
71. Cooper MA, Fehniger TA and Caligiuri MA. The biology of human natural killer –cells subsets. *Trends in immunology*. 2001; 22:633-640.
72. Sutlu T, Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med*. 2009; 266:154-81.
73. Long, E.O. Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells. *Immunity* **26**, 385–387 (2007).
74. Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L. & Vivier, E. Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force.” *Blood* 2005; 106:2252–2258.
75. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006; 439:682-7.
76. Benson DM Jr, Bakan CE, Mishra A, Hofmeister CC, Efebera Y, Becknell B, Baiocchi RA, Zhang J, Yu J, Smith MK, Greenfield CN, Porcu P, Devine SM, Rotem-Yehudar R, Lozanski G, Byrd JC, Caligiuri MA. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood*. 2010; 116:2286-94.
77. Bertram EM, Dawicki W, Sedgmen B, Bramson JL, Lynch DH, Watts TH. A switch in costimulation from CD28 to 4-1BB during primary versus secondary CD8 T cell response to influenza in vivo. *J Immunol*. 2004; 172:981-8.

78. Crawford A, Wherry EJ. The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr Opin Immunol*. 2009; 21:179-86.
79. Zecher D, Li Q, Oberbarnscheidt MH, Demetris AJ, Shlomchik WD, Rothstein DM, Lakkis FG. NK cells delay allograft rejection in lymphopenic hosts by downregulating the homeostatic proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol*. 2010; 184:6649-57.
80. Soderquest K, Walzer T, Zafirova B, Klavinskis LS, Polić B, Vivier E, Lord GM, Martín-Fontecha A. Cutting edge: CD8+ T cell priming in the absence of NK cells leads to enhanced memory responses. *J Immunol*. 2011; 186:3304-8.
81. Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, Cocco L, Vitale M. NK cells and cancer. *J Immunol*. 2007; 178:4011-6.
82. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T et al. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 2005; 43: 1013–20.
83. Taketomi A, Shimada M, Shirabe K, Kajiyama K, Gion T, Sugimachi K. Natural killer cell activity in patients with hepatocellular carcinoma: a new prognostic indicator after hepatectomy. *Cancer* 1998; 83: 58–63.
84. Farag SS, Fehniger TA, Becknell B, et al. New directions in natural killer cell-based immunotherapy of human cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:237-50.
85. Mazzolini G, Prieto J, Melero I. Gene therapy of cancer with interleukin-12. *Curr Pharm Des*. 2003; 9:1981-91.
86. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:1789-96.
87. Weng W-K, Levy R: Two immunoglobulin G fragment receptors polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2003; 21:3940-3947.
88. Gravante G, Sconocchia G, Ong SL, et al. Immunoregulatory effects of liver ablation therapies for the treatment of primary and metastatic liver malignancies. *Liver Int* 2009; 29:18-24.
89. Zerbini A, Pilli M, Fagnoni F et al. Increased immunostimulatory activity conferred to antigen-presenting cells by exposure to antigen extract from hepatocellular carcinoma after radiofrequency thermal ablation. *J Immunother* 2008; 31:271-82.

90. Napoletano C, Taurino F, Biffoni M, et al. RFA strongly modulates the immune system and anti-tumor immune responses in metastatic liver patients. *Int J Oncol* 2008;32:481-90.
91. Yamagiwa S, Kamimura H, Ichida T. Natural killer cell receptors and their ligands in liver diseases. *Med Mol Morphol* 2009;42:1-8.
92. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 2008;47:729-36.
93. Vermijlen D, Luo D, Froelich CJ, et al. Hepatic natural killer cells exclusively kill splenic/blood natural killer-resistant tumor cells by the perforin/granzyme pathway. *J Leukoc Biol* 2002;72:668-76.
94. Ishiyama K, Ohdan H, Ohira M, et al. Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans. *Hepatology* 2006;43:362-72.
95. Kwon AH, Matsui Y, Kamiyama Y. Perioperative blood transfusion in hepatocellular carcinomas: influence of immunologic profile and recurrence free survival. *Cancer* 2001;91:771-8.
96. Hong H, Gu Y, Zhang H, Simon AK, Chen X, Wu C, Xu XN, Jiang S. Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells enhances natural killer T cell-mediated anti-tumour immunity in a murine mammary breast cancer model. *Clin Exp Immunol*. 2010 ;159:93-9.
97. Lundqvist A, Yokoyama H, Smith A, Berg M, Childs R. Bortezomib treatment and regulatory T-cell depletion enhance the antitumor effects of adoptively infused NK cells. *Blood*. 2009 11;113:6120-7.
98. Benson DM Jr, Bakan CE, Mishra A, Hofmeister CC, Efebera Y, Becknell B, Baiocchi RA et al.. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood*. 2010 ;116:2286-94.
99. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, et al. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999;17:189-220.
100. Young HA, Ortaldo J. Cytokines as critical co-stimulatory molecules in modulating the immune response of natural killer cells. *Cell Res* 2006;16:20-4.
101. Lotzová E. Definition and functions of natural killer cells. *Nat Immun*. 1993;12:169- 76.
102. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, et al. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK-cell responses to viral infection. *J Immunol* 2002;169:4279-87.

103. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 1994;180:1395-403.
104. Gastpar R, Gross C, Roszbacher L, et al. The cell surface-localized heat shock protein 70 epitope TKD induces migration and cytolytic activity selectively in human NK-cells. *J Immunol* 2004;172:972-80.
105. Gastpar R, Gehrmann M, Bausero MA et al. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 2005;65:5238–5247.
106. Gleimer M, Parham P. Stress management: MHC class I and class I-like molecules as reporters of cellular stress. *Immunity* 2003;19:469-77.
107. Cerwenka A. New twist on the regulation of NKG2D ligand expression. 2009;206:265-8.
108. Qiao Y, Liu B, Li Z. Activation of NK-cells by extracellular heat shock protein 70 through induction of NKG2D ligands on dendritic cells. *Cancer Immun* 2008;10:8- 12.
109. Gross C, Schmidt-Wolf IG, Nagaraj S, et al. Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells. *Cell Stress Chaperones* 2003;8:348-60.
110. Pilla L, Squarcina P, Coppa J, et al. Natural killer and NK-Like T-cell activation in colorectal carcinoma patients treated with autologous tumor-derived heat shock protein 96. *Cancer Res* 2005;65:3942-9.
111. Farag SS, Fehniger TA, Becknell B, et al. New directions in natural killer cell-based immunotherapy of human cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:237-50.
112. Mazzolini G, Prieto J, Melero I. Gene therapy of cancer with interleukin-12. *Curr Pharm Des.* 2003;9:1981-91.
113. Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2007;13:1552-61.
114. Armeanu S, Krusch M, Baltz KM, et al. Direct and natural killer cell-mediated antitumor effects of low-dose bortezomib in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:3520-8.
115. William H.D. Hallett, Erik Ames, et al. Sensitization of Tumor Cells to NK-Cell-Mediated Killing by Proteasome Inhibition. *J Immunol* 2008;180:163-170.
116. Frey AB, Monu N. Signaling defects in anti-tumor T cells. *Immunol Rev.* 2008 Apr;222:192-205.

117. Gehring AJ, Ho ZZ, Tan AT, Aung MO, Lee KH, Tan KC, Lim SG, Bertoletti A. Profile of tumor antigen-specific CD8 T cells in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2009 Aug;137(2):682-90.
118. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009 Aug 20;114(8):1537-44
119. Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother*. 2007 May;56(5):739-45.
120. Zerbini A, Pilli M, Laccabue D, Pelosi G et al. Radiofrequency thermal ablation for hepatocellular carcinoma stimulates autologous NK-cell response. *Gastroenterology*. 2010 ;138 :1931-4