



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**  
**DIPARTIMENTO DI MEDICINA AMBIENTALE E**  
**SANITÀ PUBBLICA**

**DOTTORATO DI RICERCA**  
**TERRITORIO, AMBIENTE, RISORSE E**  
**SALUTE**

**INDIRIZZO IN MEDICINA AMBIENTALE:**  
**NUTRIZIONE E INQUINAMENTO**

*CICLO XX*

**Studio epidemiologico sull'effetto protettivo**  
**contro il melanoma del vaccino anti febbre**  
**gialla**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Vasco Boatto

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Giuseppe Rausa

**Dottorando :** Dott.ssa Alessandra Buja

*DATA CONSEGNA TESI*

31 gennaio 2008

## *Ringraziamenti*

*Un particolare ringraziamento va al prof. Giuseppe Mastrangelo perché mi ha permesso di svolgere questo studio appassionante, e perché mi ha stimolato a lavorare per una Ricerca che abbia sempre come obiettivo primario la salute delle persone.*

*Un ringraziamento doveroso alla Dott.ssa Emanuela Fadda, per il suo meticoloso e prezioso contributo nell'imputazione dei dati.*

*Un ringraziamento a Dott. Paolo Paruzzolo per il suo originale contributo nella creazione di un programma per l'imputazione dei dati.*

*Un ringraziamento al Dott. Stefano Guzzinati e alla Dott.ssa Carmen Stocco del Registro Tumori del Veneto per la gentilezza e puntualità con cui hanno risposto alle molteplici domande.*



RIASSUNTO.....	5
SUMMARY.....	11
INTRODUZIONE.....	15
MELANOMA .....	15
FEBBRE GIALLA.....	30
MALATTIE INFETTIVE, VACCINAZIONI E PREVENZIONE DEI TUMORI, IN PARTICOLARE DEL MELANOMA.....	48
MATERIALI & METODI.....	74
FASI PRELIMINARI DELLA RICERCA.....	74
METODI .....	77
RISULTATI.....	87
ANALISI DESCRITTIVA DELLA COORTE.....	87
STUDIO COORTE.....	88
STUDIO CASO-CONTROLLO INNESTATO NELLA COORTE.	92
DISCUSSIONE .....	95
INTERPRETAZIONE FISIOPATOLOGICA .....	95
INTERPRETAZIONE DATI EPIDEMIOLOGICI.....	104
LIMITI DELLO STUDIO .....	106
CONCLUSIONI .....	107
BIBLIOGRAFIA .....	109



# RIASSUNTO

---

## **Introduzione**

Uno studio europeo multicentrico caso-controllo ha evidenziato una riduzione del rischio di melanoma associata alla vaccinazione BCG e antivaioiosa, eseguite nella prima infanzia, e/o a malattie infettive occorse in età adulta. Sulla base di queste osservazioni è stata proposta un'ipotesi d'immunosorveglianza del melanoma. Questa ipotesi deriva dall'evidenza della presenza di un "marker of melanoma risk", una proteina presente nella stragrande maggioranza dei melanomi e dei nevi displastici ma non nei tessuti sani. Questa proteina è prodotta dal env-gene di un retrovirus endogeno umano di tipo K (HERV-K), ed è stata denominata HERV-K-MEL. La proteina HERV-K-MEL, o "marker of melanoma risk", mostra omologie nella sequenza di aminoacidi con una proteina enzimatica presente nel nucleo, il fattore Oxygen Responsive Element Binding Protein (OREBP), che inibisce l'espressione di glutatione per ossidasi. Per questa omologia con OREBP, anche la proteina HERV-K-MEL inibisce l'espressione di glutatione perssidasi. Tale inibizione induce uno stress ossidativo cellulare dovuto a un eccesso intracellulare di radicali liberi dell'ossigeno, che non vengono adeguatamente metabolizzati dalla glutatione perossidasi. Questo può condurre ad una trasformazione maligna della cellula a distanza d'anni o di decenni e quindi alla formazione del melanoma. D'altra parte, la proteina HERV-K-MEL è un antigene che presenta inaspettate omologie con antigeni d'origine batterica e virale. Una reazione immune diretta contro questi ultimi antigeni porterebbe all'inattivazione della stessa proteina HERV-K-MEL. In conclusione, l'inibizione dell'espressione dei geni endogeni retrovirali (come il gene env HERV-K) può essere indotta o incrementata da contatti con agenti patogeni

cross-reattivi. L'analogia con la proteina HERV-K-MEL è particolarmente elevata con una poliproteina indotta dal virus della febbre gialla.

### **Obiettivo**

Il lavoro svolto durante il dottorato si è prefisso l'obiettivo di condurre uno studio epidemiologico al fine di dimostrare l'associazione tra vaccinazione contro la febbre gialla e riduzione del rischio d'incidenza di melanoma. Questo studio è stato ritenuto fondamentale per verificare tale ipotesi, in quanto non sarebbe possibile testare tale ipotesi in condizioni sperimentali.

### **Metodi**

I soggetti indagati dello studio sono tutti i soggetti vaccinati contro la febbre gialla, presso gli Uffici Sanitari autorizzati al rilascio dei certificati validi ad uso internazionale della Regione Veneto, il cui territorio è coperto dal Registro Tumori del Veneto. A questo scopo, sono stati fotocopiati gli archivi, contenenti i nominativi dei soggetti vaccinati contro la febbre gialla, dall'inizio della pratica della vaccinazione contro la febbre gialla (il vaccino è stato commercializzato nel 1982) fino all'anno 2001. Gli Uffici Sanitari (U.S.) che hanno accettato di fornire i dati ed il cui territorio è coperto dal registro tumori, sono i seguenti: U.S. di Verona, U.S. di Padova, U.S. Marittima di Dolo, U.S. Montebelluna, U.S. Treviso, U.S. Vicenza, U.S. Bassano del Grappa. I nominativi dei soggetti sono stati inviati al Registro Tumori del Veneto, affinché attraverso un attività di record-linkage identificasse i casi di tumore insorti tra tali soggetti. Innanzitutto è stato eseguito uno studio longitudinale. Sono stati calcolati i tassi grezzi d'incidenza di melanoma per sesso, classe d'età e periodo di latenza. Successivamente, usando la massa di persone-anni e i tassi di incidenza per cancro (specifici per sesso, età, periodo di calendario della popolazione generale del Veneto - gruppo di confronto) è stato calcolato il numero di casi attesi ed il rapporto standardizzato di incidenza (SIR). Sono stati

calcolati i SIR per latenza. È stato specificato un modello di regressione di Poisson che presentava come variabile dipendente i casi di melanoma, come variabile “rate multiplier” le persone-anni e come covariate la durata della latenza (tempo trascorso dall’esposizione al fine follow-up), il sesso e variabili tempo-dipendenti come l’età e il periodo di calendario. Successivamente è stato eseguito uno studio caso-controllo entro coorte. Sono stati considerati “casi” i soggetti entro la coorte che sono stati segnalati dal Registro tumori aver avuto una diagnosi di melanoma (55 soggetti). Come “controlli” sono stati considerati quei soggetti affetti dalle seguenti neoplasie maligne: tumore al cervello, tumore alla cervice uterina, tumore al colon retto, tumore al rene, mesotelioma e leucemia linfoide (123 soggetti). E’ stato dimostrato che questi tumori non esprimono la proteina HERV-K-MEL e perciò possono considerarsi “normali” relativamente all’espressione di tale gene. Riguardo all’esposizione, è stato calcolato il TSV (time since exposure) ossia il tempo trascorso dalla data di diagnosi e dalla data di esposizione. Il TSV è stato suddiviso in quattro classi  $\leq 0$ ;  $>0$  a 5;  $>5$  a 10; e  $>10$  anni. La prima classe ( $\leq 0$ ) comprende i soggetti vaccinati dopo l’insorgenza di tumore. La classe TSV “ $>0$  a 5” è stata considerata come classe “reference” e quindi le è stato assegnato un rischio unitario. Sono stati stimati, attraverso la regressione logistica, l’odds ratio (O.R.) per melanoma e l’intervallo di confidenza al 95% (IC95%), utilizzando un’analisi stratificata per centro di vaccinazione

## **Risultati**

La coorte di soggetti vaccinati che rispettavano i criteri di inclusione è formata da 28.306 persone, di cui 15.483 maschi (55%) e 12.823 femmine (45%). Lo studio longitudinale ha evidenziato nella coorte un tasso grezzo complessivo di 18,5/100.000 (IC 13,4-25,6), ed un SIR (Standardized Incidence Ratio) di 1,25 (IC 0,90-1,42). L’analisi per latenza dalla vaccinazione ha evidenziato un SIR di 1,29 (IC 0,81-2,06) nella classe di

esposizione 0-5 anni; SIR=1.52 (IC 0.93-2.50) nella classe di esposizione 5-10anni ; SIR=0.56 (IC 0.48-1.74) nella classe di esposizione > 10 anni.

I dati emersi dalla regressione di Poisson mostrano una riduzione non progressiva del rischio di melanoma con un rischio pressoché unitario nella classe 0-5 e nella classe 5-9, rispetto alla classe dei non esposti, mentre nella classe  $\geq 10$  appare un rischio ridotto di più del 60%, al netto dell'aggiustamento per le altre covariate.

Nello studio caso-controllo, all'analisi univariata, si evidenzia come l'O.R. di malattia (considerando come categoria "reference" la classe 0-4 anni) sia doppio per i soggetti non esposti alla vaccinazione, quasi unitario per coloro che hanno eseguito la vaccinazione da 5-9 anni e ridotto più dell'80% tra coloro che hanno eseguito la vaccinazione da più di 10 anni. I risultati dell'analisi multivariata aggiuntata per sesso, età all'incidenza ed età alla vaccinazione dimostrano chiaramente come la vaccinazione sia protettiva per la classe di latenza  $\geq 10$ , con una riduzione rischio di melanoma del 96% .

## **Discussione**

In letteratura non ci sono studi epidemiologici che affrontano lo stesso argomento per un confronto. Questo è il primo studio, infatti, che valuta la relazione tra vaccinazione contro la febbre gialla e il rischio di melanoma. Per primi abbiamo evidenziato come la somministrazione del vaccino contro la febbre gialla riduca l'incidenza della malattia dopo dieci anni dalla sua somministrazione. Il motivo per cui la vaccinazione sia efficace solo per la classe di esposizione con periodo di latenza >di 10 anni è di tipo fisiopatologico. Infatti, è plausibile che l'azione del vaccino sia di tipo inibente la fase d'iniziazione e possa agire nelle prime fasi di promozione del tumore e che il vaccino risulti conseguentemente meno efficace invece nelle fasi tumorali più avanzate. L'effetto protettivo contro il melanoma della

vaccinazione contro la febbre gialla, dopo 10 anni dalla somministrazione, emerge in modo evidente dallo studio caso-controllo entro coorte: l'OR di melanoma nel gruppo con periodo di latenza >10 anni risulta pari a 0.20 (IC95% 0.05-0.75) rispetto ai soggetti che hanno ricevuto una vaccinazione da 0-5 anni. Lo stessa direzione d'effetto del vaccino è emersa nello studio longitudinale che confronta la coorte dei soggetti vaccinati con la popolazione generale del Veneto, tuttavia in modo statisticamente non significativo, infatti il SIR dei soggetti vaccinati >10 è pari a 0.56 (IC95% 0.18-1.75), ed ancora più basso risulta l'O.R. ricavato dalla regressione di Poisson pari a 0.38 (IC95% 0.1-1.4), ma ugualmente non significativo. Il motivo di questi risultati apparentemente contraddittori può essere attribuito al fatto che nello studio coorte si utilizza come confronto la popolazione generale del Veneto, mentre lo studio caso-controllo permette un confronto entro coorte. La coorte di soggetti vaccinati non si distingue dalla popolazione generale del Veneto solo per l'esposizione, (condizione ideale di uno studio coorte) ma anche per altri fattori potenzialmente confondenti la relazione tra esposizione e malattia come l'esposizione al sole e lo stato socio-economico. Utilizzando la regressione di Poisson che permette un confronto interno (definita la classe di non esposti come categoria "reference"), la classe di esposizione con latenza >10 anni presenta un rischio pari 0.36, dato ancora una volta sovrapponibile a quello ricavato dallo studio caso-controllo, ma non significativo a causa di una numerosità campionaria ridotta e quindi una potenza ridotta dello studio.



# SUMMARY

---

## **Introduction**

Unless diagnosed and excised early, malignant melanoma is a cancer which carries a poor prognosis and its incidence is rising world-wide, particularly among fair-skinned people. There is growing evidence from many sources that immune responses are elicited against cancers and may contribute towards prevention of disease and limitation of progression of established cancers. Since the mid 19th century there have been many reports of regressions and remissions of cancers following serious infections such as erysipelas, and the causative organisms have been used therapeutically with some claimed success. A study group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) found that a history of vaccinations with BCG and/or vaccinia virus in childhood and/or a history of certain uncommon but serious infections are associated with a reduced risk of melanoma . It has been reported that about 95% of malignant transformed melanocytes express an antigen, HERV-K-MEL, encoded by a human endogenous retrovirus K (HERV-K). This antigen is also expressed in a minority of carcinomas and sarcomas but, with the exceptions of the testis and some naevi, not in normal tissues. In further studies it was established that BCG vaccine, the vaccinia virus and pathogens – that appeared to protect against melanoma – had antigenic determinants showing homology in the sequence of amino acids with the melanoma antigen HERV-K-MEL. Diseases which showed no association with reduced melanoma risk were predominantly caused by pathogens without this homology.

Additional information on the impact of vaccination with vaccinia virus and/or BCG on the risk of melanoma has been derived from epidemiological

studies. Vaccinations given neonatally or during the first two years of life was associated with a life-long reduced risk of melanoma, although the protective effect waned after the age of 50 years. Among those who had been vaccinated but nevertheless developed melanoma, their risk of dying of the disease within an 8-year follow-up period after surgical resection of the primary tumour was significantly reduced, although use of vaccinia and/or BCG as therapeutic agents for established melanoma has generally been unsuccessful. This suggests that, for protection, the immune responses induced by vaccination need to be established long before the tumour is clinically evident. The temporal pattern of association seems to depict a “crucial point” in the natural history of melanoma. Yellow fever vaccine (YFV) contains an antigenic determinant with a close homology to HERV-K-MEL antigen and to the homologous sequences in BCG and vaccinia virus. However, to date, there is no evidence as whether vaccination with YFV has a protective effect against melanoma. Thus, an epidemiological study was undertaken in order to investigate whether there is such an association and, if there is, to determine the temporal pattern of the association, as any such protection might be optimal at a very early stage of malignant transformation, perhaps preceding the presentation of overt melanoma by many years.

## **Methods**

The study was carried out in Veneto in the North-Eastern part of Italy, where a large part of the region was covered by the Veneto Tumor Registry (VTR). According to Italian law, YFV must only be administered in an authorized health service (AHS) and personal data of vaccinated subjects must be recorded. The study protocol was presented at a meeting to most physicians working in these AHSs. Among eligible AHSs (those corresponding to areas covered by VTR), seven agreed to collaborate: Padova, Verona, Vicenza, Treviso, Bassano, Montebelluna, Ufficio di

Sanità Marittima ed Aerea. After approval for the study had been granted by the Ethics Committee of the University of Padova, all the records of subjects vaccinated against yellow fever in the collaborating vaccination centers were collected. Information on the incidence of cancer in this group of subjects was obtained through a record-linkage with cancer data of VTR. The age at vaccination and at the diagnosis of cancer, and the years elapsed from the date of vaccination to the date of diagnosis of cancer (latency) were calculated. In the statistical analysis, latency was divided into four classes: <0; 0 to 5; >5 to 10; and >10 years. The first class (<0) included subjects vaccinated after the date of cancer diagnosis considerable as non exposed. In order to determine the time-effect relationship between the risk of melanoma and YFV administration we used a classical cohort study with Veneto general population as reference and an internal cohort analysis with Poisson regression where the references were subjects with latency <0 years.

Furthermore we carried out a cohort nested case-control study. The cases were 60 patients with melanoma and the controls were 178 patients affected by tumours of brain, cervix uteri, colon and rectum, kidney, as well as with mesothelioma and lymphoid leukaemia. The HERV-K-MEL gene has not been found to be expressed in these tumours, and therefore, for control purposes, they may be regarded as “normal” with respect to such gene expression. The TSV class “>0 to 5” was taken as the reference subgroup with an assumed risk of 1.0. The odds ratio (OR) for melanoma, 95% confidence interval (CI), error probability for a two-tail test (p-value) were estimated through logistic regression analysis, stratified by vaccination centres. The dependent variable was dichotomous (1 for cases and 0 for controls); the independent variables were age at incidence, age at vaccination, gender and the polytomous variable TSV at multivariate analysis, and TSV only at univariate analysis

## **Results**

The standardized incidence ratio (SIR) was 1,25 (IC 0,90-1,42) in the overall cohort. Latency analysis showed a SIR=1,29 (IC 0,81-2,06), 1,52 (IC 0,93-2,50) and 0,56 (IC 0,48-1,74), respectively in the latency categories 0-5, 5-10, and  $\geq 10$  years.

In order to compare the risk estimates within the cohort, we made an internal analysis using Poisson regression. After more than 10 years elapsed from the vaccination, the risk of melanoma reduced to 0.38. The risk estimates increased with age and calendar periods and were higher in women than in men.

In the nested case-control study, subjects vaccinated against YF from 0 to 4.99 were the reference group in the logistic regression analysis. Melanoma cases were compared with 178 tumors not expressing HERV-K-MEL gene. OR significantly ( $p=0.01$ ) reduced to 0.19 in the class  $>10$  years of latency.

## **Discussion**

The conclusion of this study is that yellow fever 17D vaccine appears to protect against melanoma if subjects were vaccinated 10 or more years before the clinical presentation of the disease, but ineffective later on. Our findings indicate that a simple preventive strategy against melanoma is possible although confirmatory studies are required before administration of yellow fever 17D vaccine can be advocated for the prophylaxis of this aggressive form of cancer.

# INTRODUZIONE

---

## *MELANOMA*

### *Definizione*

Il melanoma è un tumore maligno che origina dai melanociti, cellule della cute predisposte alla sintesi della melanina, di derivazione neuroectodermica (cresta neurale), durante l'embriogenesi migrano a livello della giunzione dermo-epidermica e in numero minore anche in sedi extra-cutanee (occhio, linfonodi ecc). Il melanoma può insorgere in tutti i distretti corporei in cui sono normalmente presenti i melanociti, quindi la cute ovviamente, ma anche le mucose, le meningi e l'occhio.

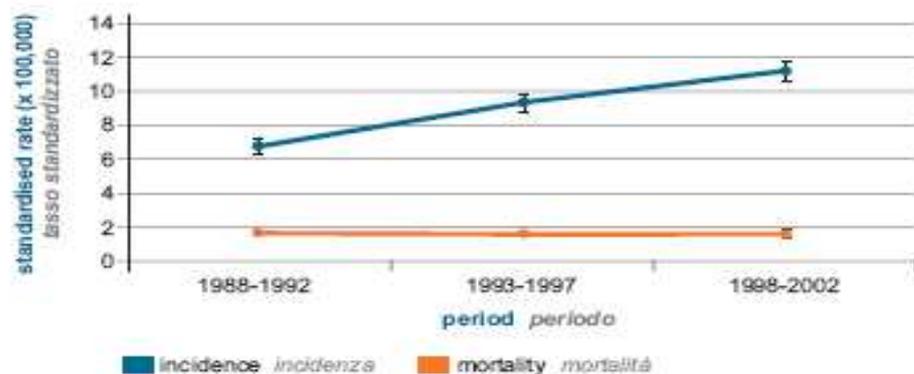
### *Epidemiologia*

#### **Incidenza**

Negli ultimi decenni, l'incidenza del melanoma cutaneo e la mortalità ad esso correlata sono risultate in continuo aumento nelle popolazioni caucasiche. Negli anni Novanta si stima che annualmente, a livello mondiale, si verificano circa 100.000 nuovi casi di melanoma cutaneo (circa il 15% in più del decennio precedente) [Parkin, Pisani, and Ferlay 1999], ciò corrisponde all'1% del totale dei tumori maligni. Questo dato ha supportato il concetto di "epidemia di melanoma" che ha assunto una valenza di emergenza sanitaria nelle popolazioni maggiormente affette, come quella australiana, con tassi di incidenza nell'ordine di 40 nuovi casi l'anno per 100.000 residenti. Anche in Italia, seppur in scala ridotta, è possibile parlare di "epidemia di melanoma" poiché – secondo i dati dei registri tumori locali attivi oggi in Italia – l'incidenza del melanoma sta

aumentando in media del 5-7% l'anno anche nella popolazione italiana, in maniera analoga a quanto riscontrato in popolazioni di origine nordeuropea [Diepgen, & Mahler 2002] (Vedi figura 1). In Italia l'incidenza è: al Nord è superiore a 10:100.000 vs 4:100.000 al Sud.

**Figura 1:** [tratta da AIRT Working Group. Italian cancer figures--report 2006. Epidemiol Prev. 2006] Tassi standardizzati di incidenza e mortalità del melanoma in Italia.



## Mortalità

Ogni anno nel mondo vi sono quasi 41.000 decessi attribuiti al melanoma cutaneo dei quali 1400 avvengono in Italia. Un individuo di razza bianca residente in un paese industriale ha circa una probabilità su 100 di sviluppare un melanoma nel corso della vita, ma soprattutto, essendo il melanoma causa di un'elevata mortalità tra persone di giovane e media età, è stato calcolato che negli stati Uniti si ha una perdita di vita attesa di 18,6 anni per ciascuna morte da melanoma, che è uno dei valori più alti tra i tumori dell'età adulta [Thompson, Scolyer and Keffrd, 2005].

## **Prevalenza**

La prevalenza indica il numero di pazienti affetti da una certa patologia presenti nella popolazione e risente sia della frequenza della malattia, che della sua prognosi. Siccome l'incidenza del melanoma cutaneo è in aumento e questo incremento è a carico soprattutto delle forme sottili che hanno una prognosi molto buona, quindi nella popolazione tendono ad accumularsi soggetti che hanno avuto nella loro storia clinica un'anamnesi positiva per melanoma cutaneo. Se consideriamo solo i casi diagnosticati entro 5 anni dal momento dell'osservazione, è stato stimato che in Italia ve ne siano oltre 24.000 [Ferlay et al, 2002]. Questo indicatore quantifica il carico, notevole e crescente, dei servizi di follow-up per il controllo dei pazienti che hanno avuto una diagnosi di melanoma cutaneo.

## *Fattori di rischio*

### **Fattori di rischio endogeni**

#### *Fenotipo*

---

La capacità di abbronzarsi è direttamente correlata alla quantità di melanina geneticamente presente nella cute, che non può essere manipolata e che ne determina la "fotosensibilità." La maggior parte dei melanomi si manifestano su cute chiara fotosposta. In confronto ad individui con capelli neri o castano scuro, quelli con capelli castano chiaro, biondi o rossi presentano un Rischio Relativo (R.R.) del 50-100% più elevati [Bliss, et al 1995]. La classificazione di Fitzpatrick (1988) comprende sei fenotipi, da I al VI, dei quali il I presenta il minimo contenuto di melanina, e il fenotipo maggiormente a rischio di melanoma.

## Sindromi

---

Alcune malattie genetiche diminuiscono la protezione all'esposizione ai raggi solari: Xeroderma Pigmentoso (difetto nel meccanismo di riparazione del DNA da raggi UV).

Altre sindromi sono alla base di una predisposizione a incorrere nel melanoma, ad esempio la sindrome che è stata definita come “sindrome del nevo atipico e del melanoma familiare” con presenza di melanoma in uno o più consanguinei di primo o secondo grado, presenza di un elevato numero di nevi melanocitici con aspetto clinico atipico, spesso più di 50, e caratteristiche istopatologiche del nevo displastico. Il rischio di sviluppare un melanoma sarebbe 184 volte maggiore in soggetti con nevo displastico familiare ma senza storia familiare di melanoma, mentre sarebbe 500 volte maggiore in soggetti sia con nevo displastico familiare sia con storia familiare di melanoma [Greene, et al, 1985]. I soggetti con nevo displastico sporadico non familiare sono stati inclusi da alcuni autori tra gli individui che presentano un aumentato rischio di melanoma, tuttavia in valori molto più bassi rispetto alle persone con nevo displastico familiare [Rhodes, et al 1987]. Con l'aumentare del numero dei nevi displastici nello stesso soggetto aumenterebbe anche il rischio di melanoma correlato [Bataille, et al 1996 Tucker, et al 1997].

### **Fattori di rischio esogeni**

#### I raggi U.V.

---

I raggi U.V. sono la causa più importante di melanoma [IARC, 1997]. E' dimostrato difatti che questo tipo di tumore è più frequente a latitudini decrescenti e ad altitudini crescenti. I raggi UVB sono i più carcinogenetici per a) danno diretto al DNA, b) danno al meccanismo di riparazione del DNA c) parziale soppressione dell'immunità cellulo-mediata. I raggi UVA,

un tempo considerati innocui, potenziano l'effetto degli UVB ed agiscono come co-carcinogeni. Con uno studio di meta-analisi è stato dimostrato che esiste un'associazione positiva con l'esposizione intermittente al sole (con un aumento del 70% per la categoria massima di esposizione ricreazionale) e un'associazione negativa con l'esposizione al sole di tipo occupazionale. I R.R. derivanti da un'anamnesi positiva per ustioni solari sono significativi sia per quelle verificatesi nell'infanzia, che nell'adolescenza o a qualsiasi età [Elwood & Jopson, 1997] .

### Radiazioni ionizzanti

---

L'insorgenza di melanoma dipende prevalentemente dalla dose totale accumulata (radiologi, piloti di linea, pazienti radiotrattati) [Buja, et al 2006 Buja, et al 2005, Freedman, et al 2003].

### Fattore socio-economico

In letteratura appare che lo stato socio-economico sia inversamente associato al rischio di melanoma [Alston et al, 2007]

---

## *Clinica*

### **Segni e sintomi**

Nella maggior parte dei casi il melanoma è asintomatico, ma per il riconoscimento clinico si può fare riferimento ad alcuni criteri schematizzati come segue:

A: asimmetria. Quando una lesione pigmentata è asimmetrica occorre sospettare il melanoma.

B: bordi. Devono essere lisci e regolari, altrimenti si sospetta il melanoma.

C: colorito. Un nevo può essere nero, blu, bruno, rossastro, grigio ed anche a due o più colori; occasionalmente si osservano anche aree ipopigmentate biancastre o color “carne viva”.

D: dimensioni e dolore. L'aumento di dimensioni di un nevo preesistente è il segno più importante. Quando il diametro è  $> 6$  mm la situazione è molto grave perché inizia la penetrazione nel derma e la prognosi è molto severa. Tuttavia nevi congeniti con dimensioni  $> 6$  mm non rappresentano una condizione patologica. In alcuni casi i sintomi del melanoma possono essere dolore, prurito, sanguinamento in un nevo preesistente, ma di solito sono segni tardivi.

E: estensione. Anche l'accrescimento rapido è una caratteristica del melanoma.

### **Classificazione**

Si distinguono 4 tipi principali di melanoma.

1. Melanoma a diffusione superficiale (SSM). La lesione ha una fase di crescita radiale. È una lesione piatta a contorno irregolare, di colore variabile, bruno-marrone, nero o anche rosa-grigio, disomogeneo anche per aree bianche di regressione, di dimensioni da uno a più centimetri di diametro, che presenta uno o più noduli. È frequente nel dorso dei maschi o alle gambe delle femmine, ma anche in altre aree cutanee fotoesposte e coperte. Cresce radialmente per uno o due anni prima della crescita verticale. Se la lesione viene riconosciuta in tempo la prognosi è buona.

2. Melanoma su lentigo maligna. La lesione ha una fase di crescita radiale. È una macchia estesa (macchia caffè-latte), bruno-nera, irregolarmente pigmentata, con uno o più noduli rilevati, in aree fotoesposte (faccia, collo, estremità) di soggetti anziani. È la fase invasiva della lentigo maligna. Comprende circa il 5% dei melanomi.

3. Melanoma lentiginoso delle estremità (o acrale lentiginoso, ALM). La lesione ha una fase di crescita radiale. È una macchia disomogeneamente pigmentata, bruno-nera, a margini irregolari, della pianta dei piedi, del palmo delle mani, delle regioni ungueale e periungueale, degli spazi interdigitali sia delle mani che dei piedi. Visto che le sedi colpite sono spesso “nascoste”, si giunge in genere ad una diagnosi tardiva.

4. Melanoma nodulare (NM). Non ha fasi di crescita riconoscibili e di solito si presenta come una lesione molto invasiva, con alta probabilità di metastasi precoci. È un nodulo, talora polipoide e/o ulcerato, di colore nero, bluastro o roseo; la cute adiacente non è pigmentata. È la forma più aggressiva e difficile da diagnosticare.

Altri tipi di melanoma sono il melanoma occulto (da regressione di una lesione primitiva, per cui nella zona cutanea non vi è più il melanoma ma una area ipocromica di fibrosi post-necrotica), il melanoma primitivo del linfonodo (quando i melanociti raggiungono il linfonodo drenante e si svincolano dai loro normali meccanismi di regolazione), il melanoma ungueale o subungueale (spesso confuso con un ematoma).

## *Anatomia patologica*

### **Microstadiazione**

Lo spessore di Breslow (microstadiazione di Breslow) è la misura mediante oculare micrometrico, espressa in mm, dell'invasività del melanoma [Breslow, 1970]. La misura viene effettuata, nella sezione che mostra la maggiore profondità di infiltrazione, a partire dallo strato granuloso, in direzione verticale, perpendicolarmente alla superficie epidermica, fino al punto più profondo del tumore (cioè fino all'ultima cellula neoplastica). Se il tumore è ulcerato la misura viene dalla sommità dell'ulcera fino al punto

di maggior spessore. Ciò che va misurato è lo spessore del nodulo tumorale, trascurando eventuali focolai staccati. Sono da evitare le misurazioni in corrispondenza dei follicoli piliferi, che falsano in eccesso il valore finale.

Il livello di Clark [Clark et al, 1989] (microstadiazione di Clark) è una valutazione dell'invasività del melanoma basata sull'anatomia della cute. Si distinguono 5 livelli:

I Livello: melanoma confinato al di sopra della membrana basale (intraepidermico), in situ;

II Livello: invasione discontinua del derma papillare;

III Livello: invasione massiva del derma papillare fino al confine col derma reticolare;

IV Livello: invasione del derma reticolare;

V Livello: invasione del tessuto adiposo dell'ipoderma.

Lo spessore di Breslow è molto affidabile: le differenze tra le diverse osservazioni sono basse, e vari studi hanno dimostrato che lo spessore del tumore è un parametro prognostico più affidabile rispetto ai livelli di Clark. È stato dimostrato che l'ulcerazione è il fattore prognostico più importante per lesioni spesse più di 1 mm, mentre i livelli IV e V della microstadiazione di Clark rimangono significativi soltanto per lesioni di spessore inferiore a 1 mm [Rousseau et al, 2003].

### **Fasi di crescita**

Il melanoma ha due fasi di crescita: una radiale ed una verticale; queste due fasi sono sempre presenti ma la loro durata e l'intervallo che le separa sono diversi.

Per crescita radiale si intende la tendenza di un melanoma a crescere orizzontalmente all'interno dell'epidermide e lungo la giunzione dermo-epidermica; vi si possono distinguere due momenti, uno intraepidermico (melanoma in situ o I livello) ed uno di invasione del derma papillare in nidi

discreti (melanoma microinvasivo o II livello). Le caratteristiche della fase radiale permettono la classificazione istologica del melanoma. Nella fase di crescita radiale le cellule del melanoma non hanno la capacità di metastatizzare ed è in questa fase che il melanoma è più suscettibile a guarigione mediante escissione chirurgica. La lentigo maligna insorge prevalentemente sulla cute esposta di soggetti anziani e prima di evolvere in melanoma con capacità metastatiche possono passare anche diversi decenni.

La fase verticale, in cui il melanoma cresce secondo una direttrice perpendicolare al piano cutaneo, si osserva in melanomi già in fase radiale (melanoma a diffusione superficiale, melanoma su lentigo maligna, melanoma acrale lentiginoso) o de novo, senza precedente fase radiale, come nel melanoma nodulare (che infatti manca del I e II livello). La fase verticale è diagnosticabile quando i nidi dermici sono più grandi del più grande nido epidermico e riempiono il derma papillare (III livello). Nella crescita verticale il melanoma comincia a crescere nel derma e le cellule non mostrano più maturazione e tendono a diventare più piccole man mano che si approfondano nel derma reticolare. Tale fase è costituita istologicamente da infiltrazione del derma e sollevamento ed ulcerazione dell'epidermide; clinicamente dà luogo alla comparsa di un nodulo nell'ambito di una lesione piana, e possono comparire metastasi.

## *Prognosi*

La probabilità di metastasi in un melanoma può essere valutata misurando in millimetri lo spessore della componente nodulare, valutando l'indice mitotico (più è alto, peggiore è la prognosi), il grado di infiltrato linfocitario nel nodulo tumorale (infiltrato di tipo "brisk", denso ed abbondante, infiltrato di tipo "non brisk", sito in periferia e senza una particolare attività nei confronti della lesione), l'invasione vascolare, l'ulcerazione macroscopica e la microsatellitosi (presenza di noduli di melanoma intorno

alla lesione principale) e la positività del linfonodo sentinella che è il fattore prognostico maggiormente significativo rispetto alla sopravvivenza [Morton, et al 1999]).

Il modello di progressione per il melanoma primitivo in stadio I e in fase di crescita verticale (VGP), proposto da Clark [Clark et al, 1989] attribuiva un valore di fattore prognostico indipendente alla presenza di linfociti infiltranti la neoplasia (TIL “ tumor infiltrating lymphocytes”). Questo dato suggeriva un possibile coinvolgimento del sistema immunitario nel controllo della progressione tumorale. Gli studi iniziati da Clark e proseguiti da Clemente, [Clemente et al, 1996] hanno dimostrato che la lesione primitiva può presentare, in relazione all’infiltrato, tre situazioni diverse, definite come ‘brisk’, “non-brisk” o “absent”. I risultati nel melanoma primitivo con componente di crescita verticale (quindi un melanoma che ha acquisito la competenza per la metastasi) avevano indicato che questa classificazione ha un valore prognostico in quanto la sopravvivenza a 5 e 10 anni era nettamente migliore nel sottogruppo di pazienti con infiltrato di tipo brisk rispetto ai pazienti con infiltrato di tipo non-brisk e la differenza era ancora più marcata nel paragone tra sottogruppo brisk e sottogruppo absent. Quest’analisi è stata ripetuta su metastasi linfonodali [Mihm, Clemente and Cascinelli, 1996]. Nel caso di metastasi linfonodali di melanoma la crescita del tumore è stata paragonata alla fase di crescita verticale della neoplasia primitiva e all’interno della massa proliferante si è studiata la presenza di TIL. I risultati hanno dimostrato che i tre gruppi di pazienti con infiltrato classificato come brisk, non-brisk o absent hanno sopravvivenze (valutate a 30 mesi) distinte, con un netto vantaggio a favore del gruppo con infiltrato di tipo brisk. Questi risultati suggeriscono che, anche a livello di lesioni metastatiche, la presenza di un infiltrato linfocitario (e quindi, indirettamente, la presenza di una risposta immunitaria) possa costituire un parametro importante per predire l’evoluzione della malattia. In accordo con

i dati derivanti dallo studio dell'infiltrato linfocitario, studi condotti a partire dall'inizio degli anni 80, avevano indicato che linfociti T isolati dal sangue periferico (PBL, "peripheral blood lymphocytes") o dal tessuto neoplastico (TIL) di pazienti con melanoma primitivo o metastatico potevano, dopo attivazione in vitro, riconoscere in modo specifico il tumore autologo e determinarne la lisi cellulo-mediata [Anichini et al, 1987]. Queste osservazioni iniziali implicavano l'esistenza di antigeni tumorali sul melanoma umano e il loro riconoscimento da parte del sistema immunitario del paziente. Ulteriori studi condotti con tecniche molecolari hanno permesso di verificare che, in una frazione dei pazienti, i linfociti T tumore-specifici che infiltrano o il tumore primitivo o le lesioni metastatiche costituiscono in realtà espansioni clonali di pochi o anche di un solo clone T [Sensi & Permiani, 1995]. Ciò ha indicato che la lesione neoplastica può essere sede di proliferazione di cloni di linfociti T antigene-specifici. Tale proliferazione è apparentemente guidata dall'espressione di antigeni tumorali sulle cellule neoplastiche. A partire dall'inizio degli anni '90, è stato possibile identificare una serie di geni espressi nel melanoma umano e che codificano per antigeni tumorali riconosciuti da linfociti T sia a fenotipo CD8+ che CD4+ [Van Pel A et al, 1995]. Gli antigeni tumorali sono peptidi derivati dalla degradazione intra-cellulare di proteine. Tali peptidi si associano, sulla superficie della cellula neoplastica, ad alleli del maggior complesso d'istocompatibilità (HLA). Il complesso HLA-peptide viene riconosciuto da un recettore per l'antigene (TCR) espresso in modo clonale da linfociti T. Durante gli anni '90 sono stati identificati molti antigeni tumorali del melanoma umano. Frequentemente l'antigene tumorale deriva dall'espressione in cellule neoplastiche di un gene normale, privo di alterazioni. Tali geni normali possono essere sia tessuto-specifici (cioè con espressione limitata a melanociti normali e a cellule di melanoma) o essere espressi prevalentemente in diversi tessuti neoplastici ma non nella

controparte normale. In tutti questi casi il peptide antigenico viene prodotto con il meccanismo di degradazione intracellulare a partire dalla proteina normale. Il numero di peptidi antigenici già individuati in queste categorie geniche è proporzionale alla dimensione della proteina. E' inoltre prevedibile che il numero di peptidi antigenici corrispondenti a proteine di notevole dimensione sia destinato a crescere, rispetto alle conoscenze attuali. Antigeni tumorali del melanoma possono essere generati anche con altri meccanismi che si basano su alterazioni strutturali dei geni (es. mutazioni puntiformi). La generazione di antigeni tumorali del melanoma può dipendere anche da altri meccanismi dovuti ad alterata regolazione dell'espressione genica nelle cellule neoplastiche: esempi sono rappresentati da traduzione di mRNA eseguita utilizzando "open reading frames" (come nel caso del gene env-HERV-k ) che sono espressi nelle cellule di melanoma umano, ma non in melanociti normali [Muster, et al 2003].

La maggior parte dei peptidi antigenici identificati nel melanoma umano si associano ad alleli HLA di classe I (alleli ai loci HLA-A,-B e - C) e determinano la formazione di epitopi riconosciuti da linfociti T a fenotipo CD8+, in genere a funzione citolitica. Dati ulteriori indicano comunque che anche linfociti a fenotipo CD4+, di tipo helper, possono riconoscere, in associazione a molecole HLA di classe I (es. alleli ai loci HLA-DR, -DP e -DQ), peptidi derivanti dal processamento e degradazione intracellulari di proteine espresse nel melanoma [Chaux, et al 1999]. Mentre i linfociti CD8+ sono considerati effettori finali della risposta immunitaria, i linfociti CD4+ sono determinanti per l'inizio, l'espansione e il mantenimento della risposta immune. E' quindi fondamentale che antigeni tumorali riconosciuti da entrambi i principali subsets di linfociti T vengano identificati e utilizzati come bersagli di approcci di immunizzazione. Queste scoperte consentono di ipotizzare nuovi sviluppi terapeutici e preventivi nel settore

dell'immunoterapia antigene-specifica che siano applicabili ad una frazione cospicua dei pazienti.

-A volte un nevo può andare incontro ad una regressione che può essere fisiologica o patologica. Nella regressione fisiologica si ha un approfondimento nel derma ed una diminuzione della produzione di melanina che porta ad uno schiarimento, fino alla scomparsa del nevo. Altre volte (nella fase di crescita radiale e non in quella di crescita verticale) un nevo può scomparire a causa di una risposta immunitaria (con flogosi "band-like" o lichenoidi) nei confronti dei melanociti. Il nevo può regredire anche in maniera patologica benigna ("nevo con alone") o maligna (il melanoma scompare e dà metastasi; accade nel 5% dei pazienti con metastasi da melanoma).

## *Trattamento*

Il trattamento chirurgico rappresenta la terapia elettiva del melanoma primario. La procedura chirurgica prevede l'asportazione del melanoma cutaneo con un margine di tessuto sano circostante. A fini stadiativo-prognostici è stata introdotta la tecnica mini-invasiva della biopsia del linfonodo sentinella, che si è dimostrata altamente sensibile nell'identificare metastasi linfonodali clinicamente occulte [Morton, et al 1999]. La sopravvivenza a 5 anni è significativamente più alta per coloro che effettuano la linfadenectomia immediata dopo biopsia positiva del linfonodo sentinella, rispetto ai pazienti non stadiati con la biopsia del linfonodo sentinella che effettuano la linfadenectomia al momento della comparsa clinica di metastasi nel follow-up [Morton et al, 2006]. Al trattamento chirurgico può essere associata in funzione dello stadio della malattia anche un'immunoterapia adiuvante e/o monochemioterapia o polichemioterapia o biochemioterapia. [Istituto Tumori Toscano, 2007].

### **Nuove frontiere dell'immunoterapia antigene-specifica**

La scoperta di antigeni tumorali riconosciuti dai linfociti T consentono di ipotizzare nuovi sviluppi terapeutici e soprattutto preventivi nel settore dell'immunoterapia antigene-specifica [Maio & Permiani, 1996]. Studi clinici iniziali di vaccinazione (con peptidi sintetici o con lisati di cellule neoplastiche presentati al sistema immunitario da cellule dendritiche) indicano che è possibile attivare in-vivo, in pazienti con melanoma metastatico, una risposta immune antigene-specifica contro antigeni del melanoma [Nestle et al 1998, Rosenberg et al, 1998]. A ciò corrisponde anche, in alcuni casi, evidenza di regressione di lesioni neoplastiche preesistenti.

Sarebbe auspicabile si potesse generare un vaccino che abbia un intento preventivo. Le caratteristiche di questo potenziale vaccino devono sicuramente essere due:

- 1) la sicurezza perchè è un vaccino da somministrare su vasta scala ad individui sani
- 2) la capacità di indurre una risposta immune contro antigeni espressi solo nelle cellule francamente displastiche e tumorali e quindi possa inibire l'insorgenza di melanoma.

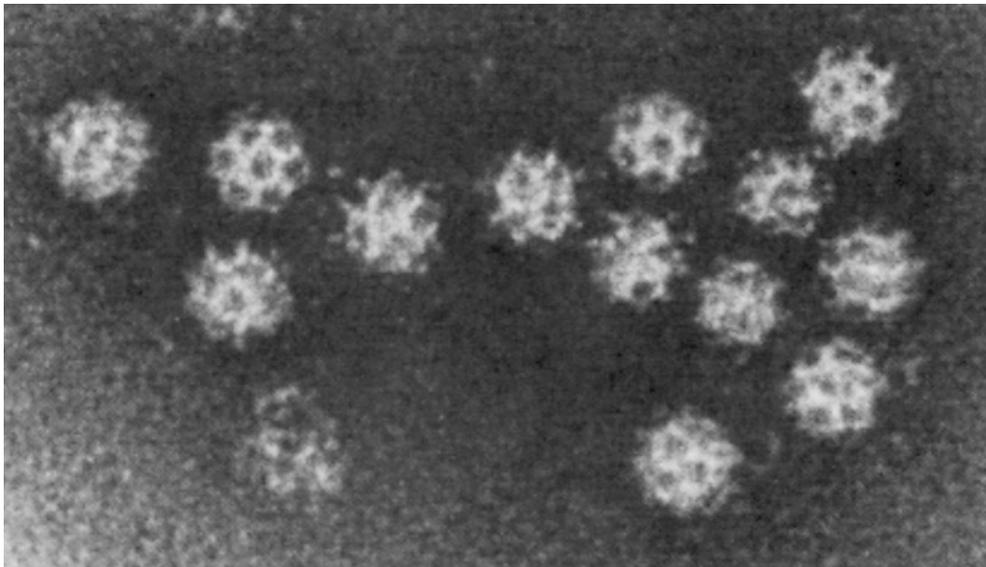
# FEBBRE GIALLA

---

## *Eziologia*

Il virus della febbre gialla (virus amarilico) è un arbovirus (gruppo B), virus a RNA del genere dei Flavivirus, membro della famiglia delle Flaviviridae (Figura 2).

**Figura 2:** Virus della febbre gialla

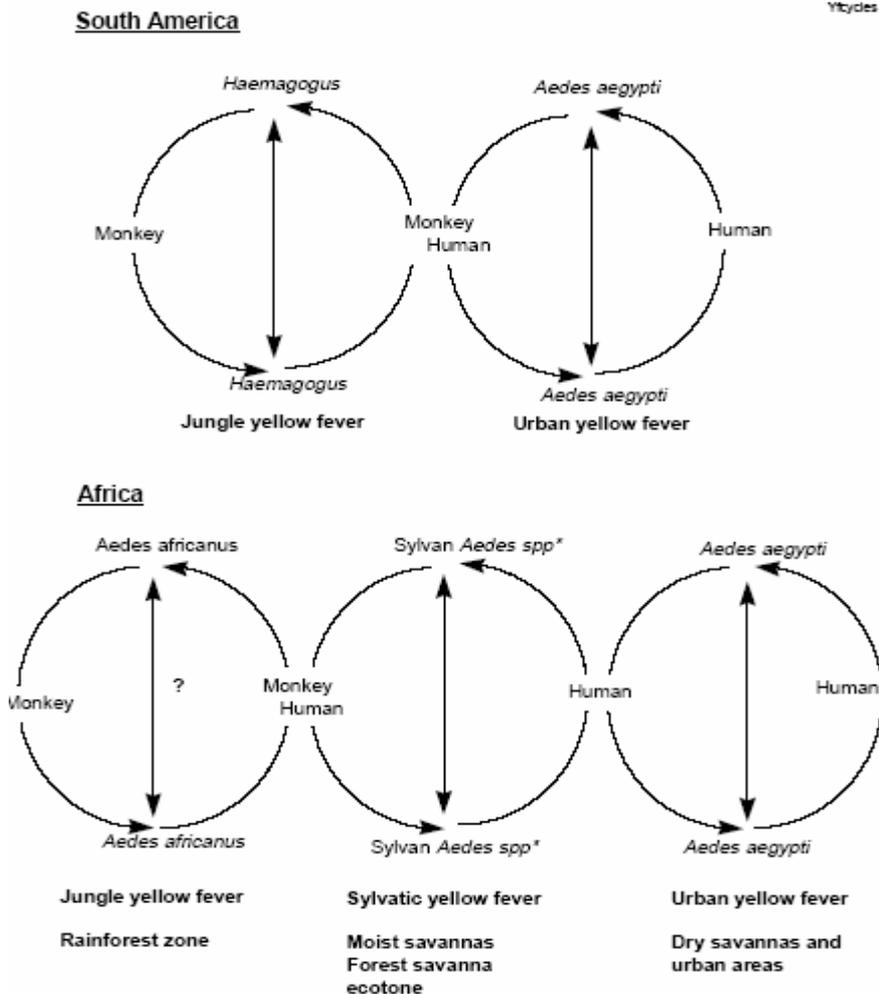


## **Modalità di trasmissione e ciclo vitale**

I vettori del virus sono zanzare del genere *Aedes* e *Haemagogus* e trasmettono il virus con la puntura (figura 3). Le zanzare restano infette per tutta la loro vita. Esistono due cicli con i quali il virus si mantiene in natura: un ciclo silvestre e un ciclo urbano. Nella febbre gialla silvestre i vettori sono *Haemagogus* spp. e *Sabethes* spp. in Sud America ed *Aedes africanus* in Africa. Le zanzare acquisiscono l'infezione dalle scimmie, che fungono

da serbatoio del virus, pungono e infettano gli uomini, di solito giovani maschi che lavorano nelle foreste o agricoltori [Monath, 1999].

**Figura 3:** Vettori e cili vitali [fonte Vainio & Cutts,WHO].



Nella febbre gialla urbana, gli uomini sono serbatoi del virus, e il contagio avviene attraverso la zanzara domestica, *Aedes aegypti* (figura 4). Il sangue dei pazienti infetti è contagioso da 24 a 48 ore prima della comparsa dei sintomi, fino a 3-5 giorni dopo la guarigione clinica. La malattia non è trasmissibile per contatto diretto o attraverso i comuni veicoli di trasmissione delle infezioni in genere.

**Figura 4:** Zanzara *Aedes aegypti* e zanzara *Haemagogus*

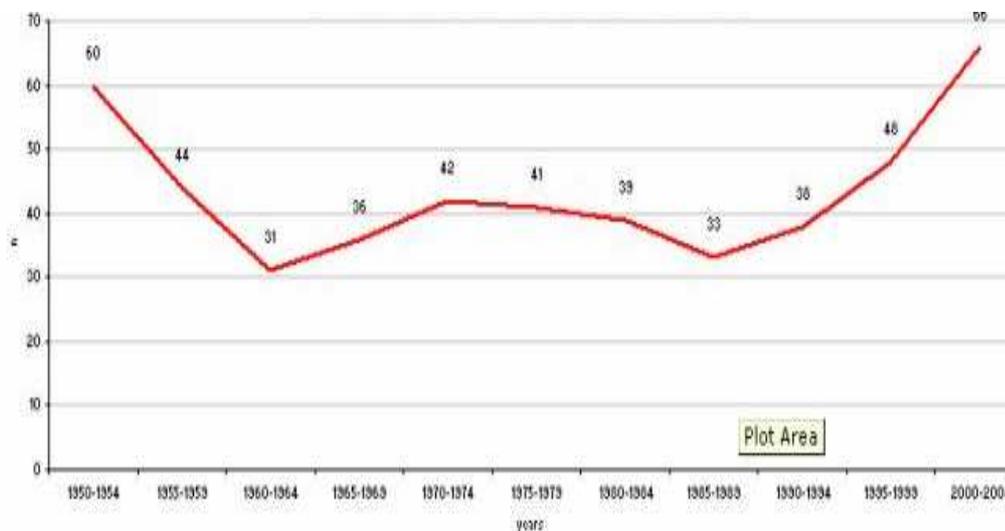


## *Epidemiologia*

L'incidenza è imprecisata perché la maggior parte dei casi è subclinica o non è segnalata, in quanto si verifica in aree geografiche remote. Durante i periodi interepidemici, infatti un basso livello di trasmissione potrebbe non essere rilevato dalla sorveglianza pubblica. Questi episodi interepidemici potrebbero durare da un anno ad alcuni decenni; tuttavia il “silenzio epidemiologico” non equivale all'assenza di rischio e non dovrebbe mai comportare che i viaggiatori possano recarsi nelle zone endemiche senza la vaccinazione. Alcune indagini eseguite durante i periodi silenti zone rurali dell'Africa Occidentale hanno stimato un'incidenza annuale durante questi periodi di 1-2,4 casi per 1.000, e un tasso di mortalità di 0,2-0,5 per 1.000 . Alcuni dati fanno ritenere che la circolazione della febbre gialla in Africa stia aumentando significativamente. Evidenza di questo fenomeno è fornita dal fatto che :

- 1) aumentano il numero di nazioni che notificano casi di febbre gialla (Figura 5);
- 2) le notifiche di piccoli focolai che vengono rapidamente controllati sono più frequenti.

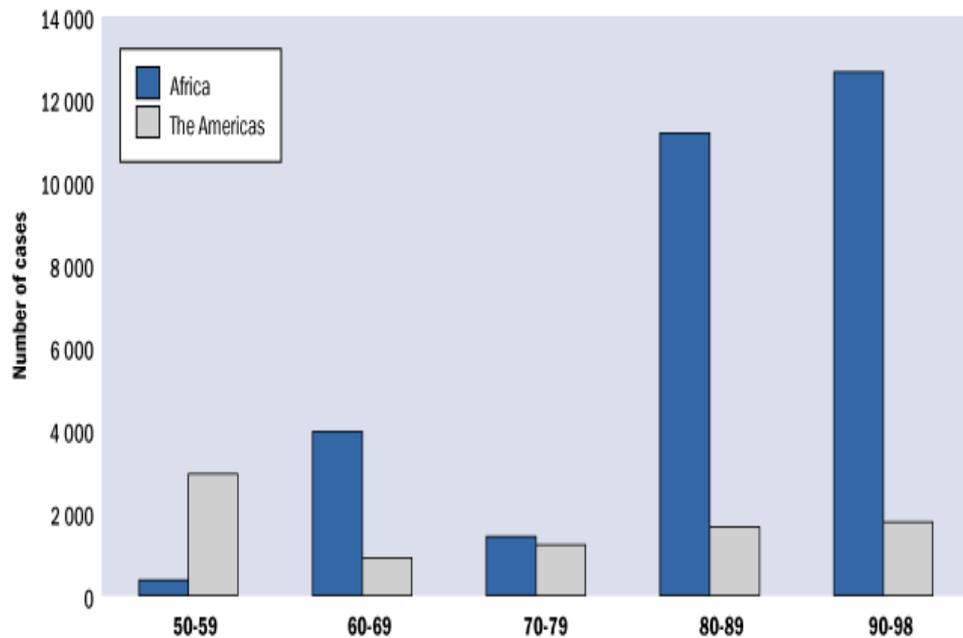
**Figura 5:** Numero di casi notificati di febbre gialla in Africa e Sud America, aggregati in quinquenni [fonte WHO].



La trasmissione nelle zone rurali in Africa Occidentale è stagionale, con un elevato rischio durante 2-4 mesi al termine della stagione delle piogge e all'inizio della stagione asciutta (solitamente da luglio a ottobre) e quindi i tassi di incidenza riflettono l'incidenza del fenomeno in questi 2-4 mesi.

L'incidenza di febbre gialla in Sud America è più bassa che in Africa, poiché le zanzare che trasmettono il virus tra le scimmie nella foresta non vengono spesso in contatto con uomini e comunque le popolazioni indigene hanno un'elevata immunità. La trasmissione urbana epidemica non si è verificata da molti anni, sebbene il rischio di introduzione del virus nelle città sia sempre presente. Per i viaggiatori, il rischio di malattia e morte è probabilmente 10 volte più elevato nelle zone rurali in Africa Occidentale rispetto a quello del Sud America (vedi Figura 6). Il rischio di trasmissione dipende anche dalle stagioni: in Brasile i mesi con maggior rischio di contrarre l'infezione sono gennaio, febbraio e marzo [Monath & Cetron, 2002].

**Figura 6:** Distribuzione dei casi notificati di febbre gialla negli anni in Africa e Sud America [fonte WHO].



La bassa incidenza di febbre gialla in Sud America (generalmente 100-200 casi all'anno in Amazzonia) potrebbe portare a sottovalutare l'utilità della vaccinazione. Comunque, è importante notare che 4 dei 6 casi di febbre gialla fra i turisti provenienti dagli Stati Uniti e dall' Europa, negli anni dal 1996 al 2002, sono stati acquisiti in Sud America. Tutti i 6 casi furono mortali e accaddero tutti in soggetti che non erano stati vaccinati [CDC 2000, CDC 2002, Barros ML 1996, Colebunders R. 2002, McFarland JM 1997, Teichmann D 1999].

Il rischio di acquisire la febbre gialla è difficile da predire per il continuo mutamento dei determinanti la trasmissione virale. Secondo un calcolo approssimativo, il rischio di malattia e morte, dovuto alla febbre gialla, in viaggiatori non vaccinati che si recano in zone endemiche nell'Africa Occidentale, è maggiore durante le stagioni a maggior rischio, (luglio-

ottobre) ed è stato stimato essere 100 per 100.000 e 20 per 100.000 per una permanenza di un mese rispettivamente e una permanenza di due settimane; il rischio stimato di morte è di 50 per 100.000 e 10 per 100.000 rispettivamente. Il rischio di malattia e di morte in Sud America è probabilmente dieci volte più basso pari a 5 per 100.000 di incidenza and 1 per 100.000 di morte per un soggiorno di due settimane [Monath & Cetron 2002]. Queste stime sono basate sul rischio della popolazione indigena e potrebbero non riflettere in modo accurato il vero rischio per i turisti, che possono avere un diverso profilo immunitario e prendono più precauzioni contro la puntura di zanzare e hanno una minor esposizione agli ambienti esterni. Basandosi sui dati riferiti a viaggiatori negli anni 1996-2004 in zone endemiche, il rischio generale di malattia e di morte a causa della febbre gialla potrebbe essere considerato pari a 0.05 -0.5 per 100.000 viaggiatori. Questo range riflette una popolazione vaccinata dal 10-90% e assume che tutti i viaggiatori in zone endemiche siano a rischio e che siano a rischio anche il 10% dei viaggiatori in zone non endemiche.

### **Diffusione**

La diffusione del virus della febbre gialla interessa una zona tra il 15° parallelo Nord e il 10° parallelo Sud in America e in Africa. Non c'è in Asia, benché siano presenti specie di zanzare potenziali vettori. L'area geografica interessata dalla febbre gialla è in espansione, soprattutto in Africa, in zone dove la stessa si considerava eradicata (es. Africa orientale e meridionale). In Africa la trasmissione avviene principalmente nelle zone di savana dell'Africa centrale e occidentale (figura 7), durante la stagione delle piogge, con saltuarie epidemie in zone urbane e in villaggi. Più raramente interessa le zone di foresta equatoriale.

**Figura 7:**Stati africani dove la febbre gialla è endemica (fonte CDC)



In Sud America gli episodi sono sporadici e colpiscono quasi sempre agricoltori o lavoratori delle foreste. Dopo una campagna di eradicazione dell'*Aedes aegypti* negli anni trenta, la febbre gialla urbana era diventata rara in Sud America, ma a causa del degrado socio-economico ed ecologico degli ultimi anni, queste zanzare hanno recentemente rioccupato buona parte delle aree dalle quali erano state eliminate e il rischio potenziale di epidemie urbane è conseguentemente aumentato (Figura 8).

**Figura 8:** Stati sudamericani dove la febbre gialla è endemica (fonte CDC)



### *Patogenesi e sintomatologia*

La zanzara infetta, durante il pasto ematico, inietta il virus con la propria saliva nei piccoli vasi sanguigni sottocutanei. Successivamente si ha la replicazione e la disseminazione ematogena, il virus infetta il fegato. Questo determina un danno epatico diretto con degenerazione eosinofila degli epatociti, necrosi medio-zonale, con risparmio degli epatociti periportal e

pericentrali. Può verificarsi insufficienza renale sia per ipoperfusione che per necrosi tubulare acuta. La diatesi emorragica è su base multifattoriale, correlata alla diminuita produzione di fattori della coagulazione e alla trombocitopenia.

Il periodo di incubazione è di 3-6 giorni. Il 40-60% dei casi di infezione non mostrano segni clinici, mentre il 20-30% si manifestano in forma lieve o moderata; il 10-20% dei soggetti è colpito da una forma grave, il 5-10% dei casi porta ad un esito infausto. La malattia ha un tipico andamento bifasico con un periodo di invasione (fase viremica) e uno di localizzazione d'organo (fase tossica). I segni iniziali corrispondono alla fase viremica, con alta carica virale nel plasma; in tale fase il paziente costituisce fonte di infezione per le zanzare.

La malattia si manifesta con febbre con brivido e bradicardia relativa, cefalea importante, iperemia congiuntivale, dolore lombare, mialgie, nausea e prostrazione. Questa fase è seguita da una temporanea remissione (fino a 24 ore). La fase tossica si manifesta successivamente con la ricomparsa della febbre e dei segni clinici di insufficienza d'organo: ittero ingravescente, proteinuria, oliguria, acidosi, diatesi emorragica (ematemesi e altre emorragie). Si può avere una coagulopatia da insufficienza epatica, con segni di deficit neurologico (delirio, convulsioni, coma) e shock. L'ipoglicemia e il coma epatico sono eventi terminali.

### **Prognosi**

Il 50% dei pazienti in fase tossica muore, di solito entro 2 settimane dalla comparsa dei sintomi. La mortalità è maggiore nei più giovani. Il tasso di mortalità è più basso nelle epidemie (5%). Segno prognostico sfavorevole è la precoce comparsa e la severità dell'ittero. L'aumento delle transaminasi è direttamente proporzionale al danno epatico ed è un segno prognostico

sfavorevole. Negli individui che sopravvivono alla fase tossica si può avere insufficienza renale. La convalescenza con malessere e debolezza può durare fino a 3 mesi.

### **Terapia**

Il trattamento è principalmente sintomatico e di prevenzione delle complicanze. Non esiste terapia specifica antivirale. A tale scopo si stanno studiando l'interferone e la ribavirina.

## *Misure preventive*

### **Lotta alla zanzara**

La lotta alla zanzara *Aedes* si basa sul controllo della nettezza urbana e dell'acqua stagnante, allo scopo di uccidere le larve.

### **Protezione dalle punture**

I viaggiatori in aree endemiche per febbre gialla dovrebbero adottare misure di protezione dalle punture di zanzara quando viaggiano: la malattia è raramente trasmessa in aree urbane tranne che nel corso di epidemie. I viaggiatori che si recano in aree rurali dell'Africa e del Sud America, potrebbero comunque essere sporadicamente esposti a febbre gialla e ad altre malattie trasmesse da zanzare; le zanzare che trasmettono la febbre gialla urbana generalmente pungono durante il giorno.

### **Vaccino**

#### *Tipo di vaccino*

---

Si utilizza un vaccino vivo attenuato, preparato da colture virali su embrioni di pollo, è somministrato per via sottocutanea.. La vaccinazione è efficace da 7-10 giorni dopo la prima iniezione (il giorno successivo nel caso di un

richiamo) e gli anticorpi persistono per molti anni (30-35 anni). In caso di esposizione continua in zone a rischio di infezione vanno effettuati richiami ogni 10 anni. La dose nell'adulto è di 0.5 ml di vaccino sottocute, almeno 10 giorni prima del viaggio. La dose pediatrica è la stessa dell'adulto. Il vaccino è sensibile alle alte temperature e va conservato tra 0°C e 5°C..

### Efficacia del vaccino

Gli studi clinici effettuati hanno dimostrato la comparsa di anticorpi specifici entro una-due settimane dopo la vaccinazione conferendo un'elevata immunogenicità, di oltre il 95%.

### Paesi in cui è consigliata la vaccinazione

Molti Paesi richiedono un certificato di vaccinazione contro la febbre gialla a tutti i viaggiatori (tabella1).

**Tabella 1:** Paesi in cui è obbligatoria la vaccinazione contro la febbre gialla [fonte CDC]

Benin	Côte d'Ivoire	Liberia	São Tomé
Burkina Faso	Democratic Republic	Mali	PrincipeTogo
Cameroon	of Congo	Mauritania (for a	
Central African	French Guiana	stay >2 weeks)	
Republic Congo	Gabon	Niger	
	Ghana	Rwanda	

La vaccinazione è comunque fortemente raccomandata per tutti i viaggiatori al di sopra dei 6 mesi di età, che si rechino nelle zone rurali delle aree endemiche. Le zone di endemicità della febbre gialla (in cui sono presenti i vettori e i serbatoi animali) si estendono in un'area più vasta rispetto a

quella in cui sono stati notificati casi all'OMS e dove le nazioni richiedono certificati di vaccinazione. Pertanto la vaccinazione va raccomandata a tutti i viaggiatori diretti in tali aree (tabella 2).

**Tabella 2:** Paesi in cui è consigliata la vaccinazione perché zone endemiche per febbre gialla [fonte CDC]

AFRICA		AMERICA	
Angola	Equatorial	Nigeria	Argentina <sup>1</sup>
Benin	Guinea	Rwanda	Bolivia <sup>1</sup>
Burkina Faso	Ethiopia	Sierra Leone	Brazil <sup>1</sup>
Burundi	Gabon	São Tomé and	Colombia
Cameroon	The Gambia	Principe	Ecuador <sup>1</sup>
Central African	Ghana	Senegal	French Guiana
Republic	Guinea	Somalia	Guyana
Chad	Guinea-Bissau	Sudan	Panama <sup>1</sup>
Congo	Kenya	Tanzania	Paraguay <sup>1</sup>
Côte d'Ivoire	Liberia	Togo	Peru <sup>1</sup>
Democratic Republic of	Mali	Uganda	Suriname
Congo	Mauritania		Trinidad and
	Niger		Tobago
			Venezuela <sup>1</sup>

Il certificato di vaccinazione è valido solo se conforme al modello approvato dall'WHO e rilasciato da un Centro di Vaccinazione contro la Febbre Gialla legalmente autorizzato dal Ministero della Sanità. Il periodo di validità di un certificato internazionale di vaccinazione contro la febbre gialla è di 10 anni, a contare dal 10° giorno che segue la vaccinazione. Nei casi di una persona rivaccinata prima della fine di questo periodo, la validità è prorogata per altri 10 anni a partire dal giorno di rivaccinazione.

## Effetti collaterali del vaccino

---

### *Reazioni lievi*

Si possono osservare lievi reazioni locali al vaccino come arrossamento e dolore nel punto di inoculazione. Le reazioni generali sono rappresentate da lieve cefalea, febbre, dolori muscolari, o altri sintomi minori che si verificano tra il 5° e 12° giorno a seguito della vaccinazione, per le quali è indicato un trattamento sintomatico. Il 25% dei soggetti immunizzati ha riportato una o più reazioni, generalmente lievi, caratterizzate da sintomi sistemici simil-influenzali (22%), o reazioni locali (5%).

### *Ipersensibilità immediata*

Reazioni da ipersensibilità immediata sono caratterizzate da rash, orticaria, o asma o una combinazione di queste: l'incidenza di tali reazioni è stimata essere <0.8 per 100.000 somministrazioni di vaccino [Kelso, Mootrey and Tsai 1999].

### *Malattie neurologiche*

Storicamente, il vaccino contro la febbre gialla era associato a eventi avversi, che si evidenziavano soprattutto nei bambini come encefalite. Dal 1992 ad oggi sei casi di encefalite tra gli adulti sono stati riportati all' U.S. Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) [CDC 2002, Marfin, Barwick and Monath 2006]. Inoltre dieci casi di malattie neurologiche autoimmuni sono state riportate al VAERS tra cui casi di sindrome di Guillian-Barré e encefalite acuta disseminata. Tutti i pazienti con malattie neurologiche associate alla febbre gialla hanno avuto un'insorgenza dei sintomi da 4 a 27 giorni dalla vaccinazione. Il rischio di contrarre un effetto avverso di tipo neurologico è stimato essere intorno a 0,5 per 100.000 dosi di vaccino distribuite.

### *Malattie viscerali*

Reazioni estremamente severe sono state descritte negli ultimi 10 anni tra i vaccinati contro la febbre gialla. Questa sindrome è stata descritta come un'insufficienza multi-organo, chiamata "yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease" (YEL-AVD). Dal 1996, 12 casi YEL-AVD (una malattia che clinicamente e patologicamente simile a quella causata dal virus della febbre gialla) sono stati riportati in USA, [CDC 2002] e altri 24 casi sospetti sono stati identificati nel mondo fino all'agosto del 2006 [Adhiyaman, et al, 2001 Marfin et al, 2006]. Il 58% dei casi in USA è stato fatale. Tutti i casi sono stati riportati in soggetti che avevano ricevuto la prima vaccinazione. Il rischio di incorrere in tale evento avverso è stato stimato essere intorno a 0,3-0,5 per 100.000 dosi di vaccino distribuite. La frequenza appare più alta in persone con età maggiore di 65 anni con un rischio >1,8 casi per 100.000 dosi di vaccino distribuite.

Poiché sono stati riportati di recente casi di morti tra i viaggiatori non vaccinati che si sono recati in zone endemiche per febbre gialla, la vaccinazione dovrebbe comunque essere incoraggiata tra i viaggiatori verso zone endemiche come strategia preventiva. Tuttavia, dal momento che la vaccinazione contro la febbre gialla può causare reazioni avverse severe, il medico dovrebbe somministrare le vaccinazioni solo a persone veramente esposte al rischio di contrarre la febbre gialla.

### *Precauzioni e controindicazioni*

---

#### *Età*

La vaccinazione contro la febbre gialla è controindicata nei bambini di età inferiore ai 6 mesi. I bambini di meno di 4 mesi di età non devono essere vaccinati, in quanto hanno un maggior rischio di contrarre encefalite. Il rischio di questa complicazione appare correlato all'età [Cetron et al, 2002].

La decisione di vaccinare o meno i bambini tra i 4 e i 9 mesi deve basarsi sulla stima del rischio di esposizione (i bambini di più di 4 mesi che si recano in zone con epidemie in corso devono essere vaccinati nel caso in cui non sia possibile ottenere un livello elevato di protezione contro le zanzare adottando altre misure preventive).

L'analisi degli eventi avversi riportati al VAERS, indica che persone con più di 60 anni di età potrebbero essere a maggior rischio di una reazione di insufficienza multi-organo in rapporto a persone più giovani. Il rischio per qualsiasi tipo di evento avverso a seguito della vaccinazione di persone di età tra i 60-69 anni, è stato stimato essere di 4 casi su 100.000 dosi e per le persone di età superiore ai 70 anni è stato stimato un rischio di 7,5 su 100.000 dosi [Khromava et al, 2005]. I viaggiatori di età maggiore di 60 anni dovrebbero discutere con il proprio medico i rischi ed i benefici della vaccinazione nel contesto della specifica destinazione del loro viaggio.

#### *Malattia del timo*

L'anamnesi positiva di malattia del timo è stata recentemente identificata come controindicazione alla vaccinazione contro la febbre gialla [Barwick, 2004]. Infatti l'11% di coloro che hanno avuto un'insufficienza multiorgano sono persone che erano avevano una storia di malattia del timo, suggerendo che la disfunzione del timo possa essere un fattore indipendente di rischio per YEL-AVD.

#### *Gravidanza*

E' prudente evitare di vaccinare le donne in gravidanza e quindi è necessario sconsigliare i viaggi in zone endemiche per febbre gialla durante la gravidanza. Se il viaggio è improrogabile, la donna deve essere vaccinata, ma sebbene non ci siano evidenze di danno fetale derivante dal vaccino, il

neonato dovrà poi essere monitorato per valutare un eventuale infezione congenita o altri possibili effetti collaterali derivanti dal vaccino.

I tassi di sieroconversione materna in caso di gravidanza sono più bassi per effetto dello stato di immunosoppressione associato alla gravidanza; è perciò indicato procedere ad una nuova vaccinazione dopo il parto [Nasidi et al,1993 Suzano et al, 2006].

### *Allattamento*

Non ci sono evidenze di escrezione nel latte materno del vaccino. Non sono stati riportati eventi di trasmissione al bambino del virus vaccino dalla madre durante l'allattamento. Tuttavia, come misura precauzionale, la vaccinazione in donne che allattano dovrebbe essere evitata.

### *Immunosoppressione*

L'immunodeficienza dovuta all'infezione da virus HIV determina una riduzione della risposta immunologica alla vaccinazione. Una diminuzione della risposta anticorpale si verifica anche negli stati di malnutrizione e in altre situazioni di immunodeficienza: leucemia, linfomi, somministrazioni di corticosteroidi, radiazioni, ecc. Comunque il vaccino è raccomandato nei pazienti con infezione da HIV asintomatici. Per i soggetti con AIDS, invece, non vi sono evidenze scientifiche per stabilire con certezza se la somministrazione del vaccino possa rappresentare un rischio per la persona [Cetron et al, 2002]. La decisione di vaccinare i soggetti immunocompromessi deve essere presa considerando, caso per caso, le condizioni cliniche del paziente ed il rischio di esposizione.

Se il viaggio in zone a rischio di febbre gialla è necessario e la vaccinazione è controindicata, i soggetti devono essere avvisati del rischio e istruiti sulle precauzioni da adottare per evitare la puntura delle zanzare. L'assunzione di cortisone a basse dosi o per brevi periodi di tempo (< 2 settimane), o

somministrato a livello locale (occhio, cute), per aerosol o per iniezioni intra-articolare, non rappresenta una controindicazione alla vaccinazione. I familiari degli immunodepressi che non presentino controindicazioni, possono ricevere il vaccino contro la febbre gialla.

#### *Ipersensibilità*

Poiché il vaccino contro la febbre gialla è prodotto su uova embrionate e contiene proteine dell'uovo che possono scatenare reazioni allergiche, i soggetti che presentino segni e sintomi da shock anafilattico dopo aver ingerito uova, non devono essere vaccinati. Se la vaccinazione risulta necessaria per l'alto rischio d'esposizione, questi stessi soggetti devono essere sottoposti a test cutanei per le componenti del vaccino, prima della sua somministrazione. Se la vaccinazione è richiesta dalle norme di un Paese, ma non vi è un reale rischio di infezione per le caratteristiche del soggiorno, al paziente allergico all'uovo potrebbe essere rilasciato un certificato internazionale di esenzione.

#### *Associazione con altri vaccini e farmaci*

Gli studi effettuati hanno dimostrato come la risposta anticorpale al vaccino antifebbre gialla non sia inibita dalla somministrazione di altri vaccini sia contestuale sia a distanza di un tempo variabile, da pochi giorni a un mese. I vaccini antimorbillo e antitubercolare sono stati somministrati in combinazione senza che si sia riscontrata alcuna interferenza né reazioni più gravi.

Anche il vaccino antiepatite B può essere somministrato in associazione. Non vi sono prove di una possibile interferenza tra il vaccino per la febbre gialla e quelli per il tifo, la rabbia, la peste e l'encefalite giapponese. Alcuni dati indicano come coloro che hanno ricevuto il vaccino per la febbre gialla e per il colera contemporaneamente o a distanza di 1-3

settimane, abbiano sviluppato una minore risposta anticipata nei confronti di entrambi i vaccini. Quindi se possibile gli stessi vaccini dovrebbero essere somministrati con un intervallo minimo di 3 settimane.

# MALATTIE INFETTIVE, VACCINAZIONI E PREVENZIONE DEI TUMORI, IN PARTICOLARE DEL MELANOMA

---

## *Malattie infettive e prevenzione dei tumori*

Per quanto riguarda la relazione tra infezioni e cancro, il primo studio che affrontava tale argomento è stato pubblicato nel 1874 da Campbell De Morgan [Pathological Society of London, 1874]. Egli presentò le sue osservazioni in uno studio dove affermava che talora il cancro va incontro a regressione spontanea, attestando inoltre che tale regressione in alcuni casi era associata a infezione con TBC. Altri lavori pubblicati alla fine del XIX secolo hanno confermato la relazione tra infezioni e regressione del cancro e in particolare William Coley, un chirurgo americano, ha ideato una terapia originale (“Coley toxin”) consistente in culture di *Streptococcus pyogenes* and *Serratia marcescens* uccise ad alte temperature e filtrate in colture sterili. Questa sostanza conteneva alcuni delle più potenti sostanze immunoregolatorie come ad esempio lipopolisaccaridi, esotossine, enzimi come la streptochinasi e un’innumerabile quantità d’antigeni batterici. Tale miscela di estratti di batteri veniva somministrata a pazienti con tumori estesi e non operabili ed è stata documentata la guarigione di alcuni di essi (Coley, Fowler and Bogatko, 1894). Tuttavia i risultati erano del tutto imprevedibili e inspiegabili, date le scarse e limitate conoscenze di batteriologia e immunologia di quel tempo (Coley, 1953). Congiuntamente, l’avvento della radioterapia e della chemioterapia portarono a sottovalutare le indicazioni di Coley e fino a poco tempo fa il tentativo di prevenire i

tumori con le vaccinazioni e l'immunoterapia ha incontrato generalmente solo cinismo e ostilità [Takeuchi, 1996]. Nonostante questo, recenti sviluppi della biologia sul cancro e soprattutto dell'ipotesi sull'immunosorveglianza nei confronti della patologia tumorale, hanno generato un clima più ottimistico. Con le attuali conoscenze, infatti, si è iniziato a comprendere meglio quali meccanismi fisiopatologici potrebbero sottendere al beneficio indotto da tale terapia. Il Tumour necrosis factor (TNF) è stata la prima molecola, che si è scoperta direttamente correlata alla tossina di Coley, avente un effetto anticancro.

Oggi parecchie altre molecole della famiglia di TNF sono oggetto di un'ostinata ricerca come potenziali agenti anticancro, tra cui ad esempio il TNF-ligando, che induce l'apoptosi cellulare. Un altro costituente della tossina di Coley è la streptochinasi, che potrebbe anche avere effetti favorevoli nel trattamento di tumori, in quanto produce un fattore di crescita endoteliale (VEGF), che favorisce la risposta immunitaria contro le cellule tumorali. [Thornes, 1975]. E' dovuto passare mezzo secolo per scoprire solo pochi meccanismi che potrebbero spiegare l'effetto anticancro della tossina di Coley, e probabilmente siamo ancora lontani dalla comprensione completa degli effetti sul sistema immunitario, stimolati da tale terapia.

Una delle ragioni di questo rinnovato interesse per la possibilità di utilizzare meccanismi immunologici per la prevenzione e il trattamento del cancro, è il crescente consolidamento della "hygiene hypothesis" ("ipotesi igienistica") o "ipotesi di Greaves". Questa ipotesi suppone che il sistema immunitario richieda diverse esposizioni a vari micro-organismi ambientali per la sua naturale maturazione e regolare sviluppo. Milioni d'anni di evoluzione hanno portato il sistema immunitario ad attendersi una varietà di stimoli microbici che ora, nelle nazioni sviluppate industrialmente, sono assenti per il crescente avvento dell'igiene e quindi di ambienti sempre più sanificati. Tali cambiamenti, iniziati almeno un secolo fa, sono stati

particolarmente evidenti alla fine della Seconda Guerra Mondiale, quando gli antibiotici portarono ad un ulteriore deprivazione di infezioni batteriche tra coloro che sono nati dopo il 1945 [Stanford, Stanford & Grange, 2001]. Tale teoria postula che la conseguente disregolazione immunologica sia responsabile tanto del crescente aumento dell'incidenza di patologie tumorali quanto dei disordini allergici e delle malattie autoimmuni nel mondo industrializzato [Bach, 2002; . Greaves , 1997 Stanford, Stanford & Grange, 2001]. In questo contesto, i fattori che aumentano l'esposizione ad un vario genere d'infezioni e di altri stimoli microbici (ad esempio avere fratelli più vecchi, vivere in fattoria o frequentare asili nido) proteggono i bambini dall'asma e da altri disordini allergici [Martinez & Holt, 1999]. La leucemia acuta, la più comune patologia maligna riscontrata nei bambini, presenta un'alta incidenza particolarmente nei paesi ricchi ed è stato postulato che questa malattia sia in qualche modo associata ad uno "stress proliferativo immunitario", determinato da fattori ambientali, e derivato da una originariamente ridotta esposizione a stimoli microbici [Greaves, 1997]. Questa ipotesi è stata confermata da due studi epidemiologici che chiaramente dimostrano come gli stessi fattori indicati dall'ipotesi "igienista di Greaves" come protettivi per lo sviluppo delle patologie allergiche (come ad esempio la frequentazione di asili nido), sono anche protettivi contro la leucemia infantile [Ma, et al. 2000; Perrillat et al 2002]. In particolare, lo studio di Ma ha rilevato come l'O.R. associato ad ogni mille ore/bambino (numero di ore di frequentazione del nido X numero di bambini con cui è venuto a contatto) fosse di 0.991 (95%CI 0.984 – 0.999). E' stato dimostrato infatti che i controlli sani avevano frequentato in proporzione maggiore dei casi affetti da leucemia l'asilo nido, ad un età più precoce, rimanevano all'asilo più ore ed erano entrati a contatto con più bambini.

Queste osservazioni invitano ad una seria considerazione circa le possibili strategie per prevenire la disregolazione immunitaria indotta nelle nazioni

industrializzate. Ovviamente non si mette in dubbio che l'igiene e il controllo delle infezioni abbiano enormemente migliorato la salute umana e non è in questione l'opportunità di un ritorno all'era delle infezioni largamente diffuse, tuttavia si potrebbe intervenire usando certe vaccinazioni al fine di ripristinare uno stimolo naturale che determini un normale sviluppo del sistema immunitario [Grange, Dorè & Coebergh, 2005].

### *Vaccinazioni e prevenzione dei tumori*

In letteratura è stata dimostrata un'associazione inversa tra BCG (vaccino con Bacillo Calmette Guerin contro la tubercolosi) e rischio di patologia neoplastica, diversa dal melanoma. Ad esempio, parecchi studi eseguiti in USA, Canada, Australia, Finlandia e Israele, hanno dimostrato come la vaccinazione con BCG abbia un'azione protettiva contro la leucemia e altri tumori in età infantile [Rosenthal, 1986; Grange & Stanford, 1990]. Tuttavia una ricerca del New Zeland, che studiava bambini vaccinati all'età di 13 anni, ha dimostrato come tale vaccinazione non sia protettiva nei confronti della leucemia [Skegg, 1975], mentre uno studio eseguito da Comstock in Alabama ha evidenziato come tale vaccinazione potrebbe aumentarne lievemente il rischio [Comstock, 1971]. Una rivalutazione di tutti questi studi ha permesso di evidenziare come la protezione contro la leucemia si palesasse solo nelle regioni dove il BCG viene somministrato in epoca neonatale [Grange & Stanford., 1990]

L'impatto della vaccinazione Vaccinia Virus (virus Vaccinia di origine bovina contro il vaiolo) sullo sviluppo del cancro è stato studiato solamente in un piccolo studio di pazienti affetti da rabdomiosarcoma.

E' possibile che, in linea con l'ipotesi di Greaves, la vaccinazione con BCG, abbia un effetto favorevole sulla maturazione del sistema immune in un ambiente dove altri stimoli sono ridotti o assenti.

Un' ipotesi differente, ma non incompatibile, è stata proposta da Rosenthal, il quale, negli studi condotti a Cicago, è stato il primo ad osservare che la BCG neonatale riduce l'incidenza di leucemia e altre malattie nell'infanzia [Rosenthal, 1986]. Rosenthal ha postulato che un'importante funzione della immunità T-cell mediata nelle prime fasi della vita, sia quella di rimuovere resti di tessuto embrionale capaci di evolvere in tessuto neoplastico: questa funzione potrebbe essere stimolata da certe infezioni o vaccini (specialmente BCG) che inducono una risposta cellulare immune piuttosto che una risposta anticorpale. E' degno di nota che in Africa sia stata dimostrata una non specifica maggior sopravvivenza dei bambini vaccinati con il BCG e con il Vaccinia Virus nonché contro il morbillo, a differenza dei bambini vaccinati contro il tetano e la difterite [Bonnani, 1999]. Queste ultime vaccinazioni producono primariamente una risposta anticorpale.

Le basi cellulari della protezione contro il tumore, mediante le infezioni naturali o certe vaccinazioni, sono ancora poco conosciute, così come poco noti sono i meccanismi immunologici che sottendono a tale relazione. E' comunque da notare che i bambini nascono con una polarizzazione verso cellule Th2, che successivamente evolve in profilo verso i Th1 [Holt, 1999]. Questo "switch" è facilitato da fattori ambientali, quali prevalentemente le infezioni batteriche [Rook & Stanford, 1998]; l'assenza di tali fattori potrebbe portare, come osservato, all'aumento di incidenza di malattie atopiche attraverso la facilitazione della "deriva" Th2. Allo stesso modo diversi report evidenziano un'associazione tra il cancro e la "deriva" Th2. In altri casi il "grado di deriva" è correlato alla gravità della malattia o è predittore di un prognosi infausta [Stanford et al, 1999]. La vaccinazione

neonatale con BCG induce una risposta Th1 aumentata [Marchent et al 1999]

Sebbene sia difficile separare causa ed effetto, gli effetti benefici indotti dall'immunoterapia con BCG e il *Mycobacterium Vaccae* ucciso sono associati ad un movimento verso la produzione di citochine Th1 [Kaempfer et al 1996; Maraveyas et al 1999 ]. Comunque, nel considerare l'impatto di fattori ambientali associati con malattie legate ad una disfunzione del sistema immunitario, si deve sempre considerare come ci siano parecchi tipi e pattern di deficit del sistema immunitario, e quindi il bilancio Th1/Th2 sia probabilmente solo un aspetto superficiale di meccanismi più complessi.

### *Vaccinazioni e immunoterapia del melanoma*

Riguardo alle vaccinazioni, la prima pubblicazione sull'utilizzo della vaccinazione con BCG, come vaccinazione contro il cancro, risulta pubblicata nel 1935, tuttavia studi clinici sperimentali non sono stati eseguiti fino al 1950. Questi generarono entusiasmo riguardo all'utilizzo di tale vaccinazione contro numerose forme tumorali, incluso il melanoma [Crispen,1989]. Risultati promettenti su cavie [Zbar et al, 1972] hanno stimolato una serie di trial terapeutici inizialmente caratterizzati da una ridotta numerosità campionaria. Dapprima sono stati pubblicati soprattutto studi non controllati, che supportavano l'utilizzo di BCG come una terapia efficace contro il melanoma; ma più tardi studi randomizzati-controllati, con un numero maggiore di soggetti coinvolti, non confermarono questi risultati. Infatti, in uno studio di meta-analisi sull'efficacia del BCG, Tane & Ho (1993) hanno individuato 20 studi randomizzati e controllati dove uno dei regimi terapeutici consisteva nella somministrazione di BCG. Le conclusioni di questi studi erano molto variabili e l'analisi congiunta dei risultati non dimostrava un reale beneficio della vaccinazione BCG. Di

conseguenza, l'interesse per questa forma di terapia per il melanoma è calato ed ulteriori ricerche in questo ambito sono state fortemente ridotte.

Esperienze con il Virus Vaccinia come agente terapeutico per il melanoma sono state meno avanzate. Nel 1970, quattro gruppi di ricerca sperimentarono la terapia con Virus Vaccinia basandosi su studi piccoli, coinvolgenti soprattutto soggetti con melanoma in stadio metastatico [Hermann et al, 1970; Hunter-Criag et al, 1970; Roenigk et al, 1974; Everall et al, 1975]. In questi studi l'esito positivo del trattamento fu limitato a pochi pazienti e la risposta al trattamento si è dimostrata transitoria. Perciò questo approccio terapeutico al melanoma non fu più utilizzato.

### *Vaccinazioni e riduzione del rischio di melanoma: studi epidemiologici*

Sono stati condotti successivamente due studi epidemiologici “studi FEBIM” (FEBrile Infection and melanoma) con il finanziamento del “Cancer Research Institute” ed il supporto scientifico del “Melanoma Cooperative Group dell'European Organization for Research and Treatment of Cancer”, l'obiettivo era quello di studiare la relazione tra vaccinazioni, malattie infettive e l'incidenza di melanoma e la sopravvivenza dopo diagnosi di melanoma.

In particolare, lo scopo dello studio FEBIM 1 era quello di determinare se le malattie infettive e le vaccinazioni eseguite nel primo anno di vita, come la vaccinazione con BCG e/o con Vaccinia Virus, potessero modificare il rischio di sviluppare il melanoma [Krone et al, 2003, Pfahlberg et al, 2002]. A tal fine è stato condotto uno studio caso-controllo “population based” che ha coinvolto 11 istituzioni collaboranti in sei nazioni europee e Israele. Dal 1994 al 1997 sono stati arruolati 603 casi incidenti di melanoma (277 maschi e 326 femmine) e 627 controlli provenienti dalla popolazione, senza

diagnosi di melanoma (263 maschi e 364 femmine). I controlli sono stati appaiati ai casi all'interno d'ogni centro per sesso, età ed origine etnica. Sono state raccolte informazioni dettagliate riguardo all'esposizione a possibili fattori di rischio tra cui l'anamnesi delle malattie infettive. Inoltre è stata domandata l'esposizione, in età infantile, a vaccinazioni contro la TBC e contro il vaiolo. Le variabili confondenti considerate in questo studio erano il centro dello studio, l'età, il sesso, l'origine etnica, il tipo di pelle secondo la classificazione di Fitzpatrick [Fitzpatrick, 1988], il numero di nevi pigmentati ed infine il numero di scottature. È stata eseguita una regressione logistica dapprima analizzando in due separati modelli l'effetto delle vaccinazioni separatamente: ciascuno di questi modelli prevedeva la variabile d'esposizione alla vaccinazione sotto studio espressa come dicotomica. I risultati di questi modelli evidenziano come l'O.R. di melanoma sia di 0.69 (.052-0.92) nei soggetti vaccinati con BCG, di 0.65 (0.44-0.98) nei soggetti vaccinati con Vaccinia Virus e di 0.91 (0.65-1.28) nei soggetti vaccinati contro l'influenza. È stata successivamente eseguita una regressione logistica multipla per determinare l'effetto combinato delle due vaccinazioni (BCG e Vaccinia Virus) sull'odd di melanoma. In questa analisi sono state considerate entrambe le vaccinazioni e la loro interazione, incorporando inoltre tutte le variabili confondenti. Questa analisi ha dimostrato che, fissato ad 1.00 l'O.R. di melanoma per quei soggetti che non avevano eseguito nessuno dei due vaccini, è stato dimostrato un O.R. di 0.40 (0.18-0.85) per i soggetti vaccinati solo con BCG, un O.R. di 0.60 (0.36-0.99) per i soggetti vaccinati solo con la vaccinazione antivaiolosa e un O.R. di 0.41 (0.25-0.67) tra coloro che avevano eseguito entrambe le vaccinazioni. Risultati del tutto sovrapponibili si evidenziano per entrambi i sessi, mentre è emerso che i due gruppi, definiti secondo l'età  $<,o >$ , ai 50 anni, presentano risultati tra loro molto diversi. Infatti, nel gruppo dei soggetti più giovani ( $<50$  anni) la riduzione del rischio è stata maggiore

rispetto a quella riscontrata nel gruppo di soggetti più vecchi (>50 anni): gli odds ratio di melanoma, rispetto al gruppo dei soggetti non vaccinati, nei soggetti giovani erano di 0.23, 0.31 e 0.27 rispettivamente tra i soggetti vaccinati solo con BCG, solo con vaccinia, e con entrambe le vaccinazioni, in confronto agli odds ratio di 0.75, 0.69, e 0.48 nei soggetti più vecchi. Tale discrepanza potrebbe supportare l'ipotesi causale che collega le vaccinazioni alla prevenzione della malattia, infatti è ben noto che la protezione apportata dalle due vaccinazioni ha un effetto dipendente dal tempo in quanto la risposta immunitaria può calare nel tempo, dopo la somministrazione del vaccino [Colditz et al, 1994; Henderson & Moss, 1999]. Quindi la dimostrazione di un effetto protettivo maggiore nell'età <50 anni è un risultato atteso secondo tale ipotesi.

Dai risultati inoltre è emerso che, se si comparano i rischi di due gruppi, definiti dallo spessore del melanoma secondo Breslow (O.R. di malattia 0.57 versus 0.39), si nota un effetto protettivo maggiore della vaccinazione nel gruppo di soggetti con uno spessore >1.5 mm. Quindi sembra che la vaccinazione protegga maggiormente dalle forme neoplastiche più aggressive.

Inoltre è stato esaminato l'effetto congiunto di vaccinazioni e malattie infettive sul rischio di melanoma. Già in un'analisi separata era emersa l'associazione tra malattie infettive e melanoma, infatti è stato verificato come l'anamnesi patologica remota positiva per infezioni severe con febbre >38.5°C (es. sepsi, polmonite, tubercolosi polmonare) è associata con un rischio ridotto di melanoma; altre infezioni sempre con febbre >38.5 ma meno severe, come ad esempio l'influenza, sono dimostrate essere associate ad una modesta riduzione di rischio per melanoma, ma ripetuti episodi di tali malattie determinano una riduzione del rischio di melanoma che raggiunge la significatività statistica; le altre infezioni, quando analizzate

come un singolo evento non hanno alcun impatto nella riduzione del rischio di melanoma. I risultati dell'analisi, che mirava a studiare l'effetto congiunto delle vaccinazioni e delle malattie infettive, sono illustrati nella tabella 3.

**Tabella 3:** [dati tratti da Krone B, et al. 2003]. Risultati della regressione multipla per studiare l'effetto congiunto delle vaccinazioni e delle malattie infettive

**Effetto combinato del numero di infezioni e delle vaccinazioni sul rischio di melanoma**

Vaccinazione	Infezioni gravi		Infezioni meno gravi (Temp > 38.5°C)	
	0	≥1	0	≥1
No	1.0	0.4 (0.1-1.4)	1.0	0.8 (0.3-2.1)
BCG o Vaccinia	0.6 (0.3-0.9)	0.3 (0.2-0.6)	0.6 (0.3-1.1)	0.4 (0.2-0.7)
BCG e Vaccinia	0.4 (0.2-0.7)	0.3 (0.2-0.7)	0.5 (0.3-0.8)	0.3 (0.2-0.6)

OR aggiustati per Centro, sesso, età, fenotipo cutaneo, Freckling index, numero di nevi, numero di ustioni solari

L'analisi congiunta degli effetti delle vaccinazioni e delle malattie infettive sul rischio di melanoma ha dimostrato un effetto “quasi non additivo” sul rischio di melanoma tra episodio di infezione severa e l'effetto di una vaccinazione. Tuttavia l'effetto di protezione determinato da queste esposizioni ha un “limite massimo” di difesa che non può essere aumentato con il ricorso a nuove vaccinazioni o con la manifestazione di nuove malattie infettive, per cui alcuni soggetti, seppur vaccinati o affetti in passato da malattie infettive importanti, incorrono nel melanoma.

Dai dati emersi dagli studi epidemiologici si può identificare un fattore di rischio per melanoma, chiamato “non essere vaccinato sia con BCG sia con Vaccinia virus” (abbreviato si può denominare “non vaccinato”) e un altro

fattore di rischio può essere denominato “assenza di alcuna infezione importante”. Queste due variabili agiscono sinergicamente tra loro. La protezione contro il melanoma non è solo conferita da una o entrambe le vaccinazioni, ma anche da un’anamnesi remota caratterizzata da una o più infezioni importanti. Data l’eziologia eterogenea delle infezioni, l’influenza di una sinologa particolare infezione non può essere determinata. Inoltre dal momento che le infezioni severe ( ad esempio meningite, sепsi..) sono ormai rare ai giorni d’oggi, la protezione per la popolazione Europea è dovuta principalmente alle vaccinazioni. Fino al 1975, più del 90% della popolazione Europea era stata vaccinata con il virus vaccinia. Ora non si raggiunge più tale copertura nelle generazioni di giovani, per le quali anche la vaccinazione con BCG è maggiormente rara. I cambi di strategie vaccinali provocheranno quindi un rischio addizionale di melanoma.

Con un’analisi multivariata, considerando le variabili “ non-vaccinato” e altre covariate, sono emersi effetti concomitanti che hanno rilevanza pratica oltre che teorica. Si è infatti dimostrata un’associazione sinergica tra “non-vaccinato” e altre due variabili: “tipo di cute secondo Fitzpatrick I” e “>5 scottature della pelle”; inoltre è stata evidenziata un’associazione non-cumulativa tra “non vaccinato” e due fattori di rischio endogeni definiti come “>4 nevi” e “> 20 lentiggini sul braccio” [Krone et al, 2005]. La conseguenza pratica di questi risultati si esplica nel fatto che le persone portatrici di fattori di rischio endogeni già conosciuti per melanoma (ad esempio persone con una pelle sensibile) ed esogeni (soggetti con ripetute scottature), sono ancora a maggior rischio se non vaccinate. Inoltre si può affermare che l’effetto concomitante osservato tra vaccinazioni e altre covariate sul rischio di melanoma, implica che questi fattori non siano tra loro indipendenti. L’associazione non cumulativa tra la variabile “non vaccinato” e anomalie della pigmentazione della cute “>4 nevi” e “> 20

lentiggini sul braccio” indica che il non essere vaccinato e le due variabili stanno riflettendo uno stesso fattore di rischio di melanoma.

Inoltre questo suggerisce che ci sia un target di sorveglianza immunitaria e che questo sia un fattore endogeno, piuttosto che espresso solamente in cellule che hanno già sviluppato il melanoma.

Quindi dai dati emersi dagli studi epidemiologici, si concludere che:

- il Vaccinia virus e la vaccinazione con BCG inducono o aumentano un qualche meccanismo di sorveglianza immunitaria che sia capace di sopprimere la manifestazione di un fattore di rischio endogeno per melanoma, geneticamente codificato;
- l’associazione del fattore di rischio “non-vaccinato” con due diverse anomalie della pigmentazione cutanea suggerisce che questo fattore di rischio potrebbe influire sulla pigmentazione o almeno sulla sua regolazione;
- l’effetto sinergico di fattore di rischio “non-vaccinato” con due indicatori di vulnerabilità cutanea (variabili “tipo di cute secondo Fitzpatrick I” e “>5 scottature della pelle”) indica come questo fattore di rischio predisponga la pelle a subire il danno da esposizione a radiazione ultravioletta, particolarmente in pazienti con basso livello, geneticamente determinato, di una naturale pigmentazione melaninica protettiva.

Un secondo studio ha tentato di dimostrare se il fatto di essere vaccinato potesse avere un effetto sulla prognosi di pazienti che hanno sviluppato un melanoma. In specifico lo scopo di questo studio coorte era quello di determinare se una precedente immunizzazione con Virus Vaccinia e/o BCG e malattie infettive occorse prima della rimozione chirurgica del melanoma primario influenzassero la sopravvivenza a lungo termine. E’ stato quindi eseguito uno studio coorte ambidirezionale che ha coinvolto

il gruppo dei casi dello studio caso-controllo FEBIM (FEBrile Infection and melanoma) (Koelmel et al, 2005). In questo studio tutti i pazienti sono stati arruolati immediatamente dopo la rimozione chirurgica del melanoma e con la conferma istopatologica della diagnosi. Il periodo d'arruolamento si è esteso dal marzo 1994 all'Agosto 1997. I pazienti sono stati esaminati in modo prospettico ad intervalli regolari fino alla fine del follow-up o comunque fino al decesso. L'endpoint primario è stato considerato la morte del paziente, indipendentemente dalla causa. Attraverso un questionario e mediante i dati registrati nella cartella clinica, sono state ottenute informazioni sui fattori noti correlati alla prognosi (presenza/assenza di ulcerazione, spessore misurato secondo Breslow, sede del melanoma e tipo di melanoma: superficiale, nodulare, lentigo maligna e acrale lentiginoso), sull'utilizzo di terapie coadiuvanti e sull'esposizione a vaccinazioni e malattie infettive. Sono stati esclusi dalla coorte i soggetti con melanoma in situ. In totale i pazienti seguiti per l'intero follow-up sono stati 542. Sono stati calcolati gli Hazard Ratio (H.R.) aggiustati, con l'intervallo di confidenza (CI95%). La mediana della sopravvivenza nella coorte è risultata di 35 mesi. Dai risultati di questo studio è emerso che la prognosi è correlata negativamente, in accordo con le conoscenze già provate in letteratura, con lo spessore secondo Breslow del tumore espresso in mm (H.R.= 1.17; 1.11-1.25), con l'ulcerazione del tumore (H.R.= 1.71 1.18-2.47) e con il tipo di melanoma acrale lentiginoso rispetto al melanoma con estensione superficiale (H.R.= 2.71 1.41-5.22). Non hanno dimostrato effetto protettivo invece le terapie adiuvanti considerate nel loro complesso. Per quanto riguarda l'effetto delle vaccinazioni sulla prognosi del melanoma, sono state considerate due vaccinazioni: BCG e Vaccinia, nonché il loro effetto congiunto. Considerato come rischio pari a 1 quello del gruppo non vaccinato né con BCG né con virus vaccinia, il gruppo dei soggetti vaccinati solo con BCG presentava un hazard ratio pari a 0.75 (CI95% 0.30-1.86); il

gruppo di soggetti vaccinati solo con vaccinia presentava un hazard ratio pari a 0.55 (CI95% 0.34-0.89), il gruppo di soggetti vaccinati sia con virus vaccinia sia con BCG presentava un hazard ratio pari a 0.41 (CI95% 0.25-0.69). Questo studio ha permesso di dimostrare come, sebbene le vaccinazioni non prevenivano tutti i casi di melanoma, tuttavia gran parte dei soggetti vaccinati ottengono un effetto positivo in relazione alla prognosi qualora incorrano nella malattia. Gli autori sottolineano come questo effetto della vaccinazione sulla prognosi del melanoma sia molto probabilmente determinato da meccanismi diversi da quelli che sottendono l'effetto preventivo nei confronti dello sviluppo del melanoma apportato dalla vaccinazione.

## *Vaccinazioni e prevenzione del melanoma: il peptide HERV-K-MEL*

### **Il peptide HERV-K-MEL**

E' stato individuato come milioni di anni fa siano state incorporate nel genoma umano delle sequenze di DNA di un retrovirus. Questi elementi del genoma umano, chiamati con il nome di retrovirus endogeni umani (HERVs), costituiscono approssimativamente l'8% del genoma umano con possibilità di essere più numerosi del DNA che costituisce i geni funzionali. Essi giocano un ruolo chiave nell'evoluzione attraverso l'ampliamento del genoma e attraverso il contributo ai polimorfismi genetici [Leib, Seifarth and Schon, 2004]. Centinaia di HERVs sono stati descritti; alcuni codificano per peptidi antigenici e raramente per una proteina retrovirale completa o enzimi o anche particelle virali, comunque nessun HERV è capace di essere trasmissibile in un virus infettivo e trasmissibile. In generale più è recente l'inserzione dell'HERV nel genoma umano e più è

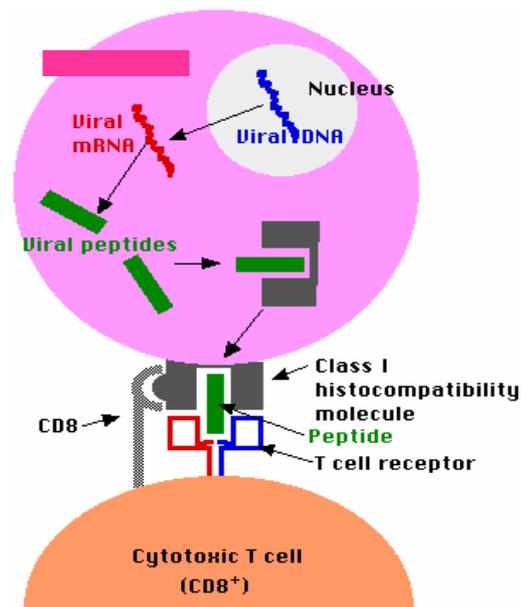
facile che possa mantenere una sua attività funzionale. E' chiaro che più l'HERV è attivo, maggiore è la sua pericolosità.

Il gruppo HERV-K è di origine relativamente recente e per la sua attività simil-trasposonica è stato studiato con interesse, come potenziale oncogene e come motivo scatenante di alcune malattie autoimmuni. Molti HERV codificano per un antigene marker tumorale, che è stato trovato su tumori solidi e nella cellule leucemiche, portando a speculazioni su un suo possibile ruolo causale nella cancerogenesi.

Studiando la risposta immune citotossica su cellule di melanoma di pazienti affetti dalla malattia, si è arrivati a caratterizzare un target antigenico in un nona o deca-peptide, con sequenza amminoacidica rispettivamente così composta: MLAVISCAV e AMLAVISCAV. Essa è codificata da un retrovirus endogeno umano di un gruppo HERV-K. Questo "marker virale" è chiamato HERV-K-MEL ed è un potenziale fattore chiave nello sviluppo del melanoma. Esso è espresso nelle cellule di melanoma e anche dei suoi precursori come il nevo displastico, ma non è presente nei melanociti o in altre cellule normali adulte [Schiavetti et al, 2002; Mster et al, 2003]. Il gene corrispondente è parte del genoma umano con 60-200 copie [Mayer, Meese, and Mueller-Lantzsch, 1997; De Parseval et al, 2003]. L'HERV-K-MEL peptide deriva dalla regione env del gene HERV-K. Una predisposizione genetica al melanoma potrebbe risultare, per esempio causata dall'assenza del codone di stop in almeno una copia di questo gene o dalla mancata repressione dell'espressione del gene, che può essere generata da una ipometilazione del genoma retrovirale. Questi eventi, qualora accadano in una specifica cellula, potrebbero essere l'evento iniziale per lo sviluppo del melanoma. Secondo tale presupposto, l'espressione di questo peptide specifico, potrebbe direttamente o indirettamente essere associato con il danno cellulare, che esita nello sviluppo del melanoma. La presentazione di questo peptide alle cellule CD8+ T è HLA-ristretto, essendo presentato in

associazione con le molecole HLA di classe I di tipo HLA-A2 (vedi figura 9)

Figura 9: Presentazione dell'antigene alle cellule CD8+ T è in associazione con le molecole HLA di classe I



Dal momento che l'HERV-KMEL è un nona o deca-peptide, la sua presentazione al sistema immunitario da parte degli antigeni di istocompatibilità HLA tipo I, non dipende da un processo proteolitico. L'antigene è riconosciuto dal sistema immune non esogeno, ma debolmente endogeno ("weak self-recognition"), inducendo una risposta auto-immune. Questa risposta, che inizia durante l'embriogenesi (durante l'embriogenesi gli antigeni, raramente espressi nelle cellule adulte, sono espressi e riconosciuti) rende capace il sistema immunitario di mantenere una sorveglianza per controllare e vigilare su tali eventi pericolosi come la trasformazione maligna.

## Omologia di sequenza tra HERV-K-Mel e peptidi microbici

I microrganismi responsabili di infezioni severe o le vaccinazioni BCG e Vaccinia presentano un'inaspettata cross-attività antigenica con il peptide MLAVISCAV e AMLAVISCAV e quindi questo determina un aumento della popolazione T cell cross-reattiva all'antigene HERV-K-mel [Brehm et al, 2002]. Infatti è stato possibile dimostrare l'omologia di sequenza tra l'antigene HERV-K-MEL e la sequenza peptidica di più di 70 patogeni umani (vedi tabella 4).

**Tabella 4:** sequenze amino-acidiche di proteine espresse da alcuni microrganismi omologhe al peptide HERV-K-MEL. [Fonte Grange et al, 2005]

Microorganism	Consensus sequence	Sequence	Length	Position	Polypeptide
<i>Bacillus cereus</i>	ML_AVIS_AV	MLGAVIS_AV	338	160-168	Ferric anguibactin transport system permease protein fatD
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	ML++SCA	MLVLLSCA	257	1-8	Conserved hypothetical protein
<i>Campylobacter jejuni</i>	+LAVI_AV	LLAVI--AV	488	343-349	Putative amino-acid transport protein
<i>Chlamydia trachomatis</i>	AM_+A++SCAV	AMPVAIVSCAV	360	137-147	Hypothetical protein
	M+_ISCAV	MMDAISCAV	412	248-256	Glutamate symport
<i>Entamoeba histolytica</i>	AML_V_SCA	AMLVSSCA	843	553-561	19 S Cap proteasome S2 subunit
<i>Enterococcus faecalis V583</i>	A.L+_ISCA	ATLNHSCA	324	289-297	Ribose-phosphate pyrophosphokinase
<i>Enterococcus faecium</i>	A+LAVI_CAV	AVLAVI_CAI	450	408-416	Hypothetical protein
<i>Escherichia coli</i>	AMLA_VVS_AV	AMLAVVSGAV	156	22-32	Cytochrome c-type protein
	+LA+S_CAV	LLAIASCAV	191	115-120	Putative fibronin-like protein sfaA
<i>Giardia lamblia</i>	A++AVI_CAV	AVIAVIGCAV	569	545-554	GLP_77_40692_38983
<i>Haemophilus influenzae</i>	LA_VSC_V	LAGVSCDV	610	318-325	Glucoamine-fructose-6-phosphate aminotransferase
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A.LA+I_CAV	AFLAMIPCA	540	179-187	PTS system, $\alpha$ -glucoside-specific II BC component
	I+_ISCAV	LSGSCAV	373	113-120	Hypothetical 42.6 kDa protein in CPS region (ORF8)
<i>Legionella pneumophila</i>	A+LA+S_AV	AVLALGSSAV	289	10-19	Major outer membrane protein precursor
<i>Leptospira interrogans</i>	ML_VSC_V	MLGFVSCIV	804	441-449	Predicted HD family protein
<i>Listeria monocytogenes</i>	AMLA--I_CAV	AMLAADYFCA	365	105-115	Similar to aminotripteridase
<i>Meraxella catarrhalis</i>	LAVI+_AV	LAVIA--AV	453	8-14	Outer membrane protein CD
<i>Mycobacterium bovis</i> (including BCG)	+LAV_V__AV	LLAVDVVPIAV	330	70-80	Probable periplasmic iron-transport lipoprotein
<i>Mycobacterium fortuitum-chelonae</i>	+L_VV__AV	LLGVV__AV	409	389-395	Tap protein
<i>Mycobacterium leprae</i>	AMLA++_AV	AMLAIFAAV	300	205-212	CDP-diacylglycerol-serine $\alpha$ -phosphatidyltransferase homologue
<i>Mycobacterium marinum</i>	AM_AV+_AV	AMSAVAALAV	309	12-21	Ery protein precursor
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	M+A+IS_AV	MIALISYAV	608	165-173	Hypothetical protein
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	LA_VS_AV	LAGVSYAV	174	130-137	Outer membrane protein
<i>Neisseria meningitidis</i>	ML_I+CA	MLGGITCA	823	96-103	Cation transport ATPase, E1-E2 family
Orf virus	+LAV+_AV	LLAVAAVAV	74	38-46	Homolog to vaccinia virus F9L protein
<i>Pasteurella multocida</i>	LAV++CA	LAVVTCA	443	55-61	Unknown
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AML+IS_AV	AMLVIIS_AV	296	273-281	Conserved hypothetical protein
<i>Salmonella enterica</i>	MLA+LAV	MLAMIVSAV	710	662-670	Putative membrane protein igaA homolog
<i>Serratia marcescens</i>	A.LAV+_CAV	AFLAVVHCAV	217	182-191	Unknown
<i>Shigella flexneri</i>	AMLA_V+S_AV	AMLALVVSAGAV	156	22-32	Cytochrome c-type protein
<i>Staphylococcus aureus</i>	MLA_IS_AV	MLAGISVAV	331	244-252	Lipoprotein
<i>Streptococcus agalactiae</i>	A+LA_ISCAV	ALLRAFISCAV	431	159-169	Sensor histidine kinase
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+LAVV+--CAV	LLAVVTIVFCAV	136	22-33	Conserved hypothetical protein
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ML--AV_SCA+	MLKQAV_SCAI	164	112-121	Conserved hypothetical protein
<i>Treponema pallidum</i>	LAV+_CAV	LAVTCAV	1140	209-216	transcription-repair coupling factor
Vaccinia virus	A.LAV_HCA	ASLAVVIACA	1504	116-125	Polyprotein
<i>Vibrio cholerae</i>	LAV+CA	LAVVTCA	442	55-61	Anaerobic C4-dicarboxylate transporter
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AMLA_I_CV	AMLAAIMCIV	295	143-152	Putative transmembrane protein
Yellow fever virus	LAV_SAV	LAV_SSAV	3411	3287-3293	Polyprotein
<i>Yersinia enterocolitica</i>	L.V++CAV	LNNVVACAV	95	68-75	Transposase

Tra i vari microrganismi che esprimono proteine con questa forte omologia di sequenza con il peptide marker di melanoma vi è la *S. marcescens*, solo l'*Entamoeba histolytica* e il *Treponema pallidum* mostrano un'omologia più stretta. È importante notare come uno dei componenti essenziali della tossina di "Coley", usata nel tardo XIX e primi anni del XX secolo per il trattamento dei sarcomi e altri tumori, compreso il melanoma, fosse proprio la *S. marcescens* uccisa (prima chiamata con il nome di *Bacillus prodigiosus*)

La sequenza peptidica di queste proteine, espresse da micro-organismi, è omologa al peptide HERV-K-MEL. Tale omologia permette almeno in linea di principio, di supporre che le infezioni determinate da tali microrganismi generino piccoli peptici cross-reattivi legati alle molecole di istocompatibilità di tipo HLA-A2. Precedenti vaccinazioni con virus vivi attenuati contro tali infezioni o le infezioni stesse, determinate da questi microrganismi, potrebbero quindi portare all'espansione di cloni cellulari capaci di partecipare sorveglianza immunitaria delle cellule presentanti il peptide HERV-K-Mel. È degno di nota che siano state reperite sequenze con elevata omologia con il peptide HERV-K-MEL nei microrganismi che sono causa della maggior parte delle malattie infettive trovate protettive nei confronti del melanoma nello studio FEBIM, mentre le infezioni che non si associavano in modo statisticamente significativo alla protezione nei confronti melanoma, erano soprattutto causate da altri microrganismi. Tuttavia non si è ancora a conoscenza se questi peptidi microbici, che presentano elevata omologia, vengano scissi dalle rispettive proteine dall'azione proteolitica.

Anche il virus vaccinia ed il ceppo vivo attenuato derivato da *Mycobacterium bovis* utilizzato per il vaccino BCG presentano un'omologia di sequenza con il peptide. Comunque ci sono più di una dozzina di microrganismi con omologia di sequenza con HERV-K-MEL, che sono

utilizzati per preparare vaccini. Tra questi c'è il vaccino contro la pertosse e quello contro il tetano; ma ora vengono utilizzate formulazioni che non contengono l'antigene rilevante (il tossoide tetanico e il vaccino contro la pertosse acellulare). Tra gli altri vaccini disponibili che presentano antigeni con un'elevata omologia di sequenza con il peptide HERV-K-MEL c'è il vaccino contro la febbre gialla, come anche il vaccino orale contro il tifo e il vaccino contro l'encefalite equina del Venezuela.

Rimane inoltre da determinare se solo quegli individui, che esprimono gli antigeni di istocompatibilità di tipo HLA-A2, siano protetti dal melanoma attraverso le vaccinazioni o le gravi infezioni.

E' stato condotto uno studio che ha evidenziato come altri tipi di tumori esprimono il peptide HERV-K-MEL, compreso il sarcoma e altri carcinomi [Schiavetti et al, 2002].

Quindi la protezione offerta da queste vaccinazioni attraverso questo tipo di controllo immunitario potrebbe non essere ristretta al solo melanoma ma anche ad altri tumori esperimenti gli antigeni HERV-K-MEL.

### **Azione del sistema immunitario**

Il meccanismo con cui il sistema immunitario agisce sulle cellule probabilmente non è mediato da un effetto citotossico. Infatti, mentre è indubbio che l'attività citotossica giochi un ruolo importante nella difesa immunitaria contro tumori già sviluppati, si pensa che tale attività non riguardi la prevenzione agli stadi iniziali del melanoma. Quindi piuttosto che distruggere le cellule presentati l'antigene, appare più probabile che il meccanismo con cui agisce la difesa immunitaria sia la soppressione della espressione della proteina HERV-K-MEL. In questo modo la principale funzione del sistema di sorveglianza immunitaria è quella di prevenire la trascrizione del pseudogene HERV-K env. Ci sono chiari vantaggi dati da una risposta immune di tipo immunosoppressivo piuttosto che da una di tipo

citotossico contro gli antigeni endogeni, che sono espressi in tutte le cellule del corpo. Le cellule CD8+ T, che si sono attivate dopo un primo contatto con micro-organismi che presentano antigeni cross-reattivi, dovrebbero riconoscere l'antigene retrovirale HERV-K-MEL, che è presentato dalle molecole HLA-A2. Poiché agiscono da soppressori, essi trasmettono uno o più fattori solubili alle cellule target attraverso un contatto cellula-cellula. Il coinvolgimento di fattori solubili è ormai noto, tra questi il miglior candidato è il ganglioside, LM1 [Ritter et al, 1986]. E' stato infatti dimostrato in parecchi studi, che questa molecola possiede un effetto importante nella crescita cellulare e nella sua differenziazione, e che possa normalizzare un fenotipo maligno in varie linee cellulari pre-maligne o attraverso l'arresto del ciclo cellulare nella fase G0/G1 [Schaade et al, 1999; Nojiri et al, 1988], sopprimendo così l'espressione dell'mRNA virale. In questo contesto, è stato suggerito che il segnale del LM1 coinvolga la fosfolipasi A2, regolata dalla proteina-G e attivata dalla proteina (MAP) kinasi attraverso una attivazione della proteina kinasi C. E' stato dimostrato che LM1 attivi una notevole quantità di geni in cellule promielocitiche e sono stati di recente identificati tre differenti mRNA [Schaade et al, 2000] e LM1 allo stesso tempo sopprime due m-RNA del genoma umano che hanno un'elevata omologia con geni di retrovirus endogeni chiamati HERV-K. Nello stesso esperimento è stato dimostrato che LM1 induce NADH-ubiquinone redattasi e tioredoxina, che sono rispettivamente un'enzima ed una proteina co-enzima coinvolti nei processi di riduzione.

Un' importante ragione per la quale i geni endogeni dei retrovirus non sono normalmente espressi è l'iper-metilazione del DNA [Okada et al, 2002; Florl et al, 1999]. D'altra parte l'espressione di questi geni in alcune cellule è proprio dovuta all'ipometilazione del DNA. In queste cellule, un ragionevole motivo per il quale il ganglioside LM1 prodotto dai macrofagi, sopprime l'espressione di tali geni è da ricercarsi nella capacità di LM1 di

attivare l'enzima S-adenosil-omocisteina-idrolasi che catalizza la produzione di gruppi metilici attivi per la metilazione del DNA [Sugimoto et al, 2001] ristabilendo l'ipermetilazione. Come è stato descritto per altre cellule tumorali, anche nelle cellule di melanoma sono stati trovati molti gangliosidi con diversi "pattern" quali e quantitativi, rispetto alle cellule precursori [Bolot et al, 1998]. I gangliosidi che diffondono dalle cellule del melanoma è noto abbiano un'attività immunosoppressiva [Kong, Li and Ladisch, 2001]. Alcuni gangliosidi, come ad esempio GD1b, GT1b and GQ1b, hanno dimostrato avere un'azione di soppressione sulla crescita del melanoma umano [Kanda, Nakai and Watanabe, 2001].

Secondo il razionale prima espresso secondo cui l'antigene HERV-K-Mel sia riconosciuto come "debolmente endogeno" (weak self-recognition), le cellule T attivate, che hanno come target tale antigene, potrebbero avere una azione di tipo soppressivo più che citotossico. E' stato infatti dimostrato che l'esposizione a piccole quantità di antigeni favorisca la tolleranza. Molti meccanismi sono stati discussi in letteratura [Jun & Goodnow, 2001]. Si può arguire che questa attivazione sia basata sull'attivazione di recettori cross-leganti, i quali cross-attivano la chainsi adiacente, come dimostrato per il recettore della tirosin-chiansi [Weiss & Schlessinger, 1998].

#### **Azione della proteina HERV-K-env**

La proteina HERV-K-env è costituita da 488 a 529 amminoacidi che hanno un'omologia di sequenza con un fattore nucleare umano chiamato OREBP (Oxygen Responsive Element Binding Protein) [Merante et al, 2002; Horsley & Pavlath, 2002].

Questo fattore nucleare OREBP è essenziale per controllare la riduzione intracellulare e la sua espressione è regolata dalla tensione d'ossigeno intracellulare. E' un omodimero, che forma un dimero stabile con il DNA umano, nei due elementi responsivi all'ossigeno ORE1 e ORE2. L'OREBP

regola l'espressione di glutatione per ossidasi, un'enzima selenio dipendente, che catalizza la riduzione del perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) ad acqua ( $H_2O$ ). La proteina-env virale potrebbe bloccare il legame tra OREBP e DNA alterando la regolazione redox della cellula. Bassi livelli dell'enzima potrebbero aumentare le concentrazioni di perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e di radicali dell'anione superossido, che possono causare danni diretti al DNA.

Inoltre per una normale biosintesi di melanina è necessario una condizione ossido-riduttiva ottimale nella cellula, mentre in presenza di un alterata regolazione ossido-riduttiva si forma un pigmento anomalo. A sua volta lo stress ossidativo endogeno ed esogeno è aumentato dal pigmento anomalo e vengono generate dalle specie maggiormente reattive dell'ossigeno, come  $-OH$  [Meyskens, Farmer and Fruehauf, 2001]. Queste, a loro volta, causano danni a diverse strutture cellulari incluso il DNA.

L'aumentata tensione d'ossigeno induce poi l'attivazione di fattori nucleari, come il NF- $\kappa$ B e altri fattori, la cui espressione è dipendente dalla tensione d'ossigeno, che hanno un'attività anti-apoptotica portando insieme ad un lento processo potenzialmente tendente ad in una trasformazione maligna [Salvucci et al, 2001; Palozza et al, 2003], questo processo può impiegare anni o decenni.

Perciò se il sistema immune non è attivo o non è abbastanza efficace nell'inibizione dell'attività della proteina marker di melanoma, non riesce a contrastare lo stadio dell'iniziazione tumorale; questo permette che altri fattori di rischio agiscano indisturbati nella promozione del melanoma, quali ad esempio le scottature. Queste ultime infatti favoriscono la genesi di radicali liberi dell'ossigeno che danneggiano il DNA.

Questo processo può essere influenzato dall'apporto di selenio derivato dall'alimentazione. Infatti sono stati misurati bassi livelli di questo elemento negli adulti affetti da un gran numero di tumori, soprattutto il tumore

mammario [Lopez et al, 2003] e in bambini, particolarmente quelli con cancro diffuso [Postovsky et al, 2003]. Viceversa livelli ottimali di selenio sono stati dimostrati protettivi nei confronti di neoplasie. La quantità di selenio nell'acqua e nei cibi varia considerabilmente da stato a stato e da regione a regione. E' stato evidenziato come bassi livelli di selenio nell'ambiente [Oldfield, 2002] siano associati ad un aumento del rischio di melanoma [Krone et al, 2005] nel gruppo dei soggetti non-vaccinati (per BCG e polio) ma non nel gruppo di soggetti vaccinati. Questo suggerisce che il fattore di rischio sottostante al melanoma sia esso stesso selenio dipendente, e si può ipotizzare che sia legato al ruolo che il selenio esercita su una proteina selenio- dipendente come la glutatione perossidasi. Nello studio FEBIM, i pazienti dei centri di Berlino e Gottingen vivono in regioni con bassa concentrazione di selenio nel suolo. Le persone sane di Berlino hanno una concentrazione media di selenio di 0.452 µg/g nelle loro unghia del piede che rappresenta la concentrazione di selenio più bassa tra tutte le altre sette nazioni europee studiate ed Israele [Kardinaal et al, 1997]. I risultati di questo studio dimostrano che le vaccinazioni con BCG e Vaccinia impediscono un aumento del rischio di melanoma derivato da un basso apporto di selenio nella dieta.

### **Altre malattie associate all'espressione di HERV-K-mel**

Le infezioni croniche, incluse quelle da retrovirus, possono indurre fenomeni autoimmuni [Sekigawa et al. 2001]. E' facile pensare che molti virus occasionalmente presentino epitopi "self" che potrebbero far breccia sulla tolleranza del sistema immunitario.

I geni retrovirali endogeni codificano per proteine che potrebbero essere riconosciute come "self". Tuttavia anticorpi IgM anti-HERV si evidenziano sia in persone sane [Lawoko et al, 2000], sia malate [Sauter et al, 1996]. Nelle isole pancreatiche di soggetti affetti da diabete giovanile è stata dimostrata la produzione di particelle virali contenenti il genoma di HERV-

K18 [Conrad et al, 1997], anche se altri autori non hanno evidenziato un aumento di HERV-K(IDDM,HML-2) RNA nel plasma tra pazienti affetti dal diabete mellito insulino-dipendente rispetto ai controlli [Badenhoop et al, 1999]. Certe pubblicazioni recenti tuttavia hanno dimostrato un effetto di un super-antigene di tali sequenze [Stauffe et el, 2001].

Inoltre è stata notata l'espressione di HERV-RNA (ERV-9, HERV-K, HERV-L) nei fluidi sinoviali di pazienti affetti da Lupus Erythematosus Sistemico (LES) [Okada et al, 2002].

Recentemente è stato riportato che HERV-E-env è stato rinvenuto nei macrofiagi alveolari ottenuti dal broncolavaggio di 3 casi fibrosi polmonare idiomatica e 3 casi di sarcoidosi [Tamura et al, 1997].

Nei pazienti con sclerosi multipla sono state repertate, alla fine degli anno'80, nel supernatante derivante da cellule leptomeningee e B, delle particelle contenenti transcriptasi inversa [Komurian-Pradel, et al 1999; Perron, et al 1997 ; Christensen et al 1998; Christensen et al 1999].

Un'espressione selettiva di HERV-W-RNA è stata verificata, in coppie di gemelli discordanti per diagnosi di schizofrenia: nei fratelli affetti da schizofrenia ma non nei fratelli sani [Deb-Rinker et al,1999].

### *Scopo dello studio*

E' stato dimostrato che anche il vaccino contro la febbre gialla presenta un' elevata omologia di sequenza con HERV-K-MEL-antigene [Krone et al, 2005]. La vaccinazione contro la febbre gialla è attualmente effettuata da soggetti che si recano in Africa e Sud America. Sono quindi persone potenzialmente ad alto rischio di melanoma perché plausibilmente si espongono maggiormente al sole e appartengono ad uno stato socio-economico elevato, fattore che si è dimostrato essere associato all'aumentato rischio di melanoma [Alston et al, 2007].

Lo scopo del nostro studio è quello di dimostrare se la vaccinazione contro la febbre gialla conferisca una protezione nei confronti dell'incidenza di melanoma. Questa dimostrazione può essere ottenuta solo attraverso uno studio epidemiologico e non attraverso studi sperimentali.



## MATERIALI & METODI

---

### *Fasi preliminari della ricerca*

#### **Approvazione Comitato Etico**

E' stato innanzitutto necessario redigere un protocollo di ricerca. Questo protocollo è stato inviato e visionato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova per l'approvazione dello studio e quindi del trattamento dei dati sensibili, successivamente tale protocollo è stato sottoposto all'attenzione del Garante della Privacy.

#### **Richiesta di collaborazione per la raccolta dati**

Per poter eseguire viaggi all'estero in determinati paesi è richiesta la vaccinazione contro la febbre gialla. In Italia la vaccinazione contro la febbre gialla viene eseguita presso gli Uffici Sanitari autorizzati al rilascio dei certificati validi ad uso internazionale. Nel Veneto gli Uffici Sanitari (U.S.) che possiedono tale autorizzazione (DD.MM. 02.04.2002) sono venti. Il disegno dello studio è stato fatto conoscere ai Direttori degli U.S. autorizzati nel Veneto per il rilascio dei certificati validi per uso internazionale. A tale scopo, il rationale dello studio è stato presentato con una comunicazione orale all'inizio di un convegno, realizzato per i Direttori ed il personale degli U.S., tenutosi a Verona nell'aprile del 2005. Sono stati poi interpellati tramite lettera solo i Direttori di quegli U.S. il cui territorio insiste in U.L.S.S. (Unità Locali Socio-Sanitarie) coperte dal Registro Tumori del Veneto; quindi sono stati esclusi quegli U.S. che servivano un territorio non coperto dal Registro Tumori. Sono stati esclusi inoltre tre U.S.

(Adria, Belluno e Dolo) che hanno ottenuto l'autorizzazione per il rilascio dei certificati validi per uso internazionale dopo il 1999.

Gli Uffici Sanitari che hanno accettato di fornire i dati ed il cui territorio risulta coperto dal registro tumori sono i seguenti: U.S. di Verona, U.S. di Padova, U.S. Marittima ed Aerea di Dolo, U.S. Montebelluna, U.S. Treviso, U.S. Vicenza, U.S. Bassano del Grappa. Hanno invece rifiutato di partecipare allo studio l'U.S. di Venezia e l'Ospedale Negrar.

Ogni U.S. è stato autorizzato alla vaccinazioni in diverse annualità e precisamente: l'U.S. di Verona nel 1983, l'U.S. di Padova nel 1991, l'U.S. Marittimo ed Aereo di Dolo nel 1985, l'U.S. di Montebelluna nel 1999, l'U.S. di Treviso nel 1998, l'U.S. di Vicenza nel 1998, l'U.S. di Bassano del Grappa nel 1999.

Il Registro Tumori del Veneto ha coperto progressivamente parte del territorio della regione iniziando in diverse date per ogni ULSS (vedi tabella 4)

**Tabella 4:** Inizio attività del registro tumori del Veneto per ULSS

COPERTURA RTV														
ULSS	VECCHIA DENOMINAZIONE	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999
1	CADORE				SI									
2	AGORDINA				SI									
3	BELLUNO				SI									
4	FELTRE	SI												
5	BASSANO	SI												
6														
7														
8	VICENZA	SI												
9														
10	TREVISO	SI												
11														
12														
13	CASTELFRANCO MONTEBELLUNA				SI									
14														
15														
16	VENEZIA	SI												
17	MIRANO												SI	SI
18	DOLO	SI												
19														
20														
21	PADOVA									SI	SI	SI	SI	SI
22														
23														
24														
25	VERONA		SI											
26														
27														
28														
29	BADIA POLESINE				SI									
30	ROVIGO				SI									
31	ADRIA												SI	SI
32														
33														
34														
35	ASIAGO	SI												
36	MESTRE	SI												

### Richiesta di collaborazione scientifica

Sono stati interpellati ed è stata ottenuta la collaborazione scientifica di esperti internazionali immunologi e virologi che avevano già studiato il ruolo protettivo di altre vaccinazioni quali la BCG (vaccino con Bacillo Calmette Guerin contro la tubercolosi) e il Vaccinia Virus (virus Vaccinia di origine bovina contro il vaiolo) rispetto al melanoma. Tale collaborazione è stata richiesta al fine di una condivisione degli obiettivi di ricerca e una successiva possibile interpretazione dei risultati dal punto di vista immunologico. I ricercatori che hanno aderito alla richiesta di collaborazione sono stati: Bernard Krone, Department of Virology, University of Goettingen, Germania; John Grange, Centre for Infectious Diseases and International Health, University College, Londra; UK; Ester de

Vries, Department of Public Health, Erasmus Medical Centre, Rotterdam, Olanda; Klaus Koelmel, Department of Dermatology and Venerology, University of Goettingen, Germania

## *Metodi*

E' stato eseguito uno studio coorte retrospettivo ed uno studio caso-controllo entro coorte.

### **Studio coorte retrospettivo:**

#### Acquisizione degli archivi

Sono stati ottenuti e fotocopiati gli archivi contenenti i soggetti che si sono rivolti agli U.S. per ottenere una vaccinazione dall'inizio dell'attività di vaccinazione dell'U.S. sino al 31 dicembre 2001. I dati relativi a tali soggetti (nome, cognome, sesso e data di nascita, data di vaccinazione contro la febbre gialla, data di vaccinazione contro altre vaccinazioni) sono stati imputati in un archivio elettronico inviato al Registro Tumori del Veneto, affinché attraverso un attività di record-linkage identificasse i casi di tumore insorti in questa coorte, ed inoltre assegnasse ad ogni soggetto la ULSS di residenza. L' archivio di tutti i soggetti vaccinati contava inizialmente circa 91.000 soggetti (tabella 5).

**Tabella 5:** soggetti inizialmente registrati suddivisi per ASL

<b>ULSS</b>	<b>Uffici sanitari</b>	<b>N° soggetti</b>
<b>ULSS n° 3</b>	Bassano del Grappa	<b>532</b>
<b>ULSS n° 6</b>	Vicenza	<b>3329</b>
<b>ULSS n° 8</b>	Montebelluna	<b>552</b>
<b>ULSS n° 9</b>	Treviso	<b>1026</b>
<b>ULSS n° 16</b>	Padova	<b>38293</b>
<b>ULSS n° 20</b>	Verona	<b>27240</b>
<b>USMA</b>	Dolo	<b>20803</b>
<b>TOTALE</b>		<b>91775</b>

USMA = Ufficio Sanità Marittima ed Aerea, Dolo

### Criteria di esclusione

I record sono stati successivamente analizzati uno ad uno, eliminando i seguenti soggetti:

- soggetti non linkati dal registro tumori, quindi non residenti nel Veneto,
- soggetti che, al momento della vaccinazione, avevano meno di 18 anni,
- soggetti stranieri,
- soggetti che risiedevano in ULSS non coperte dal Registro Tumori del Veneto,
- soggetti non vaccinati per febbre gialla,
- soggetti che erano stati vaccinati dopo il termine del follow-up del Registro Tumori Veneto nell'ULSS di residenza,
- soggetti con tumori diagnosticati prima dell'inizio del follow-up nella ULSS di residenza (casi riferiti),
- soggetti con tumori diagnosticati prima della data di vaccinazione (non esposti)

E' stato successivamente analizzato l'archivio per identificare quei soggetti che avessero eseguito più volte la vaccinazione contro la febbre gialla.

I soggetti che alla fine sono stati considerati nella coorte di soggetti esposti sono stati 29.083 ( vedi tabella 6).

**Tabella 6:** soggetti considerati nell'analisi suddivisi per ULSS dell'Ufficio Sanitario Autorizzato

<b>ASL</b>	<b>Uffici sanitari</b>	<b>N° soggetti</b>
<b>ULSS n° 3</b>	Bassano del Grappa	<b>388</b>
<b>ULSS n° 6</b>	Vicenza	<b>645</b>
<b>ULSS n° 8</b>	Montebelluna	<b>476</b>
<b>ULSS n° 9</b>	Treviso	<b>728</b>
<b>ULSS n° 16</b>	Padova	<b>5110</b>
<b>ULSS n° 20</b>	Verona	<b>8949</b>
<b>USMA</b>	Dolo	<b>12010</b>
<b>TOTALE</b>		<b>28.306</b>

USMA = Ufficio Sanità Marittima Aerea

### Calcolo delle persone-anni e tassi grezzi

---

Per calcolare la massa di persone anni della coorte di soggetti esposti alla vaccinazione contro la febbre gialla è stata considerata:

- come data di inizio follow-up per un determinato soggetto: la data di vaccinazione se successiva alla data di inizio della copertura del Registro Tumori per la ULSS di residenza del soggetto, altrimenti nel caso in cui la data di vaccinazione fosse precedente a quella di inizio attività del registro tumori, si è considerata quest'ultima come data di inizio follow-up;
- come data di fine follow-up per un determinato soggetto: la data di fine della attività del Registro Tumori per la ULSS di residenza se il soggetto non ha sviluppato alcun tumore; viceversa se il soggetto è incorso in un tumore la data di incidenza è stata considerata come data di fine follow-up.

In questo modo con il software "STATA vers. 10" sono state calcolate le persone anni della coorte.

Sono stati calcolati i tassi grezzi di incidenza di melanoma per sesso, classe di età e periodo di latenza.

### Calcolo del SIR (Standardized Incidence Ratio)

---

Successivamente sono stati calcolati i Rapporti Standardizzati di Incidenza (SIR), utilizzando la massa di persone-anni, calcolata come prima esposto, e i tassi di incidenza della popolazione del Veneto (gruppo di confronto) specifici per sesso, età, e periodo di calendario (per i quinquenni 1987-1991, 1992-1996, 1997-2001), è stato calcolato il numero di casi attesi e quindi il SIR. Gli intervalli di confidenza al 95% dei SIR sono stati calcolati con il metodo esatto. Sono stati inoltre calcolati i SIR di diverse categorie di soggetti esposti, in base al numero di vaccinazioni eseguite contro la febbre

gialla e in base anni di latenza. Riguardo agli anni di latenza è stato calcolato il TSV (time since exposure), ossia il tempo trascorso dalla data di fine follow-up alla data d'inizio esposizione (data della prima vaccinazione). Il TSV è stato suddiviso in tre classi 0 a 4;  $\geq 5$  a 9; e  $\geq 10$  anni.

### Regressione di Poisson

---

Quando la coorte viene divisa in più subcoorti, allora il confronto tra i SIR delle subcoorti non è appropriato perché, se le loro distribuzioni in base al fattore di confondimento sono diverse, i SIR sono stati calcolati usando delle serie diverse di pesi. Un'analisi interna della coorte permette di superare il problema della non comparabilità tra SIR. Quest'analisi è stata condotta usando l'analisi della regressione di Poisson, che si utilizza nello studio di eventi rari come la mortalità o l'incidenza di patologia specifica.

È stato specificato un modello di regressione di Poisson che presentava come variabile dipendente i casi di melanoma e come variabile "rate multiplier" le persone-anni e come covariate la durata della latenza (vedi sopra) e covariate il sesso e variabili tempo-dipendenti come l'età e il periodo di calendario. Si sono utilizzate tali variabili nella regressione al fine di eliminare le distorsioni derivanti dal fatto che la maggiore latenza dal momento della vaccinazione è legata ad età più avanzata del soggetto e quindi ad un maggior rischio di melanoma. Tale distorsione si evidenzia dall'andamento dei tassi di incidenza di melanoma nelle diverse età (tabella 7) e nei diversi anni di calendario (figura 9) nella Regione Veneto. Il periodo di calendario è stato categorizzato in classi di cinque anni (1987-1991, 1992-96, 1997-2001), l'età è stata categorizzata in tre classi (0-29; 30-59; >60).

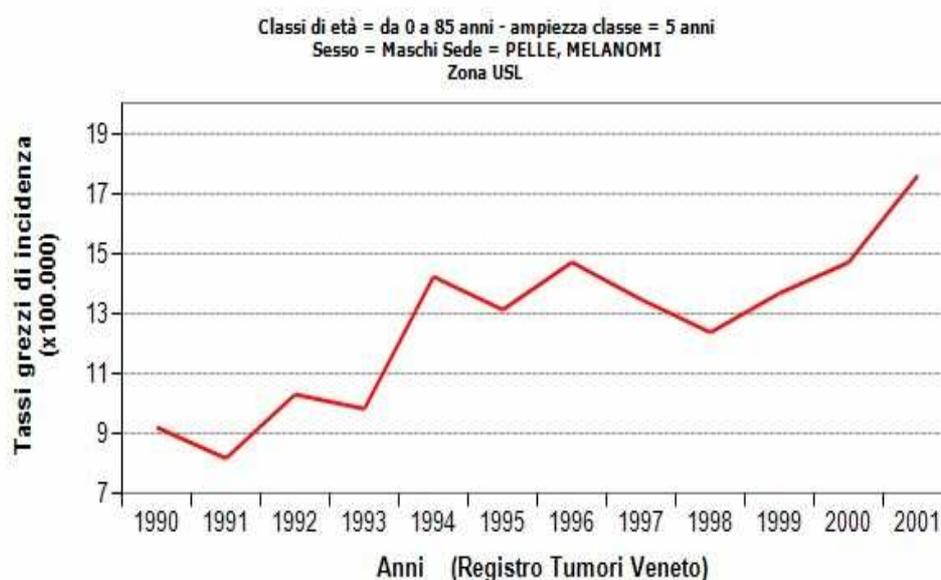
**Tabella 7:** Tassi standardizzati di incidenza di melanoma nelle diverse fasce d'età nell'uomo, periodo 1990-2001 (dati registro Tumori del Veneto)

<b>Classi di età</b>	<b>Tasso standardizzato sulla popolazione europea</b>	<b>Intervallo di confidenza</b>
<b>0-29</b>	<b>1.4</b>	<b>1.1-1.7</b>
<b>30-59</b>	<b>14.2</b>	<b>13.2 -15.3</b>
<b>60-85+</b>	<b>15.5</b>	<b>13.9 - 17.1</b>

Tassi standardizzati di incidenza di melanoma nelle diverse fasce d'età nelle donne, periodo 1990-2001 (dati registro Tumori del Veneto)

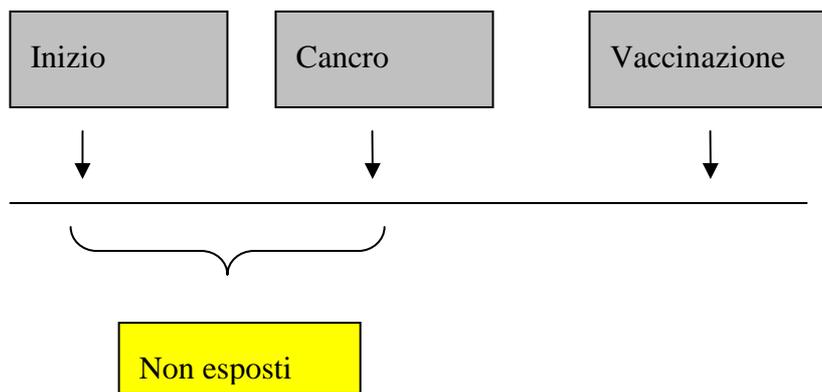
<b>Classi di età</b>	<b>Tasso standardizzato sulla popolazione europea</b>	<b>Intervallo di confidenza</b>
<b>0-29</b>	<b>3.1</b>	<b>2.6 -3.6</b>
<b>30-59</b>	<b>16.6</b>	<b>15.5 17.7</b>
<b>60-85+</b>	<b>21.1</b>	<b>19.5 -22.7</b>

**Figura 9:** Trend temporale dei tassi incidenza di melanoma nel Veneto [dati Registro Tumori Veneto]

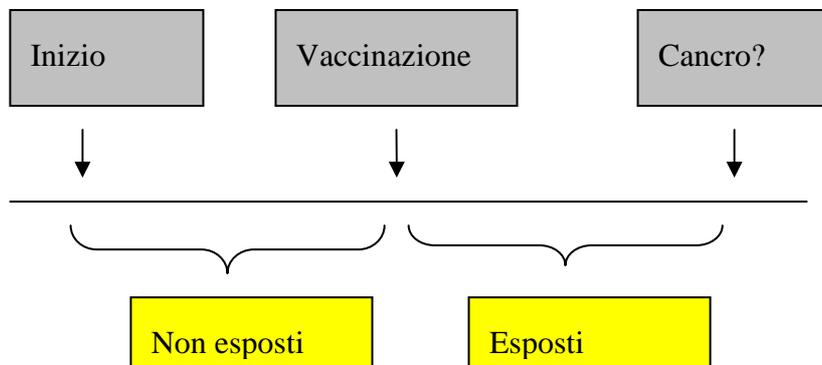


Nelle analisi di regressione, le stime di effetto sono costituite da rapporti tra tassi relativamente ad una categoria di riferimento, che è la classe “0-29” per l’età, la classe “1987-1991” per gli anni di calendario, e i “non esposti” – ossia i soggetti che avevano eseguito la vaccinazione dopo la data di incidenza del tumore (figura 10) – per la latenza. Per calcolare gli anni-persona di questa categoria di soggetti non esposti sono stati sommati anche gli anni persona contati dal momento dell’inizio del follow-up del Registro tumori al momento della vaccinazione di tutti i soggetti vaccinati (figura 11). Le altre categorie di latenza sono state stimate come prima descritto per gli altri modelli di indagine: fino a 4 anni, 5-9,  $\geq 10$ .

**Figura 10:** Soggetti non esposti perché vaccinati dopo il cancro



**Figura 11:** Soggetti non esposti prima di essere vaccinati



### **Studio caso-controllo entro coorte**

Lo studio coorte confronta, attraverso lo standardized incidence ratio, il tasso di incidenza di melanoma nella coorte dei soggetti vaccinati contro la febbre gialla ed il tasso di incidenza di melanoma della coorte della popolazione generale del Veneto coperta dal Registro Tumori. Tuttavia le due popolazioni non sono identiche in tutto tranne che per l'esposizione, come sarebbe la situazione ideale, ma differiscono per altri fattori che possono considerarsi confondenti della relazione tra fattore di esposizione studiato (vaccinazione contro la febbre gialla) e malattia (incidenza di melanoma). Questi fattori confondenti infatti sono associati sia all'outcome che all'esposizione, e sono l'esposizione al sole e lo stato socio economico. La coorte dei soggetti vaccinati, che richiede la vaccinazione per recarsi per turismo o lavoro in paesi soleggiati, presenta un'esposizione al sole probabilmente maggiore e uno stato socio-economico più elevato rispetto alla popolazione generale. Entrambi questi fattori sono stati dimostrati essere fattori associati ad un'aumentata incidenza di melanoma.

Al fine di eliminare l'effetto di questi fattori confondenti è stato eseguito uno studio caso-controllo entro coorte. Questo modello di indagine è stato dimostrato portare a gli stessi risultati di uno studio coorte classico, ma con minor dispendio di risorse.

#### *Selezione dei casi e controlli*

---

Sono stati considerati come "casi" i soggetti entro la coorte segnalati dal Registro Tumori per aver avuto una diagnosi di melanoma ( 37 soggetti).

Secondo lo studio Schiavetti et al. [2002], la proteina HERV-K-MEL non è espressa nei tessuti normali e in alcuni tumori: tumori cerebrali, tumore della cervice uterina, tumore del colon retto, tumore del rene, mesotelioma e

leucemia linfoide. Dato che questi tumori si comportano come i tessuti normali riguardo all'espressione di HERV-K-Mel, i soggetti affetti da tali tumori sono stati considerati i controlli (127 soggetti). I controlli così individuati presentano le caratteristiche che dovrebbero guidare per la selezione dei controlli secondo Rothman KJ e Greenland S. [2006]. Infatti secondo tali epidemiologi la scelta dei controlli dovrebbe essere condotta secondo 4 regole fondamentali:

- i controlli dovrebbero essere selezionati dalla stessa popolazione che da origine ai casi; in questo modo i controlli provengono dalla stessa popolazione individuata come popolazione residente in ULSS coperte dal Registro Tumori.
- I controlli dovrebbero essere selezionati indipendentemente dal loro stato di esposizione; in questo modo i controlli non sono associati all'esposizione "febbre gialla", infatti si ritiene che l'aver fatto la vaccinazione (nei diversi periodi di latenza) non sia associato allo sviluppo di tumori non esprimenti il gene HERV K\_MEL
- Il tempo durante il quale il soggetto ha la probabilità di venire eletto ad essere controllo dovrebbe essere lo stesso tempo nel quale il soggetto ha una probabilità di diventare caso; in questo modo sono stati selezionati i controlli (soggetti che hanno sviluppato tumori non esprimenti il gene HERV-K MEL) evidenziati dal Registro Tumori nello stesso arco temporale (negli stessi anni) in cui sono insorti i casi di melanoma.
- La probabilità di selezione di ogni soggetto tra i controlli dovrebbe essere proporzionale al tempo per cui esso avrebbe contribuito al denominatore del tasso che si sarebbe dovuto calcolare qualora uno studio coorte fosse stato condotto; sono stati selezionati i controlli emersi dagli stessi anni di follow-up di copertura del registro tumori, inoltre ogni soggetto ha contribuito al follow-up per gli anni in cui ha

contribuito a formare il calcolo delle persone anni denominatore del tasso dello studio coorte.

In sintesi si può affermare che selezionando i controlli tra i soggetti affetti dalle neoplasie indicate, evidenziate dal Registro Tumori del Veneto, ha permesso di selezionare i controlli che hanno avuto origine dalla stessa dimensione spazio-temporale che ha originato i casi.

A suffragare questa scelta vi è anche un'affermazione espressa da Wacholder S [1992], che specifica come l'utilizzo di controlli costituiti da soggetti con una malattia (tumore) che si manifesta con le stesse modalità della malattia di interesse (melanoma), potrebbe eliminare una sorgente di "selection bias". Se questa malattia con simili manifestazioni non è associata all'esposizione di interesse questi controlli sono da ritenersi ideali. Inoltre la decisione di scegliere più di un tumore per i controlli è stata motivata dal fatto che un ricercatore può raramente essere sicuro che un'esposizione (anni di latenza dal vaccinazione contro la febbre gialla) non sia associata ad una specifica malattia (altri tipi di tumore, nonostante le evidenze prodotte dallo studio di Schiavetti [2002]). Sarebbe quindi imprudente usare una singola categoria diagnostica. Usando invece una varietà di diagnosi si ha il vantaggio della diluizione dell'effetto di bias che si verifica nell'includere un singola specifica categoria diagnostica eventualmente associata all'esposizione [Rothman KJ & Greenland S. 2006].

#### Definizione dell'esposizione

---

In questo studio caso-controllo entro coorte, tutti i soggetti sono vaccinati e quindi l'esposizione è stata definita con classi di latenza all'esposizione. Per fare questo si è calcolato il TSV (time since exposure), ossia il tempo trascorso dalla data di diagnosi e dalla data di esposizione. Il TSV è stato

suddiviso in quattro classi  $\leq 0$ ;  $>0$  a 5;  $>5$  a 10; e  $>10$  anni. La prima classe ( $\leq 0$ ) comprende i soggetti vaccinati dopo l'insorgenza di tumore, soggetti che erano stati esclusi nello studio coorte, in quanto tali soggetti sono non esposti al momento della data di incidenza del tumore. La classe TSV " $>0$  a 5" è stata considerata come classe "reference" e quindi le è stato assegnato un rischio unitario.

### Analisi statistica

---

L'odds ratio (OR) per melanoma e l'intervallo di confidenza al 95% sono stati stimati attraverso la regressione logistica, utilizzando un'analisi stratificata per centro di vaccinazione. In tale regressione la variabile dipendente era dicotomica (1 per i casi e 0 per i controlli). Le variabili indipendenti considerate sono state: età all'incidenza, età alla vaccinazione, il sesso e la variabile TSV come variabile politomica. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il pacchetto statistico STATA versione 10.



## RISULTATI

---

### *Analisi descrittiva della coorte*

Esclusi 201 soggetti, vaccinati per febbre gialla dopo l'incidenza di tumore e che quindi possono essere considerati non esposti al vaccino, la coorte, di soggetti vaccinati che rispettavano i criteri di inclusione, è formata da 28.306 persone di cui 15.483 maschi (55%) e 12.823 femmine(45%). L'età media dei soggetti al momento di entrata nella coorte è di 37 anni ( $\pm 12.38$  deviazione standard = D.S.), di 36 anni ( $\pm 12.37$  D.S.) per le femmine e 38 anni ( $\pm 12.30$  D.S.) per i maschi. La tabella 8 mostra la distribuzione per ULSS di residenza dei soggetti vaccinati.

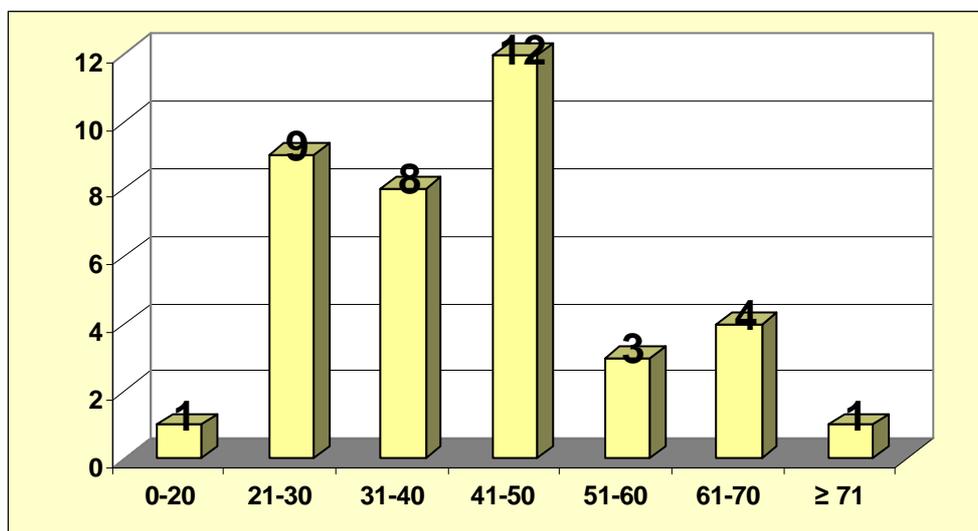
**Tabella 8:** Distribuzione per ULSS di residenza dei soggetti vaccinati

<b>ULSS di residenza (denominazione vecchia)</b>	<b>Conteggio</b>
<b>1</b>	165
<b>2</b>	84
<b>3</b>	521
<b>4</b>	300
<b>5</b>	1578
<b>8</b>	3239
<b>10</b>	2928
<b>13</b>	1889
<b>16</b>	1303
<b>17</b>	825
<b>18</b>	645
<b>21</b>	5288
<b>25</b>	7153
<b>29</b>	147
<b>30</b>	288
<b>31</b>	203
<b>35</b>	125
<b>36</b>	1625
<b>TOTALE</b>	<b>28306</b>

## *Studio Coorte*

I melanomi diagnosticati in questa coorte durante il periodo di follow-up sono stati 37 (21 maschi e 16 femmine). L'età media dei soggetti affetti da tale patologia al momento della diagnosi è di 49 anni per le femmine e 47 anni per i maschi, e l'età al momento della vaccinazione è di 43 e 41 anni rispettivamente. La distribuzione dei casi per fasce d'età è illustrata in tabella 8.

**Tabella 8:** distribuzione dei casi per fasce d'età.



La distribuzione di casi per periodo di latenza d'esposizione, definito come tempo intercorso dalla vaccinazione alla diagnosi, è indicata in tabella 9.

**Tabella 9:** distribuzione dei casi per anni di latenza

ANNI di LATENZA	DISTRIBUZIONE DEI CASI
1-2	2
2-3	1
3-4	8
4-5	5
5-6	1
6-7	5
7-8	3
8-9	4
9-10	2
10-11	0
11-12	1
12-13	2
Totale complessivo	37

La massa persone-anni della coorte dei soggetti vaccinati è di 199.867 py (person year).

Il tasso grezzo d'incidenza di melanoma nella coorte è di 18,5/100.000 (IC95% 13,4- 25,6). Il tasso grezzo d'incidenza di melanoma sesso specifico è di 18,2/100.000 per le donne (IC95% 11,2-29,7) e di 18,7/100.000 per gli uomini (IC95%12,2-28,7). I tassi grezzi specifici per fasce d'età sono presentati in tabella 10. I tassi specifici per periodo di calendario, suddiviso in quinquenni, è di 13,7/100.000 (IC95% 4,4-42,5) nel quinquennio 1987-1991, di 19,9/100.000 (IC95% 11,5-34,2) nel quinquennio 1992-1996 e di 18,6/100.000 (IC95% 12,2-28,6) nel quinquennio 1997-2001. I tassi specifici per anni di latenza suddivisi in quinquenni è di 16,7/100.000 (IC95% 10,7- 27,0) nella classe di latenza 0-4 anni, di 24,3/100.000 (IC95% 14,9-39,6) nella classe di latenza 5-9 anni e di 10,7/100.000 (IC95% 3,5- 33,3) nella classe di latenza  $\geq 10$  anni.

**Tabella 10:** Tassi grezzi specifici per fasce di età

CLASSI di ETA'	TASSI	IC95%
0-29	<b>12,6</b>	4,7-33,5
30-59	<b>17,9</b>	12,2-26,3
>60	<b>30,6</b>	14,6-64,2

Il rapporto standardizzato d'incidenza (SIR) nella coorte dei soggetti vaccinati rispetto alla popolazione generale del Veneto è di 1,2 (IC95% 0,9-1,7). Il SIR nelle femmine è pari a 1,2 (IC95% 0,7-1,9) e nei maschi di 1,3 (IC95% 0,8-2,0). I SIR per classi d'età sono rappresentati in tabella 11. Si osserva che i giovani (classe d'età 0-30 anni) esposti a vaccinazione siano a maggior rischio di melanoma, rispetto alla popolazione generale. Il SIR per periodo di calendario è nel quinquennio 1987-1991 pari a 1,4 (IC95% 0,5-4,4), di 1,4 (IC95% 0,8-2,5) nel quinquennio 1992-1996, di 1,1 (IC95% 0,7-1,7) nel quinquennio 1997-2001. Il SIR specificato per classi di latenza è mostrato in tabella 12.

**Tabella 11:** SIR per classi di età

CLASSI di età	OSSERVATI	ATTESI	SIR	IC95%
0	4	0,9	<b>4.4</b>	1.6-11.6
30	26	22.39	<b>1.2</b>	0.7-1.7
60	7	6.28	<b>1.1</b>	0.5-2.3

**Tabella 12:** SIR per classi di latenza

CLASSI DI LATENZA	OSSERVATI	ATTESI	SIR	IC95%
0-4	18	13,9	<b>1,29</b>	0,82-2,06
5-9	16	10,5	<b>1,52</b>	0,93-2,5
≥10	3	5,32	<b>0,56</b>	0,18-1,75

### Studio coorte con confronti interni

Gli odds ratio ottenuti attraverso la regressione multipla di Poisson sono esposti in tabella 13.

**Tabella 13:** Risultati della regressione multipla di Poisson

<b>CLASSI DI LATENZA (reference classe non esposti)</b>	<b>SIR</b>	<b>IC95%</b>
0-4	<b>0,93</b>	0,45-1,94
5-9	<b>1,07</b>	0,48-2,38
≥10	<b>0,38</b>	0,1-1,45
<b>SESSO (reference maschi)</b>	<b>SIR</b>	<b>IC95%</b>
femmine	<b>1,12</b>	0,65-1,93
<b>CLASSE DI ETA' (reference CLASSE 0-29)</b>	<b>SIR</b>	<b>IC95%</b>
30-60	<b>2,43</b>	1,05-5,64
60-90	<b>3,85</b>	1,32-11,2
<b>ANNO DI CALENDARIO (reference classe 1987-1991)</b>	<b>SIR</b>	<b>IC95%</b>
1992-1996	<b>1,31</b>	0,56-3,03
1997-2001	<b>2,08</b>	0,87-4,96

Dai dati emerge come l'età sia un fattore fortemente associato al rischio di incorrere nella patologia. Si evidenzia inoltre un trend (anche se nessun intervallo di confidenza raggiunge la significatività statistica), nel rischio di melanoma per classe di anno di calendario; infatti il rischio negli anni 1992-1996 è del 30% in più rispetto a quello di ammalare di melanoma negli anni 1987-1991. Negli anni 1997-2001 il rischio di contrarre il melanoma è doppio rispetto agli anni 1987-1991.

I dati emersi mostrano una riduzione non progressiva del rischio di melanoma con un rischio pressoché unitario nella classe 0-5 e nella classe 5-9, rispetto alla classe dei non esposti, mentre nella classe ≥10 appare un

rischio ridotto di più del 60%, al netto dell'aggiustamento per le altre covariate.

### *Studio caso-controllo innestato nello studio coorte*

La distribuzione dei casi e dei controlli per classe di latenza è illustrata in tabella 14.

**Tabella 14:** distribuzione dei casi e dei controlli per classe di latenza

CLASSI DI LATENZA	CASI	CONTROLLI
NON ESPOSTI	<b>18</b>	27
0-4	<b>16</b>	53
5-9	<b>18</b>	55
≥10	<b>3</b>	43

In un'analisi univariata, si evidenzia come l'O.R. di malattia, considerando come categoria "reference" la classe 0-4 anni di latenza, sia doppio per i soggetti non sono stati esposti alla vaccinazione, quasi unitario per coloro che hanno eseguito la vaccinazione da 5-9 anni, e ridotto più dell'80% per coloro che hanno eseguito la vaccinazione da più di 10 anni (vedi tabella 15)

**Tabella 15:** O.R. analisi univariata

CLASSI DI LATENZA	O.R.	CI95%
NON ESPOSTI	<b>1.96</b>	0.88-4.37
0-4	<b>1</b>	
5-9	<b>0.87</b>	0.40-1.85
≥10	<b>0,21</b>	0.06-0,74

I risultati dell'analisi multivariata, aggiuntata per sesso, età all'incidenza ed età alla vaccinazione, sono descritti in tabella 16:

**Tabella 16:** O.R. analisi multivariata

<b>CLASSI DI LATENZA</b>	<b>O.R.</b>	<b>CI95%</b>
NON ESPOSTI	<b>3.58</b>	0.84-15.1
0-4	<b>1</b>	
5-9	<b>0.47</b>	0.15-1.45
$\geq 10$	<b>0,06</b>	0.01-0.54

Si evince chiaramente che la vaccinazione è protettiva nei confronti del melanoma per la classe di latenza  $\geq 10$ , con una riduzione del rischio del 96%.



## DISCUSSIONE

---

La nostra coorte di soggetti vaccinati per la febbre gialla nella Regione Veneto può ritenersi esaustiva e completa. Infatti, tutti i soggetti che vogliono recarsi in paesi che esigono la vaccinazione contro la febbre gialla, devono esibire un certificato di vaccinazione che può essere rilasciato solo dagli Uffici Sanitari Autorizzati. E' poco probabile quindi che i soggetti si rechino dal proprio medico generalista o in altra sede per effettuare la vaccinazione.

Non ci sono studi epidemiologici in letteratura che affrontano lo stesso argomento. Questo è il primo studio che valuta la relazione tra vaccinazione contro la febbre gialla e il rischio di melanoma. Per primi abbiamo evidenziato come la somministrazione del vaccino contro la febbre gialla riduca l'incidenza della malattia dopo dieci anni dalla sua somministrazione.

### *Interpretazione fisiopatologica*

Krone et [2005], nel commentare i risultati emersi dallo studio FEBIM, ha dimostrato che il vaccino contro la BCG e contro il vaiolo conferiscono una protezione contro l'incidenza del melanoma se somministrati precocemente. Come per il BCG e Virus vaccinia, è stata proposta anche per il vaccino contro la febbre gialla un'ipotesi di immunosorveglianza, dovuta a cross-reattività tra antigeni virali presenti nel vaccino e l'antigene "marker di melanoma" l'HERV-K-MEL, una proteina presente nella stragrande maggioranza dei melanomi e dei nevi displastici ma non nei tessuti sani [Schiavetti, et al 2002].

L'antigene HERV-K-MEL è prodotto dal gene-env del retrovirus endogeno umano di tipo K (HERV-K). I primi studi che evidenziavano la presenza di auto-anticorpi specifici per proteine endogene retrovirali sono stati pubblicati venti anni fa [Tóth et al, 1985]. La natura di tale risposta immunitaria risulta difficilmente spiegabile poiché queste proteine sono antigeni self e non dovrebbero scatenare una risposta immune. Comunque il motivo per cui la tolleranza venga meno è oggi del tutto sconosciuto. Dati ormai consistenti hanno documentato un aumento di frequenza del titolo di anticorpi diretto contro le proteine HERV-K in pazienti affetti da tumore testicolare. E' interessante che dopo aver eliminato il tumore, il titolo anticorpale scenda improvvisamente e diventi non rilevabile se testato cinque anni dopo l'asportazione chirurgica. Quindi è stato dimostrato che gli anticorpi anti-HERV-K sono un utile marker per il tumore al testicolo a fini diagnostici e prognostici. Inoltre è stata evidenziata l'espressione di KERV-K nella placenta ed è stata segnalata una prevalenza doppia di anticorpi anti-KERV-K nel siero di donne al termine della gravidanza [Simpson et al. 1996]. In soggetti con tumore alla mammella sono stati riconosciuti antigeni HERV-K [Lower and Kurth, 1996], così come nel tumore del pancreas [Schmitz-Winnenthal et al, 2007]. Inoltre, sono stati trovati linfociti T anti-HERV in due pazienti con il melanoma ma non in individui normali e questo fa pensare che l'antigene HERV-K-MEL sia un epitopo utile come antigene tumore-specifico per creare dei vaccini contro il melanoma e in minor parte, per curare pazienti affetti da altri carcinomi [Schiavetti et al, 2002].

E' stata dimostrata un'omologia di sequenza particolarmente elevata tra l'antigene HERV-K-MEL e una poliproteina indotta dal virus della febbre gialla [Krone, et al 2005].

A sua volta, la proteina HERV-K-MEL, o 'marker of melanoma risk', mostra omologie nella sequenza di aminoacidi con una proteina enzimatica presente

nel nucleo, il fattore Oxygen Responsive Element Binding Protein (OREBP), che regola l'espressione di glutatione perossidasi. Per questa omologia con OREBP, la proteina HERV-K-MEL inibisce l'espressione di glutatione perossidasi. Tale inibizione induce uno stress ossidativo cellulare dovuto ad un eccesso intracellulare di radicali liberi dell'ossigeno, che non vengono adeguatamente metabolizzati dalla glutatione perossidasi. Questo può condurre a mutazioni del DNA che determinano una trasformazione maligna della cellula a distanza di anni o di decenni, e quindi alla formazione del melanoma.

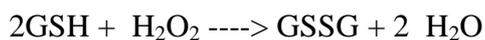
Il glutatione (GSH) infatti è un tripeptide formato da cisteina, glicina e acido glutamico, che è presente ubiquitariamente in tutti i tipi di cellule a concentrazioni millimolari [Giovannini, et al 2006; Meister & Anderson, et al 1983] e, secondo molti autori, è il più potente antiossidante endogeno. Nell'organismo origina dalla scissione del Glutatione Disulfide (GSSG) ad opera dell'enzima Glutatione reduttasi. Questo tripeptide esiste infatti sia in forma ridotta (GSH) che in forma ossidata (GSSG), meglio indicata come glutatione bisolfuro, e prende parte alle reazioni redox grazie all'ossidazione reversibile dei suoi gruppi tiolici attivi [Kalyanaraman et al, 1996]. Il glutatione in forma ridotta, essendo un tripeptide a basso peso molecolare, può essere agevolmente assorbito a livello intestinale. La quota più importante, comunque, è quella della biosintesi endogena a partire dai precursori. Nella cellula, in condizioni redox normali, la maggior parte del GSH è in forma ridotta ed è distribuito nel nucleo, nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri. Oltre che in forma libera, il GSH, mediante un processo chiamato glutationilazione, può anche essere legato covalentemente a proteine, regolandone la funzione o fungendo da coenzima in sistemi enzimatici antiossidanti [Pompella et al, 2003]. Il GSH può quindi agire direttamente da scavenger di radicali liberi e di xenobiotici elettrofili, oppure da substrato per le glutatione perossidasi (GPxs) e

glutathione S-transferasi (GSTs), durante i processi di detossificazione del perossido di idrogeno, di idroperossidi lipidici e di composti elettrofili (vedi figura 11). Quando lo stress ossidativo produce nell'organismo i perossidi si determina la seguente reazione:



Dove: 2GSH rappresentano due molecole di L-glutathione e ROOH il perossido.

Dalla reazione si produce acqua, alcool (ROH) e una molecola di glutathione disolfuro (GSSG). Se il perossido in questione è rappresentato dall'acqua ossigenata, la reazione produrrà:

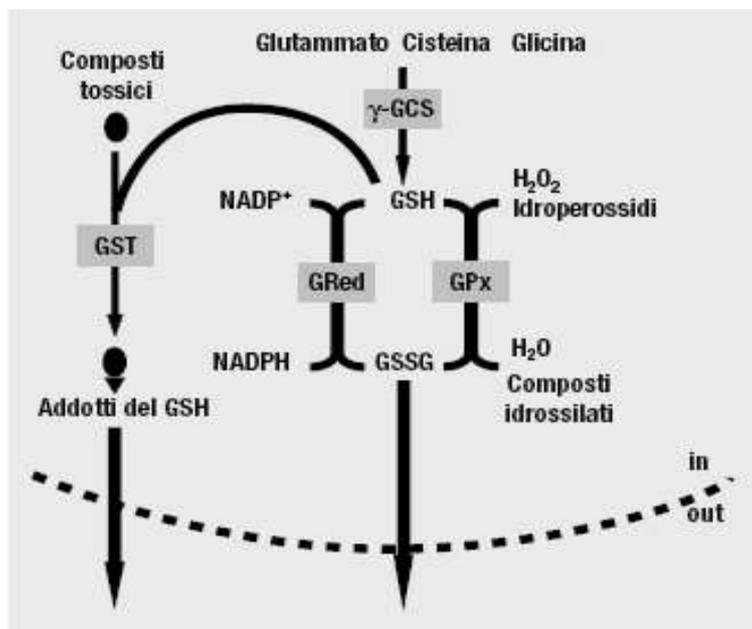


cioè la formazione di due molecole di acqua e una di glutathione disolfuro.

Queste reazioni sono determinate dalle glutathione perossidasi (GPx), che costituiscono una famiglia di enzimi contenenti selenio capaci di ridurre idroperossidi, sia organici che inorganici, nei corrispondenti composti idrossilici, utilizzando il GSH e/o altri equivalenti riducenti. Durante il ciclo catalitico, il selenio viene ossidato dall'idroperossido ad un derivato dell'acido selenico; questo prodotto intermedio è successivamente ridotto dal donatore di elettroni. In presenza di GSH si forma un legame tra il selenio e lo zolfo, che viene poi rotto da una seconda molecola di GSH. Sono note diverse isoforme della GPx, tessuto- o substrato-specifiche [Ursini et al, 1995]. L'attività sia delle GPxs che delle GSTs comporta un abbassamento del livello totale del GSH intracellulare ed un aumento del GSSG. Questo aumento è potenzialmente molto citotossico, in quanto porta alla formazione di ponti disolfuro nelle proteine cellulari. Durante le reazioni mediate dalle GST, inoltre, il GSH si coniuga con varie sostanze elettrofile, e gli addotti così formati vengono secreti attivamente dalla cellula, con ulteriore deplezione di GSH nel caso in cui la concentrazione

della sostanza elettrofila sia maggiore della capacità di risintesi. Il GSH cellulare può essere rigenerato in seguito a riduzione del GSSG formatosi oppure sintetizzato ex novo. La riduzione del GSSG a GSH è catalizzata dalla glutatione reduttasi (GRed), che utilizza come agente riducente il NADPH, prodotto dal ciclo dei pentoso-fosfati, ed è quindi dipendente dalla efficienza di tale via metabolica [Argyrou & Blanchard, 2004].

**Figura 11:** [tratto da Giovannini C, 2006 Annali Istituto di sanità. Glutatione ed enzimi correlati]. Il GSH può eliminare direttamente i radicali liberi o funzionare da substrato per la glutatione perossidasi (GPx) e la glutatione-S-trasferasi durante la detossificazione dei perossidi di idrogeno, idroperossidi organici (lipidici) e composti elettrofili.



Nell'organismo la riconversione della forma ossidata in quella ridotta avviene ininterrottamente. Tale rigenerazione è catalizzata dall'enzima glutatione reduttasi. Vista la grande importanza dello stress ossidativo in

svariate patologie degenerative e tumorali, è facile comprendere che il glutatone ridotto è indispensabile per la rimozione dei radicali liberi dall'organismo.

L'attività del glutatone ridotto si esplica a parecchi livelli, presenta infatti anche azione chelante grazie alla quale vengono bloccati metalli pesanti quali il piombo, cadmio, mercurio, alluminio in modo da renderne più agevole e rapida l'eliminazione. Di fatto esso impedisce che questi metalli si leghino ai gruppi -SH delle proteine tissutali e degli enzimi deteriorandoli. La melanina lega ioni metallici. In presenza di elevati livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gli ioni Fe<sup>2+</sup> catalizzano la reazione di Fenton cosicché vengono formati radicali idrossilici (-OH) all'interno della cellula. Un accumulo di ioni metallici è associato con metallotioni. E' stato dimostrato che elevati livelli di metallotioni sono associati ad una prognosi sfavorevole di melanoma [Weinlich, 2003].

L'inibizione della produzione della glutatone per ossidasi quindi provoca un aumento dello stress ossidativo che ha molteplici effetti negativi sui melanociti determinando:

danno diretto da parte dei radicali liberi al DNA, con effetto mutageno;

inibizione della apoptosi cellulare;

sintesi inadeguata di melanina.

- L'evento che determina l'iniziazione della cellula è una mutazione strutturale del DNA, e richiede anche uno o più cicli di divisione cellulare per "fissare" il danno. L'induzione di una mutazione è solitamente dovuta ad una alterazione chimica o fisica nella struttura del DNA, che esita in una non perfetta replicazione di una particolare regione del genoma. Il danno ossidativo, infatti, rappresenta la principale minaccia per l'integrità del genoma nella maggior parte degli organismi viventi. Le specie con ossigeno reattivo (Reactive Oxygen Species, ROS) sono molecole contenenti uno o

più elettroni spaiati nell'orbitale esterno che possono danneggiare tutte le macromolecole cellulari; agiscono infatti, sui lipidi, sulle proteine e sugli acidi nucleici, in dipendenza della loro localizzazione, natura e concentrazione. A causa di questa estrema reattività sono considerati come fattori importanti in numerosi processi cellulari ed in particolare è stato proposto un loro coinvolgimento nell'infiammazione, apoptosi, senescenza e cancro.

I ROS possono portare alla formazione di basi ossidate, siti apurinici-apirimidinici (AP) e rotture al DNA. Due sono le principali basi premutagene che si formano a causa dello stress ossidativi: la 7-idro-8-ossiguanina (8-oxoG) e la 2-idrossi-adenina (2-OH-A). Le elevate caratteristiche mutagene di queste basi ossidate sono la conseguenza della loro capacità di formare appaiamenti diversi da quelli canonici. L'incorporazione di un gruppo OH nella posizione C-8 della guanosina modifica il campo elettrostatico della molecola e può pertanto modificare i sistemi riparativi del DNA o l'azione della DNA polimerasi durante la replicazione. La formazione di addotti 8-OH-dG si è dimostrata mutagena nel menoma del fago M13mp19 ed in grado di causare sostituzioni guanosina-timina e adenosina-citosina nel DNA M13mp2 dell'E. Coli [Cheng et al, 1991]. In particolare quindi la 8-oxoG può appaiarsi anche con l'adenina, dando luogo a transversioni GC→TA e AT→CG. La 2-OH-A può appaiarsi in maniera promiscua e dare luogo sia a transizioni che a transversioni (AT→CG, AT→GC, AT→TA, GC→TA). La 8-oxoG è una lesione particolarmente frequente e la sua pericolosità per la cellula è resa evidente dalla presenza di differenti sistemi di controllo in grado di rimuovere questa base ossidata. Esiste un sistema di riparazione per escissione delle basi (Base Excision Repair, BER) che agiscono in concerto per minimizzare l'effetto tossico e mutageno della 8-oxoG. La DNA glicosilasi OGG1 del BER è in grado di rimuovere la purina ossidata

quando si trova nell'appaiamento 8-oxoG:C, iniziando l'evento di escissione della 8-oxoG presente sul filamento stampo di DNA. Esistono sistemi di riparazione in grado di rimuovere le basi ossidate dal DNA, tra i quali il sistema di riparazione per escissione di basi (Nucleotide Excision Repair, NER). Il NER è il principale sistema di riparazione coinvolto nella rimozione del danno causato dalla luce ultravioletta. La presenza di ROS all'interno di una cellula può causare non solo ossidazione diretta del DNA, ma anche delle purine e/o pirimidine del pool dei nucleotidi (dNTPs). I dNTPs ossidati possono essere incorporati nel DNA dalle polimerasi replicative durante la fase di sintesi. Per evitare questa fonte di danno, nella cellula si è evoluto un sistema di "pulizia" del pool dei nucleotidi ossidati. In conclusione, la presenza di ROS all'interno della cellula può determinare sia un'ossidazione diretta della doppia elica del DNA che delle modificazioni di tipo ossidativo dei precursori della sintesi del DNA.

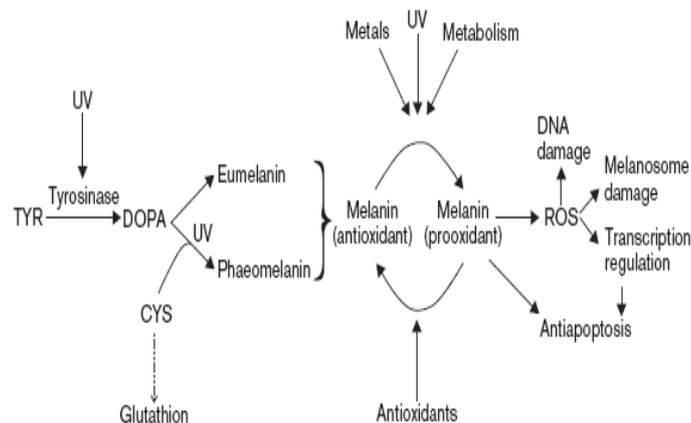
-L'aumentata tensione d'ossigeno induce l'attivazione di fattori nucleari, come il NF- $\kappa$ B e altri fattori, la cui espressione è dipendente dalla tensione d'ossigeno, che hanno un'attività anti-apoptotica portando ad un lento processo potenzialmente tendente ad una trasformazione maligna della cellula [Tokumura, et al 2004; Salvucci et al, 2001; Palozza et al, 2003].

-Inoltre, per una normale biosintesi di melanina, è necessaria una condizione ossido-riduttiva ottimale nella cellula, mentre in presenza di un'alterata regolazione ossido-riduttiva si forma un pigmento anomalo. A sua volta, lo stress ossidativo endogeno ed esogeno, è aumentato dal pigmento anomalo e vengono generate dalle specie maggiormente reattive dell'ossigeno, come  $\cdot$ OH [Meyskens, et al 2001]. Queste causano, come sopra descritto, danni a diverse strutture cellulari, incluso il DNA.

L'inibizione della produzione della glutatione-perossidasi provoca un aumento dei livelli di GSH che determinano una sintesi di melanina inadeguata.

-La tirosinasi detiene un posto centrale nella melanogenesi per la capacità di catalizzare le prime due reazioni costituite dall'idrossilazione della tirosina a dopa e la successiva ossidazione a dopachinone (vedi figura 12). Una volta che il dopachinone è stato generato, il suo destino metabolico in definitiva dipende dal contenuto in sulfidrilici dei melanociti. Pertanto, gli enzimi capaci di influenzare lo stato ossidoriduttivo del glutatione possono indirettamente interessare il grado di melanizzazione. Esistono relazioni reciproche tra pigmentazione della pelle e livello cutaneo di GSH e di GSH riduttasi, presenti in quantità significativamente inferiori nella pelle nera rispetto a quella bianca dei Caucasic. L'ossidazione del 5,6-diidrossindolo a melanina, in presenza di tirosinasi, viene inibita da un eccesso di GSH e si pensa che esista la possibilità che i composti con radicali sulfidrilici possano anch'essi giocare un ruolo nella regolazione a vari livelli nel percorso dell'eumelanina in punti distali rispetto alla formazione del dopachinone. Se manca per inibizione del gene *HERV-K-Mel* la glutatione perossidasi, il suo substrato che è il GSH ridotto, si accumula nella cellula dando quindi origine ad un'alterata formazione di melanina. Le perossidasi in genere, inoltre, potrebbero agire durante un altro passaggio critico della melanogenesi, e precisamente durante la polimerizzazione ossidativa del 5,6-diidrossindolo (DHI) a melanina e l'incorporazione dell'acido 5,6-diidrocarbossilico (DHICA) nel polimero. Le perossidasi potrebbero anche giocare un ruolo critico nella sintesi delle feomelanine, agendo in particolare sulla polimerizzazione ossidativa delle cisdopa. La deplezione della glutatione perossidasi potrebbe portare quindi ad un alterata polimerizzazione della melanina.

**Figura 12:** [tratta da Wittgen & van Kempfen, 2007] Relazione tra biosintesi della melanina e reazioni ossido-riduttive.



Melanin synthesis and generation of ROS. UV-induced phaeomelanin synthesis can deplete the pool of reduced glutathione and negatively affect the antioxidant status of melanoma cells. Furthermore, UV, cellular metals and cell metabolism disturb the balance between the prooxidant and the antioxidant effects of melanin on the generation of ROS. This, in turn, increases DNA and melanosome damage, whereas the transcriptional activation of antiapoptotic programmes maintains melanoma cell viability. CYS, cysteine; DOPA, dopaquinone; TYR, tyrosine.

## *Interpretazione dati epidemiologici*

Innanzitutto, nello studio caso-controllo emerge come l'efficacia del vaccino si evidenzia solo per la classe di esposizione con periodo di latenza >di 10 anni. La spiegazione di questo risultato è di tipo fisio-patologico. Infatti, considerato quanto sopra esposto, è facile intuire che l'azione del vaccino sia di tipo inibente la fase di iniziazione e possa agire nelle prime fasi di promozione del tumore e che quindi il vaccino risulti meno efficace invece nelle fasi tumorali più avanzate. Si presume che i tumori diagnosticati prima dei 10 anni dall'esposizione probabilmente fossero presenti ma silenti al momento della vaccinazione, in considerazione del fatto che, dal momento dell' iniziazione al momento della manifestazione clinica dei tumori, possono passare anche decenni.

E' emerso che soggetti vaccinati nella classe di età 0-29 anni presentano un tasso di incidenza significativamente più elevato rispetto alla popolazione generale, tuttavia la media del tempo di latenza dalla vaccinazione nei soggetti affetti da melanoma appartenenti a tale classe di età, era di 2 anni. Questo eccesso di rischio quindi probabilmente dimostra che, il rischio

basale di questa coorte di soggetti vaccinati contro la febbre gialla è più elevato di quello della popolazione generale, piuttosto che tale eccesso sia determinato dalla vaccinazione stessa. Il tempo d'induzione di una neoplasia infatti richiede molti anni. Questi soggetti quando sono stati vaccinati erano del tutto verosimilmente già affetti da melanoma in fase silente.

L'effetto protettivo contro il melanoma della vaccinazione contro la febbre gialla, dopo 10 anni dalla somministrazione, emerge in modo evidente dallo studio caso-controllo entro coorte. Infatti l'OR di melanoma nel gruppo con periodo di latenza >10 anni è di 0.20 (IC=0.05-0.75) rispetto ai soggetti che hanno ricevuto una vaccinazione da 0-5 anni. La stessa tendenza dell'effetto del vaccino (tuttavia senza significatività statistica), è emersa nello studio longitudinale che confronta la coorte dei soggetti vaccinati con la popolazione generale del Veneto, infatti il SIR (Standardized incidence ratio) dei soggetti vaccinati >10 è uguale a 0.56 (IC95% 0.18-1.75); nella regressione di Poisson l'O.R. risulta ancora più basso, pari a 0.38, ma ugualmente non significativo (IC95%=0.1-1.4). Il motivo di questi risultati apparentemente contraddittori può essere attribuito al fatto nello studio coorte si utilizza come confronto la popolazione generale del Veneto, mentre lo studio caso-controllo permette un confronto entro coorte. La coorte di soggetti vaccinati non si distingue dalla popolazione generale del Veneto solo per l'esposizione (condizione ideale di uno studio coorte), ma anche per altri fattori potenzialmente confondenti della relazione tra esposizione e malattia (vedi metodi). Il SIR, infatti, nella classe di latenza 0-4 anni, tempo entro il quale il vaccino molto probabilmente non dimostra alcuna efficacia, ha un SIR rispetto alla popolazione generale di 1.30. Se al SIR della classe >10 viene sottratto l'eccesso al rischio unitario della prima classe (0.56-0.30), abbiamo un SIR di 0.26, sovrapponibile al risultato dello studio caso controllo. Con la regressione di Poisson che permette un confronto interno, definita la classe di non esposti come categoria reference,

la classe di esposizione con latenza >10 anni presenta un rischio 0.36 ancora una volta dato sovrapponibile a quello ricavato dallo studio caso-controllo ma non significativo a causa di una numerosità campionaria ridotta (vedi paragrafo successivo).

## *Limiti dello studio*

### **Limiti metodologici**

Pur avendo arruolato un elevato numero di soggetti vaccinati, lo studio ha dato origine a pochi casi di melanoma, in quanto la coorte era prevalentemente formata da soggetti giovani caratterizzati da un rischio di melanoma minore rispetto ai soggetti anziani. La bassa numerosità campionaria dei casi ha portato a non ottenere risultati statisticamente significativi nella regressione di Poisson per una bassa potenza statistica dello studio.

### **Applicabilità del vaccino a scopo preventivo**

La risposta umorale e cito-soppressiva indotta dal vaccino possono essere eluse dal melanoma stesso. Il melanoma umano, infatti, può anche attuare una serie di meccanismi immunosoppressivi. Ad esempio cellule neoplastiche possono produrre fattori solubili come TGF- $\beta$ , IL-10 e VEGF [Krüger-Krasagakes et al, 1994, Krasagakis et al, 1998]. I meccanismi immunosoppressivi mediati da questi fattori sono distinti: IL-10 può bloccare il differenziamento di TH1 (linfociti CD4 “helper”, determinanti per lo sviluppo della risposta immune cellulomediata); VEGF può inibire la maturazione di cellule dendritiche (cellule deputate alla presentazione di antigeni e all’attivazione dei linfociti anti-tumore). Inoltre, linfociti T isolati da pazienti sono frequentemente caratterizzati da difetti di attivazione, indotti da cellule neoplastiche, che conducono al blocco della risposta

immunitaria [(Zea et al, 1995]. Infine, il melanoma umano, soprattutto in fase metastatica, esprime e rilascia in forma solubile molecole d'adesione (come TCAM-1) [Natali et al, 1990]. Queste molecole quando sono in forma ancorata alla membrana giocano un ruolo fondamentale nel consentire il legame tra cellule del sistema immunitario e cellule neoplastiche. Tuttavia, in forma solubile, le stesse molecole d'adesione occupano i recettori sui linfociti T e di fatto ne impediscono l'interazione con il tumore. Le prospettive per uno sviluppo clinico dell'immunoterapia del melanoma dipenderanno in modo determinante dalla capacità di comprendere e contrastare i principali meccanismi di elusione e soppressione della risposta immunitaria ad opera delle cellule neoplastiche.

### *Conclusioni*

Lo studio caso-controllo entro coorte ha dimostrato che il rischio di melanoma è consistentemente diminuito nella classe di latenza > 10 anni dalla vaccinazione; lo studio non ha una potenza sufficiente per poter raggiungere la significatività statistica nell'analisi Poisson. La ricerca deve essere ampliata per poter confermare i risultati evidenziati.



## BIBLIOGRAFIA

---

Abel U, Becker N, Angerer R, Frentzel-Beyme R, Kaufmann M, Schlag P, Wysocki S, Wahrendorf J, Schulz G. Common infections in the history of cancer patients and controls. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1991;117(4):339-44.

Adhiyaman V, Oke A, Cefai C, Adhiyaman V, Oke A, Cefai C. Effects of yellow fever vaccination. *Lancet*. 2001;358:1907-8.

AIRT Working Group. Italian cancer figures--report 2006. Incidence, mortality and estimates. *Epidemiol Prev*. 2006 Jan-Feb;30(1 Suppl 2):8-10, 12-28, 30-101

Albonico HU, Braker HU, Husler J. Febrile infectious childhood diseases in the history of cancer patients and matched controls. *Med Hypotheses* 1998, 51, 315–320.

Alston RD, Rowan S, Eden TO, Moran A, Birch JM. Cancer incidence patterns by region and socioeconomic deprivation in teenagers and young adults in England. *Br J Cancer*. 2007 Jun 4;96(11):1760-6.

Anichini A., Fossati G., Parmiani G. Clonal analysis of cytolytic T cell response to human tumors. *Immunol. Today*, 8:385-389, 1987.

Bach J-F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002, 347, 911–920.

Badenhoop K, Donner H, Neumann J, Herwig J, Kurth R, Usadel KH, Tönjes RR. IDDM patients neither show humoral reactivities against endogenous retroviral envelope protein nor do they differ in retroviral mRNA expression from healthy relatives or normal individuals. *Diabetes*. 1999 Jan;48(1):215-8.

Barros ML, Boecken G. Jungle yellow fever in the central Amazon. *Lancet*. 1996;348:969-70.

Barwick R. History of thymoma and yellow fever vaccination. *Lancet*. 2004;364:936.

Bataille V, Bishop JA, Sasieni P, Swerdlow AJ, Pinney E, Griffiths K, Cuzick J. Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. *Br J Cancer*. 1996 Jun;73(12):1605-11.

Bliss JM, Ford D, Swerdlow AJ, Armstrong BK, Cristofolini M, Elwood JM, Green A, Holly EA, Mack T, MacKie RM, et al. Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer*. 1995 Aug 9;62(4):367-76.

Bolot G, David MJ, Taki T, Handa S, Kasama T, Richard M, Pignat JC, Thomas L, Portoukalian J. Analysis of glycosphingolipids of human head and neck carcinomas with comparison to normal tissue. *Biochem Mol Biol Int*. 1998 Sep;46(1):125-35.

Bonnani P. Demographic impact of vaccination: a review. *Vaccine* 1999, 17, 120–125.

Brehm MA, Pinto AK, Daniels KA, Schneck JP, Welsh RM, Selin LK. T cell immunodominance and maintenance of memory regulated by unexpectedly cross-reactive pathogens. *Nature Immunol* 2002, 3, 627–634.

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970; 172:902.

Buja A, Lange JH, Perissinotto E, Rausa G, Grigoletto F, Canova C, Mastrangelo G. Cancer incidence among male military and civil pilots and flight attendants: an analysis on published data. *Toxicol Ind Health*. 2005 Nov;21(10):273-82.

Buja A, Mastrangelo G, Perissinotto E, Grigoletto F, Frigo AC, Rausa G, Marin V, Canova C, Dominici F. Cancer incidence among female flight attendants: a meta-analysis of published data. *J Womens Health (Larchmt)*. 2006 Jan-Feb;15(1):98-105.

CDC. Adverse events associated with 17D-derived yellow fever vaccination—United States, 2001-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002;51:989-93.

CDC. Fatal yellow fever in a traveler returning from Amazonas, Brazil, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002;51:324-5.

CDC. Fatal yellow fever in a traveler returning from Venezuela, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2000;49:303-5.

Cetron MS, Marfin AA, Julian KG, Gubler DJ, Sharp DJ, Barwick RS, Weld LH, Chen R, Clover RD, Deseda-Tous J, Marchessault V, Offit PA, Monath TP. Yellow fever vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2002. *MMWR Recomm Rep*. 2002 Nov 8;51:1-11;

Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative Dna damage causes G\_T and A\_C substitutions. *J Biol Chem*. 1991;267:166-72.

Christensen T, Dissing Sørensen P, Riemann H, Hansen HJ, Møller-Larsen A. Expression of sequence variants of endogenous retrovirus RGH in particle form in multiple sclerosis. *Lancet*. 1998 Sep 26;352(9133):1033.

Christensen T, Tønjes RR, zur Megede J, Boller K, Møller-Larsen A. Reverse transcriptase activity and particle production in B lymphoblastoid cell lines established from lymphocytes of patients with multiple sclerosis. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999 Feb 10;15(3):285-91.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst.* 1989 Dec 20;81(24):1893-904

Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 1996 Apr 1;77(7):1303-10.

Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Metaanalysis of the published literature. *JAMA* 1994; 271:698-702,

Colebunders R, Mariage JL, Coche JC, Pirenne B, Kempinaire S, Hantson P, Van Gompel A, Niedrig M, Van Esbroeck M, Bailey R, Drosten C, Schmitz H. A Belgian traveler who acquired yellow fever in the Gambia. *Clin Infect Dis.* 2002 Nov 15;35(10):e113-6

Coley Nauts H, Fowler GA, Bogatko FH. A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's oxins) on malignant tumors in man. *Acta edica Scand* 1953; 145 (suppl 276):1-102

Coley WB. Treatment of inoperable malignant tumour with the toxins of erysipelas and *Bacillus prodigiosus*. *Trans Am Surg Assoc* 1894, 12, 183-196.

Comstock GW. Leukaemia and BCG, a controlled trial. *Lancet* 1971:1062-3

Conrad B, Weissmahr RN, Böni J, Arcari R, Schüpbach J, Mach B. A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell.* 1997 Jul 25;90(2):303-13.

Crispen R: History of BCG and its substrains. *Prog Clin Biol Res* 310:35-50, 1989

Crocetti E, Carli P, Miccinesi G. Melanoma incidence in central Italy will go on increasing also in the near future: a registrybased, age-period-cohort analysis. *Eur J Cancer Prev* 2007; 16: 50-4.

De Parseval N, Lazar V, Casella JF, Benit L, Heidmann T. Survey of human genes of retroviral origin: Identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins. *J Virol* 2003, 77, 10414–10422.

De Vries E, Bray FI, Coebergh JWW, Parkin DM. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953- 1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer*2003; 107: 119-26.

Deb-Rinker P, Klempan TA, O'Reilly RL, Torrey EF, Singh SM. Molecular characterization of a MSRV-like sequence identified by RDA from monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia. *Genomics*. 1999 Oct 15;61(2):133-44.

Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol* 2002; 146 (Suppl 61): 1-6.

Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer*. 1997 Oct 9;73(2):198-203. Review.

Everall JD, O'Doherty CJ, Wand J, Dowd PM. Treatment of primary melanoma by intralesional vaccinia before excision. *Lancet*: 1975; 583-586,

Ferlay J. F. Bray, P. Pisani and D.M. Parkin. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC CancerBase No. 5. version 2.0, IARC Press, Lyon, 2004

Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 1988;124:869-871,

Florl AR, Lower R, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA. DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 1999, 80, 1312–1321.

Freedman DM, Sigurdson A, Rao RS, Hauptmann M, Alexander B, Mohan A, Morin Doody M, Linet MS. Risk of melanoma among radiologic technologists in the United States. *Int J Cancer*. 2003 Feb 10;103(4):556-62.

Fukuzawa K, Kogure K, Morita M, Hama S, Manabe S, Tokumura A. Enhancement of nitric oxide and superoxide generations by alpha-tocopheryl succinate and its apoptotic and anticancer effects. *Biochemistry (Mosc)* 2004, 69, 50–57.

Gardner MB., CA. Kozak, and SJ. O'Brien. The Lake Casitas wild mouse: evolving genetic resistance to retroviral disease. *Trends Genet* 1991. 7: 22-27.

Giovannini C., Filesi C., D'Archivio M., Scazzocchio B., Santangelo C. e Masella R. Polifenoli e difese antiossidanti endogene: effetti sul glutatione e sugli enzimi ad esso correlati . *Annali Istituto di Sanità* 2006 ;42, 3: 336-347

Grange JM, Doré JF, Coebergh JW. Infection, vaccination and protection against melanoma - a ray of hope for novel preventive and therapeutic strategies? . *Eur J Cancer*. 2005 Jan;41(1):12-4.

Grange JM, Stanford JL. BCG vaccination and cancer. *Tubercle* 1990, 71, 61–64.

Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 1997, 349,,344–349.

Henderson DA, Moss B. Smallpox and vaccinia. In: Plotkin SA, Orenstein WA, eds. *Vaccines*, 3rd edn. Philadelphia: WB Saunders, 1999

Herrmann WP, Tritsch H, Gartmann H. Regression of melanoma metastases after injection of Freund's adjuvant [in German]. *Hautarzt* 1970; 21:181-183,

Holt PG. Potential role of environmental factors in the etiology and pathogenesis of atopy: a working model. *Environ Health Perspect* 1999; 107(suppl 3):485–90

Horsley V, Pavlath GK. NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J Cell Biol* 2002, 156, 771–774.

Hunter-Craig I, Newton KA, Westbury G, Lacey BW. Use of vaccinia virus in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Br Med J* 1970; 2:512-515,

International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1997 Volume 55. Solar and Ultraviolet Radiation.

International Agency for Research on Cancer, (IARC) June 2007, Press release N°178. Remainder on solar UV radiation and artificial UV light.

Istituto Tumori Toscano. Raccomandazioni cliniche per il melanoma cutaneo. Maggio 2007.

Jun JE, Goodnow CC. Scaffolding of antigen receptors for immunogenic versus tolerogenic signalling. *Nature Immunol* 2003, 4, 1057–1064.

Kaempfer R, Gerez L, Farbstein H, Madar L, Hirschman O, Nussinovich R, Shapiro A. Prediction of response to treatment in superficial bladder carcinoma through pattern of interleukin-2 gene expression. *J Clin Oncol*. 1996 Jun;14(6):1778-86.

Kalyanaraman B, Karoui H, Singh RJ, Felix CC. Detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxynitrite-mediated oxidation of thiols- a high resolution ESR spin-trapping study at Q-band. *Anal Biochem* 1996;241:75-81.

Kanda N, Nakai K, Watanabe S. Gangliosides GD1b, GT1b, and GQ1b suppress the growth of human melanoma by inhibiting interleukin-8

production: the inhibition of adenylate cyclase. *J Invest Dermatol* 2001, 117, 284–293.

Kardinaal AF, Kok FJ, Kohlmeier L, Martin-Moreno JM, Ringstad J, Gómez-Aracena J, Mazaev VP, Thamm M, Martin BC, Aro A, Kark JD, Delgado-Rodriguez M, Riemersma RA, van 't Veer P, Huttunen JK. Association between toenail selenium and risk of acute myocardial infarction in European men. The EURAMIC Study. *European Antioxidant Myocardial Infarction and Breast Cancer. Am J Epidemiol.* 1997 Feb 15;145(4):373-9.

Kelso JM, Mootrey GT, Tsai TF. Anaphylaxis from yellow fever vaccine. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:698-701.

Khromava AY, Eidex RB, Weld LH, Kohl KS, Bradshaw RD, Chen RT, Cetron MS; The Yellow Fever Vaccine Safety Working Group. Yellow fever vaccine: an updated assessment of advanced age as a risk factor for serious adverse events. *Vaccine.* 2005 May 9;23(25):3256-63.

Kölmel KF, Gefeller O, Haferkamp B. Febrile infections and malignant melanoma: results of a case-control study. *Melanoma Res* 1992, 2, 207–211.

Kölmel KF, Grange JM, Krone B, Mastrangelo G, Rossi CR, Henz BM, Seebacher C, Botev IN, Niin M, Lambert D, Shafir R, Kokoschka EM, Kleeberg UR, Gefeller O, Pfahlberg A. Prior immunisation of patients with malignant melanoma with vaccinia or BCG is associated with better survival. An European Organization for Research and Treatment of Cancer cohort study on 542 patients. *Eur J Cancer.* 2005 Jan;41(1):118-25.

Kölmel KF, Pfahlberg A, Mastrangelo G, Niin M, Botev IN, Seebacher C, Schneider D, Lambert D, Shafir R, Kokoschka EM, Kleeberg UR, Henz BM, Gefeller O. Infections and melanoma risk: results of a multicentre EORTC case-control study. *European Organization for Research and Treatment of Cancer. Melanoma Res.* 1999 Oct;9(5):511-9. Links

Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Bedin F, Ounanian-Paraz A, Sodoyer M, Ott C, Rajoharison A, Garcia E, Mallet F, Mandrand B, Perron H. T. Molecular cloning and characterization of MSR<sub>V</sub>-related sequences associated with retrovirus-like particles. *Virology*. 1999 Jul 20;260(1):1-9.

Kong Y, Li R, Ladisch S. Natural forms of shed tumor gangliosides. *Biochem Biophys Acta* 1998, 1394, 43–56.

Koonin EV, Makarova KS, Yuri I, et al. In Syvanen M, Cado CI, eds. *Horizontal gene transfer*. 2nd ed. San Diego, USA, Academic Press, 2001. pp. 277–304.

Krasagakis K, Thölke D, Farthmann B, Eberle J, Mansmann U, Orfanos CE. Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br J Cancer*. 1998 May;77(9):1492-4.

Krone B, Kölmel KF, Grange JM, Mastrangelo G, Henz BM, Botev IN, Niin M, Seebacher C, Lambert D, Shafir R, Kokoschka EM, Kleeberg UR, Gefeller O, Pfahlberg A. Impact of vaccinations and infectious diseases on the risk of melanoma--evaluation of an EORTC case-control study. *Eur J Cancer*. 2003 Nov;39(16):2372-8.

Krüger-Krasagakes S, Krasagakis K, Garbe C, Schmitt E, Hüls C, Blankenstein T, Diamantstein T. Expression of interleukin 10 in human melanoma. *Br J Cancer*. 1994 Dec;70(6):1182-5.

Lawoko A, Johansson B, Rabinakaran D, Pipkorn R, Blomberg J. Increased immunoglobulin G, but not M, binding to endogenous retroviral antigens in HIV-1 infected persons. *J Med Virol*. 2000 Dec;62(4):435-44.

Leib-Mosch C, Seifarth W, Schön U. Influence of human endogenous retroviruses on cellular gene expression. In Sverdlow ED, ed. *Retroviruses and primate genome evolution*. Georgetown, TX, Eureka.com, 2004.

Lopez-Saez JB, Senra-Varela A, Pousa-Estevez L. Selenium in breast cancer. *Oncology* 2003, 64, 227–231.

Löwer R, Tönjes RR, Boller K, Denner J, Kaiser B, Phelps RC, Löwer J, Kurth R, Badenhoop K, Donner H, Usadel KH, Miethke T, Lapatschek M, Wagner H. Development of insulin-dependent diabetes mellitus does not depend on specific expression of the human endogenous retrovirus HERV-K. *Cell*. 1998 Oct 2;95(1):11-4;

Lower R., J. Lower, R. Kurth. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 5177–5184.

Ma X, Buffler PA, Selvin S, Matthay KK, Wiencke JK, Wiemels JL, Reynolds P. Daycare attendance and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer*. 2002 May 6;86(9):1419-24.

Maio M., Parmiani G. Melanoma immunotherapy: new dreams or solid hopes? *Immunol. Today*, 17: 405-407, 1996.

Maraveyas A, Baban B, Kennard D, Rook GA, Westby M, Grange JM, Lydyard P, Stanford JL, Jones M, Selby P, Dalglish AG. Possible improved survival of patients with stage IV AJCC melanoma receiving SRL 172 immunotherapy: correlation with induction of increased levels of intracellular interleukin-2 in peripheral blood lymphocytes. *Ann Oncol*. 1999 Jul;10(7):817-24.

Marchant A, Goetghebuer T, Ota MO, Wolfe I, Ceesay SJ, De Groot D, Corrah T, Bennett S, Wheeler J, Huygen K, Aaby P, McAdam KP, Newport MJ. Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin vaccination. *J Immunol*. 1999 Aug 15;163(4):2249-55.

Marfin AA, Barwick Eidex R, Monath TP. Yellow Fever. In: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, eds. *Tropical infectious diseases: principles, pathogens, & practice*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2006. p. 797-812.

Martinez FD, Holt PG. Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma. *Lancet* 1999, 354(Suppl. 2), 12–15.

Mayer J, Meese E, Mueller-Lantzsch N. Chromosomal assignment of human endogenous retrovirus K (HERV-K) env open reading frames. *Cytogen Cell Genet* 1997, 79, 157–161.

McFarland JM, Baddour LM, Nelson JE, Elkins SK, Craven RB, Cropp BC, Chang GJ, Grindstaff AD, Craig AS, Smith RJ Imported yellow fever in a United States citizen. *Clin Infect Dis*. 1997 Nov;25(5):1143-7.

Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983;52:711-60.

Merante F, Altamentova SM, Mickle DA, Weisel RD, Thatcher BJ, Martin BM, Marshall JG, Tumiati LC, Cowan DB, Li RK. The characterization and purification of a human transcription factor modulating the glutathione peroxidase gene in response to oxygen tension. *Mol Cell Biochem*. 2002 Jan;229(1-2):73-83.

Meyskens FL, Farmer P, Fruehauf JP. Redox regulation in human melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* 2001, 14, 148–154

Miettinen OS. The “case-control” study: valid selection of subjects. *J Chronic Dis* 1985; 38: 543-8.

Mihm M.C., Clemente C.G., Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab. Invest.*, 74: 43-47, 1996.

Monath TP, Cetron MS. Prevention of yellow fever in persons traveling to the tropics. *Clin Infect Dis*. 2002;34:1369-78.

Monath TP. Yellow Fever. In: Plotkin S, Orenstein WA, eds. *Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999. p. 815-80.

Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Reintgen DS, Coventry BJ, Glass EC, Wang HJ; MSLT Group. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med*. 2006 Sep 28;355(13):1307-17

Morton DL, Thompson JF, Essner R, Elashoff R, Stern SL, Nieweg OE, Roses DF, Karakousis CP, Mozzillo N, Reintgen D, Wang HJ, Glass EC, Cochran AJ. Validation of the accuracy of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma: a multicenter trial. Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial Group. *Ann Surg*. 1999 Oct;230(4):453-63; discussion 463-5.

Muster T, Waltenberger A, Grassauer A, Hirschl S, Caucig P, Romirer I, Födinger D, Seppel H, Schanab O, Magin-Lachmann C, Löwer R, Jansen B, Pehamberger H, Wolff K. An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res*. 2003 Dec 15;63(24):8735-41.

Nakashima I, Takeda K, Kawamoto Y, Okuno Y, Kato M, Suzuki H. Redox control of catalytic activities of membrane-associated protein tyrosine kinases. *Arch Biochem Biophys* 2005;434:3-10. Argyrou A, Blanchard JS. Flavoprotein disulfide reductases: advances in chemistry and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2004;78:89-142.

Nasidi A, Monath TP, Vandenberg J, Tomori O, Calisher CH, Hurtgen X, Munube GR, Sorungbe AO, Okafor GC, Wali S. Yellow fever vaccination and pregnancy: a four-year prospective study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1993 May-Jun;87(3):337-9.

Natali P, Nicotra MR, Cavaliere R, Bigotti A, Romano G, Temponi M, Ferrone S. Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in

primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res.* 1990 Feb 15;50(4):1271-8.

Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1998 Mar;4(3):328-32.

Nojiri H, Kitagawa S, Nakamura M, Kirito K, Enomoto Y, Saito M. Neolacto-series gangliosides induce granulocytic differentiation of human promyelotic leukemia cell line HL-60. *J Biol Chem* 1988, 263, 7443–7446.

Okada M, Ogasawara H, Kaneko H, Hishikawa T, Sekigawa I, Hashimoto H, Maruyama N, Kaneko Y, Yamamoto N. Role of DNA methylation in transcription of human endogenous retrovirus in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002 Aug;29(8):1678-82.

Oldfield JE. *Selenium World Atlas*, Updated edition. Grimbergen (Belgium), Selenium–Tellurium Development Association, 2002.

Palozza P, Serini S, Torsello A, Di Nicuolo F, Maggiano N, Ranelletti FO, Wolf FI, Calviello G. Mechanism of activation of caspase cascade during beta-carotene-induced apoptosis in human tumor cells. *Nutr Cancer.* 2003;47(1):76-87.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer.* 1999 Mar 15;80(6):827-41.

Pathological Society of London. Discussion on cancer. *Lancet* 1874, 1, 334–336 and 586–594.

Pearl R. Cancer and tuberculosis, *Am J Hygiene* 9 (1929), pp. 97–159.

Perrillat F, Clavel J, Auclerc MF, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, Philippe N, Schaison G, Sommelet D, Vilmer E, Hémon D. Day-care, early common infections and childhood acute leukaemia: a multicentre French case-control study. *Br J Cancer.* 2002 Apr 8;86(7):1064-9.

Perron H, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Mallet F, Tuke PW, Voisset C, Blond JL, Lalande B, Seigneurin JM, Mandrand B. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jul 8;94(14):7583-8.

Pfahlberg A, Kölmel KF, Grange JM, Mastrangelo G, Krone B, Botev IN, Niin M, Seebacher C, Lambert D, Shafir R, Schneider D, Kokoschka EM, Kleeberg UR, Uter W, Gefeller O. Inverse association between melanoma and previous vaccinations against tuberculosis and smallpox: results of the FEBIM study. J Invest Dermatol. 2002 Sep;119(3):570-5.

Pfahlberg A, Kölmel KF, Grange JM, Mastrangelo G, Krone B, Botev IN, Niin M, Seebacher C, Lambert D, Shafir R, Schneider D, Kokoschka EM, Kleeberg UR, Uter W, Gefeller O. Inverse association between melanoma and previous vaccinations against tuberculosis and smallpox: results of the FEBIM study. J Invest Dermatol. 2002 Sep;119(3):570-5.

Pietraforte D. Straface E. 2005 Radicali liberi, stress ossidativo e salute. Istituto superiore di sanità. Rapporti ISTISAN 05/40

Plant KE, SJ. Routledge, and NJ. Proudfoot. Intergenic transcription in the human beta-globin gene cluster. Mol Cell Biol 2001. 21: 6507-6514

Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, de Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. Biochem Pharmacol 2003;66:1499-503.

Postovsky S, Arush MW, Diamond E, Elhasid R, Shoshani G, Shamir R. The prevalence of low selenium levels in newly diagnosed pediatric cancer patients. Pediatr Hematol Oncol 2003, 20, 273–280.

Registro Tumori del Veneto. Incidenza nel RTV (ICD-X).  
[http://www.registrotumoriveneto.it/registro/statistiche/inciden2Standard\\_icd-x.asp](http://www.registrotumoriveneto.it/registro/statistiche/inciden2Standard_icd-x.asp)

Rhodes AR, Weinstock MA, Fitzpatrick TB, Mihm MC Jr, Sober AJ. Risk factors for cutaneous melanoma. A practical method of recognizing predisposed individuals. *JAMA*. 1987 Dec 4;258(21):3146-54. Review.

Ritter K, Hartl R, Bandlow G, Thomssen R. Cytostatic effect of gangliosides present in the membrane of macrophages. *Cell Immunol* 1986, 97, 248–256.

Roenigk HH Jr, Deodhar S, St Jacques R, Burdick K. Immunotherapy of malignant melanoma with vaccinia virus. *Arch Dermatol* 1974; 109:668-673,

Rook GA, Stanford JL. Give us this day our daily germs. *Immunol Today* 1998;19:113–16

Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med*. 1998 Mar;4(3):321-7.

Rosenthal SR. Cancer precursors and their control by BCG. *Develop Biol Stand* 1986;58:401–16

Rothman KJ, Greenland S. *Modern Epidemiology*, 2nd edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA. 1998; pp. 79-91.

Rousseau DL Jr; Ross MI; Johnson MM; Prieto VG; Lee JE; Mansfield PF; Gershenwald JE. Revised American Joint Committee on Cancer staging

criteria accurately predict sentinel lymph node positivity in clinically node-negative melanoma patients. *Ann Surg Oncol* 2003 Jun;10(5):569-74.

Salvucci O, Carsana M, Bersani I, Tragni G, Anichini A. Antiapoptotic role of endogenous nitric oxide in human melanoma cells. *Cancer Res* 2001, 61, 318–326.

Sauter M, Roemer K, Best B, Afting M, Schommer S, Seitz G, Hartmann M, Mueller-Lantzsch N. Specificity of antibodies directed against Env protein of human endogenous retroviruses in patients with germ cell tumors. *Cancer Res.* 1996 Oct 1;56(19):4362-5.

Schaade L, Kleines M, Krone B, Hausding M, Walter R, Ritter K. Enhanced transcription of the S-adenosylhomocysteine hydrolase gene precedes Epstein-Barr virus lytic gene activation in ganglioside stimulated lymphoma cells. *Med Microbiol Immunol* 2000, 189, 13–18.

Schaade L, Kleines M, Walter R, Thomssen R, Ritter K. A membrane-located glycosphingolipid of monocyte/granulocyte lineage cells induces growth arrest and triggers the lytic cycle in Epstein-Barr virus genome positive Burkitt-lymphoma lines. *Med Microbiol Immunol* 1999, 188, 23–29.

Schiavetti F, Thonnard J, Colau D, Boon T, Coulie PG. A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* 2002, 62, 5510–5516.

Schmitz-Winnenthal FH, Galindo-Escobedo LV, Rimoldi D, Geng W, Romero P, Koch M, Weitz J, Krempien R, Niethammer AG, Beckhove P, Buchler MW, Zigraggen K Potential target antigens for immunotherapy in human pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2007 Jul 18;252(2):290-8.

Sekigawa I, Ogasawara H, Kaneko H, Hishikawa T, Hashimoto H. Retroviruses and autoimmunity. *Intern Med.* 2001 Feb;40(2):80-6. Review.

Sensi M, e Parmiani G. Analysis of TCR usage in human tumors: a new tool for assessing tumor-specific immune responses. *Immunol. Today*, 16: 588-595, 1995.

Simpson GR, Patience C, Löwer R, Tönjes RR, Moore HD, Weiss RA, Boyd MT. Endogenous D-type (HERV-K) related sequences are packaged into retroviral particles in the placenta and possess open reading frames for reverse transcriptase. *Virology.* 1996 Aug 15;222(2):451-6

Skegg DCG. BCG vaccination and the incidence of lymphomas and leukaemia. *Int J Cancer* 1975;21:18-21

Stanford JL, Stanford CA, Baban B, Grange JM. Therapeutic vaccination for cancer: the potential value of mycobacterial products. *Int J Pharmaceut Med* 1999;12:191-5

Stanford JL, Stanford CA, Grange JM. Environmental echoes. *Sci Prog* 2001, 84, 105-124.

Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, Ucla C, Sutkowski N, Huber B, Pelet T, Conrad B. Interferon-alpha-induced endogenous superantigen. a model linking environment and autoimmunity *Immunity.* 2001 Oct;15(4):591-601.

Sugimoto J, Matsuura N, Kinjo Y, Tagasu N, Oda T, Jinne Y. Transcriptionally active HERV-K genes: identification, isolation, and chromosomal mapping. *Genomics* 2001, 72, 137-144.

Suzano CE, Amaral E, Sato HK, Papaiordanou PM. The effects of yellow fever immunization (17DD) inadvertently used in early pregnancy during a mass campaign in Brazil. *Vaccine.* 2006;24: 1421-1426.

Takeuchi S. A new look at the history of tumour immunotherapy for its fruitful future through overcoming the widespread cynicism. *Hum Cell* 1996, 9, 1–10

Tamura N, Iwase A, Suzuki K, Maruyama N, Kira S. Alveolar macrophages produce the Env protein of a human endogenous retrovirus, HERV-E 4-1, in a subgroup of interstitial lung diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 Apr;16(4):429-37.

Tan JK, Ho VC: Pooled analysis of the efficacy of bacille Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy in malignant melanoma. *J Dermatol Surg Oncol* 1993; 19:985-990,

Teichmann D, Grobusch MP, Wesselmann H, Temmesfeld-Wollbrück B, Breuer T, Dietel M, Emmerich P, Schmitz H, Suttorp N. A haemorrhagic fever from the Côte d'Ivoire. *Lancet.* 1999 Nov 6;354(9190):1608

Thompson JF, Scolyer RA, Kefferd RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005; 365: 687-701.

Thornes RD. Adjuvant therapy of cancer via the cellular immune mechanism or fibrin by induced fibrinolysis and oral anticoagulants. *Cancer* 1975; 35:91–97.

Tóth FD, Váczi L, Szabó B, Kiss J, Réthy A, Kiss A, Telek B, Kovács I, Kiss C, Rák K. Detection of main core proteins of simian C-type viruses and human retrovirus HTLV and antibodies to them in patients with lymphoid malignancies. *Acta Microbiol Hung.* 1985;32(3):267-73.

Tucker MA, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Elder DE, Sagebiel RW, Guerry D 4th, Clark WH Jr. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA.* 1997 May 14;277(18):1439-44.

Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohé L. The diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995;252 B:38-53.

Vainio J, Cutts F. Yellow fever. World Health Organization Geneva 1998  
<http://www.who.ch/gpv-documents/>

Van Pel A, van der Bruggen P, Coulie PG, Brichard VG, Lethé B, van den Eynde B, Uyttenhove C, Renauld JC, Boon T. Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Immunol Rev.* 1995 Jun;145:229-50. Review..

Wacholder S, Silverman DT, McLaughlin JK, Mandel JS. Selection of controls in case-control studies. II. Types of controls. *Am J Epidemiol* 1992; 135: 1029-41.

Weinlich G, Bitterlich W, Mayr V, Fritsch PO, Zelger B. Metallothionein-overexpression as a prognostic factor for progression and survival in melanoma. A prospective study on 520 patients. *Br J Dermatol* 2003, 149, 535–541

Weiss A, Schlessinger J. Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell* 1998, 94, 277–280.

WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases Yellow fever <http://www.who.int/csr/disease/yellowfev>

Wittgen HG, van Kempen LC. Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. *Melanoma Res.* 2007 Dec;17(6):400-9

Zbar B, Bernstein ID, Bartlett GL, Hanna MG Jr, Rapp HJ. Immunotherapy of cancer: regression of intradermal tumors and prevention of growth of lymph node metastases after intralesional injection of living *Mycobacterium bovis*. *J Natl Cancer Inst* 1972; 49,119-130,

Zea AH, Curti BD, Longo DL, Alvord WG, Strobl SL, Mizoguchi H, Creekmore SP, O'Shea JJ, Powers GC, Urba WJ, et al. Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. Clin Cancer Res. 1995 Nov;1(11):1327-35.