
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

SANTO LANDOLFO, GIORGIO GRIBAUDO, GIORGIO
CAVALLO

**Modulazione della differenziazione funzionale dei
linfociti T da parte degli interferoni**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 82 (1988), n.3, p. 611–618.*
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1988_8_82_3_611_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1988_8_82_3_611_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Patologia. — *Modulazione della differenziazione funzionale dei linfociti T da parte degli interferoni.* Nota di SANTO LANDOLFO, GIORGIO GRIBAUDO e GIORGIO CAVALLO, presentata (*) dal Corrisp. G. CAVALLO.

ABSTRACT. — *Regulation of T cells activities by interferons.* We investigated the effects of IFN- γ or IFN- α on virus yield. 2'-5' Oligoadenylate Synthetase activation and induction of Class I histocompatibility antigens in T lymphocytes. Vesicular stomatitis virus replication was not impaired in T cells by a treatment with IFN- γ , whereas it was completely inhibited by the addition of IFN- α . In contrast a B cell line and fibroblasts were fully protected by all the IFNs. Analysis of the IFN-induced enzyme 2'-5' Oligoadenylate Synthetase, revealed that it was induced in T lymphocytes only by IFN- α but not following an IFN- γ treatment. Moreover, both IFN- α and - γ were able to increase the Class I antigens expression of the T cell lines tested, although the molecular mechanisms leading to this augmentation seem to be different for IFN- γ and IFN- α . The increase of Class I expression by IFN- α is indeed due to a transcriptional activation of the H2 genes, whereas IFN- γ increases H-2 expression of T lymphocytes without stimulation of transcription.

Taken as a whole these results suggest that on T lymphocytes IFN- γ exerts activities different from those activated in other cell types or from those activated in T lymphocytes by IFN- α and - γ .

KEY WORDS: Interferons; T lymphocytes; Histocompatibility antigens.

RIASSUNTO. — In questo studio è stata analizzata la capacità dell'IFN- α e dell'IFN- γ di indurre nei linfociti T, l'attività antivirale, l'attivazione dell'enzima 2'-5' Oligoadenilato Sintetasi e l'espressione degli antigeni di Istocompatibilità di classe I. Il trattamento dei linfociti T con IFN- γ non è in grado di inibire la replicazione del virus della stomatite vescicolare, in condizioni in cui tali cellule sono pienamente protette dall'IFN- α . Linfociti B e fibroblasti sono invece sensibili all'attività antivirale dell'IFN- γ . Inoltre, nei linfociti T l'IFN- α , a differenza dell'IFN- γ , è in grado di stimolare l'induzione dell'enzima 2'-5' Oligoadenilato Sintetasi.

Per quanto riguarda gli antigeni di Istocompatibilità di classe I, entrambe gli IFNs sono in grado nei linfociti T di aumentare l'espressione di tali antigeni, ma con meccanismi molecolari che sembrano essere diversi. Infatti, mentre l'IFN- α aumenta l'espressione degli antigeni di classe I tramite l'attivazione trascrizionale dei geni H2, l'IFN- γ agisce prevalentemente a livello post- trascrizionale.

In conclusione, questi risultati suggeriscono come l'IFN- γ eserciti nei linfociti T attività differenti da quelle attivate in altri tipi cellulari e diverse ancora da quelle indotte negli stessi linfociti T dagli IFN- α e - β .

(*) Nella seduta del 12 marzo 1988.

INTRODUZIONE

Una delle caratteristiche più interessanti del Sistema Interferon è rappresentata dalla capacità di queste molecole di esercitare una attività biologica estremamente pleiomorfica. Infatti, inizialmente caratterizzati per la loro attività antivirale, gli Interferoni (IFNs) si sono dimostrati in grado di regolare l'espressione degli antigeni di istocompatibilità di classe I e II, di regolare la proliferazione e la motilità cellulare e di esercitare una profonda azione di modulazione sulle attività del Sistema Immunitario, quali la produzione anticorporeale, l'attivazione dei macrofagi, la stimolazione della citotossicità delle cellule T e dei linfociti NK (Lengyel, 1982). Sebbene tali proprietà siano condivise da tutti i gruppi di questa famiglia di proteine regolatrici (IFN- α , IFN- β , IFN- γ) vi sono svariate evidenze sperimentali che depongono a favore di profonde differenze nel meccanismo molecolare d'azione degli IFN- α e - β (IFNs virali o di tipo I) rispetto all'IFN- γ (IFN immune o di tipo II). I due gruppi di molecole, IFNs- α - β e IFN- γ , interagiscono infatti con le cellule bersaglio mediante

Tabella 1. *Replicazione del VSV in cellule di differente origine istologica trattate con IFN- γ o IFN- α .*

Cellule	Origine	Trattamento		
		-	γ	α
NIH-3T3	Fibroblasti	5.4*	2.4	2.1
L1210	Linfociti B	4.7	2	1.7
EL-4	Linfociti T	5.4	5.4	2
L12R4	Linfociti T	4.7	4.7	1

* Log_{10} P.F.U./ml

recettori di membrana, che sono comuni per gli IFN- α e - β distinti per l'IFN- γ (Pestka e coll., 1987). È stato inoltre dimostrato, come l'interazione dell'IFN- γ con la cellula bersaglio determini l'induzione della sintesi di polipeptidi che solo in parte sono aumentati in cellule trattate con IFN- α e - β (Gustafsson e coll., 1986).

Nel presente studio si è voluto analizzare se a livello delle cellule produttrici di IFN- γ , cioè i linfociti T, questa molecola in confronto agli IFNs- α e - β , sia in grado di regolare con gli stessi meccanismi molecolari indotti in cellule di altra origine istologica alcune funzioni cellulari quali l'attività antivirale, l'attivazione di alcuni enzimi cellulari tra cui l'Oligoadenilato Sintetasi e l'espressione degli antigeni di istocompatibilità di Classe I.

MATERIALI E METODI

Cellule: Le linee cellulari usate sono elencate nella tabella I. Le cellule L1210, L12R4, EL4 sono state mantenute in terreno RPMI 1640 contenente il 10% di siero

fetale bovino. Le cellule NIH 3T3 e WISH sono state coltivate in DMEM contenente il 10% di siero di vitello.

Interferoni: stato impiegato dell'interferone gamma murino ricombinante (MuIFN-gamma) (attività specifica: 2×10^7 U/mg), gentilmente fornito dal Dr. E. Adolf Boehringer Ing. (Vienna, Austria). Come fonte di IFNs- α e - β è stato utilizzato dell'interferone alfa umano ricombinante A/D attivo anche sulle cellule murine e con attività specifica di 1×10^8 U/mg, gentilmente fornito dal Dr. G. Garotta, Basilea, Svizzera.

Induzione dello stato antivirale: Le linee cellulari impiegate in questo studio furono incubate con 500 U/ml dei vari IFNs in terreno RPMI 1640 o DMEM contenente 2% di siero per 18 ore. Successivamente, le cellule furono lavate 3 volte in terreno senza siero ed infettate con il virus della Stomatite Vescicolare (2×10^8 P.F.U./ml) ad una molteplicità di infezione (MOI) di 0.1 P.F.U./cellula. Le cellule infettate furono quindi lavate 3 volte in terreno ed incubate a 37°C in terreno addizionato con il 2% di siero. Dopo 24 ore, il sovrastante delle colture fu congelato a -80°C fino al momento della titolazione della resa virale che fu valutata come attività

Tabella 2. *Induzione dell'enzima 2'-5' Oligoadenilatosintetasi in cellule T o in cellule di differente origine istologica.*

Cellule	Trattamento		
	—	γ	α
NIH-3T3	2450*	8900	5500
L1210	1200	7800	6900
EL-4	890	1050	6200
L12R4	1300	1500	7100

* Conte per minuto.

citopatica del virus su cellule umane WISH. Differenze di due Log₁₀ sono state considerate significative con un P 0.001.

Analisi dell'attività 2'-5' Oligoadenilato Sintetasi: 10 μ g di proteine ottenute dagli estratti solubili di cellule trattate o meno con IFNs furono incubati per 90 minuti con una sospensione di poly rI-rC (20 μ g/ml) (P-L Biochemicals, USA) ed equilibrati in 20 μ l del tampone di reazione (20 mM Hepes-KOH pH 7.4 15 mM KCl, 25 mM Mg(oAC), 1 mM DTT, 5 mM ATP, 4 mM fruttosio 1.6-difosfato) contenenti 0.8 μ Ci di (2,8³)ATP (Amersham, U.K.), secondo quanto descritto da Minks e coll., 1979. Il sovrinatante di tale reazione enzimatica fu sottoposto a digestione con 20 U/ml di fosfatasi alcalina batterica (BAP), (Sigma, Tipo IIIIR) per 90 minuti a 37°. Gli oligomeri radioattivi 2-5A sintetizzati nel corso della reazione dal ³H ATP furono purificati mediante cromatografia su DEAE-cellulosa e poi misurati in un contatore per scintillazione liquida.

Induzione degli antigeni di Istocompatibilità di classe I: Tutte le linee cellulari impiegate furono coltivate per 48 ore in presenza o meno di 500 U/ml dei vari inter-

feroni. Successivamente furono lavate in terreno senza siero ed incubate (3×10^5 cellule/campione) con anticorpi anti H2 variamente diluiti, per 4 ore a 4° C. Gli anticorpi usati (gentilmente forniti dal Dr. D.H. Sachs, NCI, Bethesda, USA) erano i seguenti: 28.8.6S anti H2-K^b, 34.5.8 anti H2-D^d, e l'antisiero policlonale monospecifico A.A.L. anti H2-D^{s3}. Dopo tale periodo di incubazione le cellule furono lavate ed ogni campione fu incubato per 18 ore a 4° C con 2×10^5 c.p.m. di 125 I-Proteina A. Dopo 2 lavaggi in terreno addizionato di 0.2% di BSA, la radioattività residua legata alle cellule fu misurata in un contatore gamma.

Trasferimento di DNA ed induzione dell'espressione genica: I plasmidi utilizzati nel presente studio erano i seguenti, pSV2CAT (in cui il gene batterico indicatore CAT, cloramfenicolo acetiltransferasi, è posto sotto il controllo della regione enhancer-promoter dei geni precoci del virus SV40, Gorman e coll., 1982) ed il pL^dCAT (in cui il gene CAT è controllato da un elemento genomico murino di 237 paia di basi contenente la regione enhancer-promoter del gene H2-L^d, Sugita e coll., 1987).

Tali plasmidi furono amplificati in *E. coli* HB101, estratti e purificati con il metodo della lisi alcalina e successivamente sottoposti ad ultracentrifugazione in gradiente di CsCl (Maniatis e coll., 1982).

Le cellule L1210, EL4, e L12R4 sono state transfettate secondo quanto descritto da Fujita e coll., 1986. Brevemente 3×10^7 cellule furono incubate in 1.5 ml di RPMI 1640 contenente 500 ug/ml di DEAE-destrano (Sigma, USA) e 20 ug di DNA plasmidico in forma I, per 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente il DNA non assorbito venne allontanato con lavaggi in RPMI 1640 e le cellule furono poi coltivate in RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino. Le cellule NIH 3T3 furono transfettate con il metodo del fosfato di calcio secondo quanto precedentemente descritto (Wigler e coll., 1977). Per l'induzione con IFNs, dopo 18 ore dalla transfezione le cellule furono incubate per 48 ore con 500 U/ml dei vari IFNs.

Analisi dell'attività CAT: Al termine del periodo di induzione con IFNs le cellule transfettate furono raccolte e lavate 3 volte in PBS, e successivamente distrutte mediante ripetuti congelamenti e scongelamenti in 100 ul di 250 mM Tris-HCl pH 7.8. La reazione enzimatica CAT fu eseguita in un volume di 170 ul, contenenti 200 ug di proteine di estratto cellulare, 0.5 uCi di 14 C-Cloramfenicolo (Amersham, U. K.), 470 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.53 mM di Acetil Coenzima A (Sigma, USA), a 37° C per 5 ore. Dopo la reazione, i prodotti furono separati dal cloramfenicolo non modificato mediante cromatografia ascendente su lastre di Silica gel in cloroformio: metanolo (95:5). Dopo autoradiografia con X-ray films (Amersham, U. K.) venne determinata la percentuale di cloramfenicolo convertito nella forma 3-monoacetilato come misura dell'attivazione trascrizionale dei plasmidi contenenti il gene CAT (Gorman e coll., 1982).

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'interferone gamma è una molecola prodotta e secreta dai linfociti T quando questi sono attivati da mitogeni, da antigeni o da alloantigeni. È stato dimostrato da tempo che tale molecola analogamente agli IFN- α e - β è in grado di indurre uno stato di resistenza antivirale nelle cellule bersaglio.

Allo scopo di valutare se l'IFN- γ e gli IFN- α e - β fossero in grado di inibire la replicazione virale in cellule di origine T, le linee cellulari T e le cellule di altra origine istologica furono trattate in vitro per 18 ore con 500 u/ml dei vari UFNs e poi infettate con VSV. Dopo 24 ore dall'infezione è stata valutata la produzione di virus nel sovrantante delle colture infettate. Come si può osservare nella tabella I, sia l'IFN- γ che gli IFN- α e - β hanno conferito uno stato di resistenza antivirale in cellule NIH 3T3 (fibroblasti) e L1210 (linfoma B), in contrasto le linee T utilizzate (EL4 e L12R4) erano protette contro il VSV solo quando pretrattate con IFN- α e - β . Questo comportamento non era confinato solo al sistema del virus VSV, in quanto analoghi risultati sono stati ottenuti utilizzando il virus SFV (dati non riportati).

Per verificare se l'incapacità dell'IFN- γ nel conferire la protezione antivirale fosse dovuta alla mancanza di un recettore di membrana funzionale sulle cellule T esaminate, le linee cellulari impiegate in questo studio furono analizzate per la loro capacità di legare l'IFN- γ radiomarcato. Sebbene con una variabilità nel numero dei recettori di membrana, tutte le linee hanno dimostrato di possedere dei recettori di membrana in grado di legare specificatamente e con elevata affinità l'IFN- γ murino (dati non presentati).

Sulla base della mancanza di uno stato di protezione antivirale indotto dall'IFN- γ nei linfociti T, si è successivamente cercato di valutare se nelle stesse cellule venisse indotta l'attività enzimatica 2'-5' Oligoadenilato Sintetasi, la cui attivazione da parte degli IFNs è stata associata alla loro attività antivirale. A tal fine è stata misurata l'attività enzimatica 2'-5' Oligoadenilato Sintetasi presente negli estratti citoplasmatici totali di cellule trattate o meno per 18 ore con 500 U/ml dei vari IFNs. Come rappresentato nella tabella II, gli IFN- α e IFN- β aumentano significativamente l'attività enzimatica, in tutte le cellule esaminate, comprese quelle di origine T. Mentre l'IFN- γ induce la sintesi degli oligomeri 2'-5' A solo nelle cellule NIH 3T3 e nelle L1210. Questa osservazione non è confinata solo al sistema murino in quanto analoghi risultati sono stati ottenuti anche con le cellule umane di origine T, MOLT4 (Zucca e coll., 1988).

Si è così dimostrato come l'incapacità dell'interferone gamma di indurre uno stato di resistenza nei linfociti T sia associata all'assenza dell'attività 2'-5' Oligoadenilato Sintetasi IFN-indotta. Sulla base dei risultati precedenti si è ritenuto importante verificare se la peculiarità dell'azione dell'IFN- γ sui linfociti T fosse legata esclusivamente all'attività antivirale o se, più in generale, riguardasse anche altre attività biologiche degli IFNs. A tale scopo è stata valutata, come ulteriore aspetto dell'azione degli IFNs, la capacità di indurre un aumento degli antigeni di istocompatibilità di

Tabella 3. *Espressione di antigeni H-2 in cellule T o di differente origine istologica dopo trattamento con IFN.*

Cellule	Trattamento		
	—	γ	α
NIH-3T3	1168*	3245(2.7)**	4474(3.8)
L1210	57598	74353(1.2)	84446(1.5)
EL-4	28261	62295(2.2)	69295(2.5)
L12R4	49902	64276(1.3)	75782(1.5)

* Cpm di ^{125}I -Proteina A legata alle cellule.

** Indice di stimolazione.

classe I. Le cellule esaminate sono state trattate o meno per 48 ore con 500 U/ml dei vari IFNs, e successivamente, mediante un'analisi radioimmunometrica è stata misurata l'espressione degli antigeni murini H2. Come dimostra la tabella III, sia l'IFN- γ che l'IFN- α aumentano l'espressione di tali antigeni in tutte le cellule esaminate. Tale aumento è variabile da linea cellulare a linea cellulare: l'IFN- α induce un aumento di 2.7 volte nei fibroblasti NIH 3T3, di 1.2 volte nel linfoma L1210, di 2.2 nel timoma EL4 e di 1.3 volte nelle cellule L12R4; l'IFN- γ incrementa il livello di questi antigeni di 3.8 volte nelle NIH 3T3, di 1.5 nella linea L1210, di 2.5 e di 1.5 volte rispettivamente nelle cellule EL4 e L12R4.

Si ritiene in generale che l'aumento dell'espressione degli antigeni di superficie della classe I, sia almeno in parte, conseguenza di un aumento della sintesi degli mRNA specifici, ovvero di una attivazione trascrizionale dei geni stessi da parte degli IFNs (Israel e coll., 1986). In base a tali considerazioni si è cercato di valutare se anche l'aumento dell'espressione degli antigeni di classe I, indotto nei linfociti T dall'IFN- γ , fosse dovuto ad una attivazione trascrizionale di questi geni. Tale ipotesi è stata verificata indirettamente valutando la capacità degli IFNs di promuovere la trascrizione di geni chimerici artificialmente introdotti nelle cellule esaminate. Tali plasmidi contengono il gene "reporter" CAT (cloramfenicolo acetil transferasi), un gene batterico normalmente assente nelle cellule eucariote, che codifica per un enzi-

Tabella 4. *Aumento dell'attività CAT indotto dal trattamento con IFN nelle cellule transfettate con il plasmide pL^d CAT.*

Cellule	Trattamento	
	γ	α
NIH-3T3	2.2*	4.3
L11210	2.1	3.8
EL-4	0.9	2.7
L12R4	0.8	3.1

* Indice di stimolazione ottenuto dal rapporto tra l'attività CAT di colture trattate con IFN e l'attività CAT di colture non trattate.

ma la cui attività è facilmente misurabile nelle cellule in cui ne viene permessa l'espressione; la presenza di questa attività nel citoplasma di cellule eucariote transfettate con plasmidi contenenti il gene CAT è quindi una misura dell'attivazione trascrizionale dei plasmidi stessi. Nei plasmidi impiegati in questo studio, l'attività del marcatore CAT è controllata da sequenze eterologhe: nel caso del plasmide pL^dCAT da una sequenza murina di 237 paia di basi corrispondente all'estremità 5' del gene H2-L^d contenente un elemento responsivo agli IFNs, ovvero in gradi di promuovere la trascrizione di qualsiasi gene (in questo caso il gene CAT) posto in posizione 3' alla regione regolatoria stessa qualora le cellule transfettate con questi plasmidi siano trattate con IFNs; nel caso del plasmide pSV2CAT, il gene marcatore è controllato da una sequenza regolatrice del virus SV40. Entrambe questi plasmidi sono stati transfettati nei vari tipi cellulari esaminati che sono poi state trattate con IFNs per 48 ore. Al termine di questo periodo è stata misurata l'attività CAT presente negli estratti cellulari. Come rappresentato nella tabella IV l'IFN- α aumenta l'attività CAT in tutte le cellule transfettate con il plasmide pL^dCAT. Al contrario l'IFN- γ è in grado di attivare la trascrizione di questo plasmide solo nelle cellule NIH 3T3 e L1210, infatti non è stato determinato un significativo aumento dell'attività enzimatica CAT nei linfociti T transfettati con il costrutto pL^dCAT e successivamente trattati per 48 ore con IFN- γ . Come atteso, l'IFN- γ non ha aumentato l'attività CAT nelle cellule transfettate con il plasmide di controllo pSV2CAT sprovvisto di sequenze regolatrici IFN-responsive.

In tale sistema l'IFN- γ non sarebbe quindi in grado di regolare l'espressione degli antigeni di istocompatibilità di Classe I con un meccanismo simile a quella attivato in cellule di altra origine istologica (NIH 3T3, L1210) che richiede una attivazione trascrizionale dei geni della classe I. La regolazione dell'espressione degli antigeni di istocompatibilità di classe I da parte degli IFNs nei linfociti T, si realizzerebbe quindi con dei meccanismi differenti per gli IFN α/β e per l'IFN- γ .

In conclusione questi dati dimostrano come l'IFN- γ pur svolgendo una definita azione biologica nei confronti dei linfociti T per quanto riguarda la regolazione della crescita cellulare nelle fasi del riconoscimento dell'antigene e della conseguente espansione clonale, determini in tali cellule una peculiare azione di regolazione di alcuni geni cellulari che si differenzia profondamente per modalità ed effetti da quelli esercitata nelle stesse cellule dagli IFN- α e - β . Queste evidenze sperimentali costituiscono quindi la base di un modello che può portare alla definizione dei meccanismi molecolari che regolano in modo selettivo l'attività dei geni IFN-inducibili in cellule di differente origine embrionale o di differente tipo funzionale.

BIBLIOGRAFIA

- FUJITA T., SHIBUYA H., OHASHI T., YAMANISHI K., and TANIGUCHI T. (1986) - *Regulation of human Interleukin-2 gene: functional DNA sequences in the 5 flanking region for the gene expression in activated T lymphocytes. Cell*, 46, 401-407.

- GORMAN C.M., MOFFAT L.F., and HOWARD B.H. (1982) - *Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells*. *Mol. Cell. Biol.*, 2, 1044-1051.
- GUSTAFSSON A., SUNDBLÖM S., and LUNDGREN E. (1986) - *The augmentation of human natural killer activity by interferon- γ is not associated with the induction of the interferon- α -inducible proteins*. *J. Immunol.*, 137, 167-171.
- ISRAEL A., KIMUR A., FOURNIER A., FELLOUS M. and KOURILSKY P. (1986) - *Interferon response sequence potentiates activity of an enhancer in the promoter region of a mouse H-2 gene*. *Nature*, 322, 743-746.
- LENGYEL P. (1982) *Biochemistry of interferon and their actions*. *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 251-282.
- MANIATIS T., FRITSCH E.F., and SAMBROOK J. (1982) - *Molecular cloning. A laboratory manual*. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor laboratory).
- MANKS M.A., BENVIN S., MARONEY P.A., and BAGLIONI C. (1979) - *Synthesis of 2'-5'-oligo(A) in extracts of interferon-treated HeLa cells*. *J. Biol. Chem.*, 254, 5058-5064.
- PESTKA S., LANGER J.A., ZOON K.C. and SAMUEL C.E. (1987) - *Interferons and their actions*. *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 727-777.
- SUGITA K., MIYAZAKI J., APPELLA E., and OZATO K. (1987) - *Interferon increase transcription of a major histocompatibility class I gene via a 5' interferon consensus sequence*. *Mol. Cell. Biol.*, 7, 2625-2630.
- WIGLER M., SWEET R., SIM G.K., WOLD B., PELLICER A., LACY E., MANIATIS T., SILVERSTEIN S., and AXEL R. (1979) - *Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eukaryotes*. *Cell.*, 16, 777-785.
- ZUCCA M., GRIBAUDO G., FERRARA B., CAVALLO G., and LANDOLFO S. (1988) - *Interferon gamma does not induce antiviral resistance in T lymphocytes*. *J. Biol. Reg. Homeost. Agents*, in corso di stampa.