



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE
CICLO XXX**

**Studio del chimerismo delle cellule mesenchimali midollari ottenute da pazienti
sottoposti a trapianto di midollo allogenico**

**Bone marrow mesenchymal stem cells chimerism after allogeneic hematopoietic
stem cells transplantation**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Franco Aversa

Tutore:

Chiar.ma Dr.ssa Lucia Prezioso

Dottorando: Giannalisa Todaro

Anni 2014/2017

Riassunto

Le cellule stromali mesenchimali midollari (MSCs) sono cellule primitive e indifferenziate, capaci di autorinnovarsi e di dare origine a differenti linee cellulari. Sono componenti fondamentali del microambiente ematopoietico, composto da una complessa rete di cellule e da una matrice extracellulare che cooperano al fine di regolare il normale processo emopoietico. Le MSCs possono essere isolate dal midollo osseo e producono fattori di crescita e citochine che promuovono l'espansione e la differenziazione delle cellule ematopoietiche. Molti studi hanno messo in evidenza come le MSCs influenzino la reazione al trapianto allogenico e la malattia del trapianto contro l'ospite (GvHD), così come le malattie infiammatorie autoimmuni e altri disordini in cui intervengono i meccanismi di immunomodulazione e di riparazione dei tessuti. Partendo da questa evidenza e dalla possibilità di poter attuare diverse tipologie di trapianto emopoietico nella nostra Unità, abbiamo valutato l'impatto delle MSCs sull'emopoiesi e sull'attecchimento. In questo studio abbiamo analizzato 10 pazienti con neoplasie ematologiche 8 dei quali sottoposti a trapianto aploidentico di cellule staminali da sangue periferico con deplezione TCR $\alpha\beta$ /CD19, uno con deplezione CD3/CD19 e Ciclofosfamide post HSCT e un paziente sottoposto a trapianto di midollo da donatore familiare HLA-compatibile. Tutti i pazienti avevano ricevuto l'inoculo da un donatore di sesso opposto. Le MSCs sono state analizzate da campioni di aspirato midollare a differenti time point dopo il trapianto, mediante FISH, utilizzando la sonda CEP X SO/Y SG, specifica per la regione alfa satellite centromerica del cromosoma X e per la regione del DNA satellite III del cromosoma Y. I nostri risultati mostrano che le MSCs rimangono di origine del ricevente in tutti i pazienti sia nelle prime fasi dopo il trapianto che successivamente. I nostri dati confermano i dati già pubblicati in letteratura che dimostrano come l'attecchimento delle MSCs sia un evento estremamente raro e non esista differenza a seconda del tipo di trapianto o fonte di cellule staminali emopoietiche.

Abstract

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) have been defined as primitive, undifferentiated cells, capable of self-renewal and with the ability to give rise to different cell lineages. They are key components of the hematopoietic microenvironment, that is composed of a complex network of cells and extra cellular matrix cooperating to regulate normal hematopoiesis. MSCs can be isolated from bone marrow and they produce growth factors and cytokines that promote hematopoietic cell expansion and differentiation.

Several studies have shown that MSCs impact on allograft reaction and graft versus host disease (GvHD), as well as on autoimmune inflammatory disease and other disorders in which immunomodulation and tissue repair are required.

Given the different types of hematopoietic transplantation performed in our Bone Marrow Transplant Unit, we evaluated the behavior of MSCs in our setting of transplant, looking at the impact on hematopoiesis and engraftment. In this study we have so far analyzed 10 patients with hematological disease 8 of which received peripheral blood stem cell (PBSC) haploidentical transplantation with T $\alpha\beta$ /CD19 depletion, one with CD3/CD19 depletion and Cyclofosfamide post HSCT and one who received bone marrow transplantation from HLA-matching family donor. All patients received grafts from sex mismatched donors. Isolated MSCs were analyzed from sample of bone marrow aspiration at different time point post HSCT by FISH using the CEP X SO/Y SG probe, specific for the alpha satellite centromeric X chromosome region and for the satellite DNA III Y chromosome region.

Our results show that MSCs remain of recipient origin in all patients in the early and later stages post transplant confirming that the engraftment of donor MSCs is an extremely rare event, and there is no difference depending on type of transplant or source of hematopoietic stem cells.

Indice

1. Trapianto di Midollo osseo.....	6
1.1 Sorgenti di cellule staminali.....	6
1.1.1 Midollo osseo.....	6
1.1.2 Sangue periferico.....	6
1.1.3 Cordone ombelicale.....	7
1.2 Tipologie trapiantologiche.....	7
1.2.2 Trapianto Allogeneico.....	7
1.2.3 Trapianto Aploidentico.....	8
2. Emopoiesi e Microambiente Midollare.....	11
2.1 Organizzazione del microambiente midollare.....	11
2.2 “Nicchia” staminale.....	13
2.3 Emopoiesi.....	14
2.4 Ruolo del microambiente nelle malattie ematologiche.....	14
3. Cellule Stromali Mesenchimali (MSCs).....	17
3.1 Caratteristiche delle MSCs.....	17
3.2 Fonti di MSCs: il Midollo osseo.....	19
3.3 Proprietà immunoregolatrice delle MSCs.....	21
3.4 Limiti dell’applicazione clinica delle MSCs.....	22
4. Scopo del lavoro.....	24
5. Materiali e Metodi.....	25
5.1 Generalità.....	25
5.2 Caratteristiche dei pazienti.....	26
5.3 Coltura e processamento delle HSCs (Citogenetica convenzionale).....	27
5.4 Isolamento da sangue midollare delle MSCs.....	29
5.5 Colture ed espansione delle MSCs.....	31
5.6 Processamentochambre slide.....	32
5.7 Citogenetica Molecolare (FISH).....	33
5.8 Tappe della metodica FISH.....	37

6. Risultati.....	39
6.1 Analisi citogenetica delle HSCs.....	39
6.2 Analisi FISH HSCs e MSCs.....	41
6.3 Analisi Citofluorimetrica.....	45
7. Discussione.....	46
8. Conclusioni.....	53
9. Bibliografia.....	55

1. Trapianto di Midollo Osseo

Il trapianto di midollo osseo (TMO), o più correttamente il trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE), è una terapia largamente impiegata nel trattamento di numerose patologie ematologiche, sia neoplastiche che non.

1.1 Sorgenti di cellule staminali

1.1.1 Midollo osseo

Rappresenta la fonte classica di cellule staminali utilizzabili ai fini trapiantologici. Il tessuto midollare viene generalmente aspirato dalla cresta iliaca posteriore in anestesia locale o generale, e risulta costituito da una commistione di elementi midollari e di sangue periferico. La quantità di cellule staminali necessarie per un ripopolamento midollare adeguato deve essere proporzionale al peso corporeo del ricevente. Una quantità di cellule staminali CD34+ superiore a 2×10^6 /Kg di peso del ricevente si ottiene in genere da un volume di sangue midollare variabile da 700 a 1500 ml.

1.1.2 Sangue periferico

La presenza di cellule staminali in questo distretto è estremamente esigua, pari allo 0,01-0,05 % delle cellule staminali totali. Tuttavia il loro numero può essere aumentato mediante stimolazione con fattori di crescita¹ fino a infondere megadosi di CD34+ (da 5 a oltre 10×10^6 /Kg). L'uso di G-CSF (10 mg/kg/die) seguito da aferesi in 4° o 5° giornata sembra rappresentare il regime di elezione. Le cellule staminali mobilizzate hanno le stesse caratteristiche fenotipiche delle cellule CD34+ presenti nel midollo osseo, per cui la determinazione citofluorimetrica del numero assoluto delle CD34+/kg di peso corporeo del ricevente può essere considerato un mezzo adeguato a valutare la resa ottimale del prodotto a fini trapiantologici. Alcuni problemi particolari connessi con l'uso delle cellule staminali periferiche sono la mancata mobilizzazione, che si riscontra però in meno del 10% dei donatori e la contaminazione con un gran numero di linfociti T, che aumentano il rischio di sviluppare GVHD, principalmente cronica²

1.1.3 Cordone ombelicale

Il cordone ombelicale contiene cellule staminali CD34+ e ckit+ (1% e 5%, 2% e 3,5% del midollo adulto). Questa relativa immaturità delle cellule staminali consente l'impiego di unità cordonali anche non sono del tutto compatibili con un minor rischio di GVHD. Il problema del trapianto cordonale rimane il ritardo nell'attecchimento emopoietico per il ridotto numero di cellule staminali infuse con una singola unità e per tali motivi sono in studio tecniche intese all'aumento delle cellule mediante infusione di doppia unità cordonale o espansione in vitro³.

1.2 Tipologie trapiantologiche

Fondamentalmente possiamo distinguere 2 tipi di trapianto di midollo osseo:

- 1) **AUTOLOGO (auto-HSCT)**: infusione di cellule staminali del paziente stesso
- 2) **ALLOGENICO (o allotrapianto, allo-HSCT)**: trapianto da donatore sano ad un ricevente malato. Questo può essere distinto in trapianto:

- **Singenco**: donatore gemello omozigote
- **Da donatore familiare HLA-identico**: fratello che ha ereditato dai genitori gli stessi cromosomi su cui sono codificati i geni di istocompatibilità.
- **Da donatore non familiare HLA-identico ("Matched Unrelated Donor", MUD)**
- **Familiare non-compatibile (HLA-aploidentico)**: donatore familiare compatibile per solo un aplotipo e differente sull'aplotipo non condiviso.

1.2.2 Trapianto allogenico

Nel trapianto allogenico le cellule staminali sono isolate da un donatore sano consanguineo o non consanguineo (**MUD**), identico totalmente o solo parzialmente per il sistema maggiore di istocompatibilità HLA, e infuse nel ricevente. Prima della infusione, il paziente viene sottoposto a regime di condizionamento al fine di eliminare le cellule patologiche della malattia di base e creare la premesse per la loro sostituzione (attecchimento) da parte delle cellule del donatore compatibile. Inizialmente, sulla base della tipizzazione HLA, si individua un donatore compatibile. Si studiano prima i

consanguinei, i gemelli monocoriali o i fratelli germani, ma circa il 75% dei pazienti candidati al trapianto allogenico non dispone di un familiare identico. In questi casi, si esegue la ricerca di un donatore compatibile non consanguineo (MUD) nell'archivio informatico delle "banche del midollo". Generalmente viene effettuato un primo screening con tipizzazione molecolare a bassa risoluzione (I° livello) e, successivamente si procede, in caso di identità molecolare, ad un'analisi in PCR ad alta risoluzione (II° livello), eventualmente seguita da un potenziamento genomico. La probabilità di identificare un donatore compatibile nel gruppo etnico caucasico è del 50% circa ed è molto inferiore se si considerano gruppi etnici meno numerosi.

1.2.3 Trapianto aploidentico

Per anni, il limite del trapianto allogenico è stata la disponibilità un donatore HLA-identico. A partire dalla metà degli anni 1990, si sono però rese disponibili nuove procedure che hanno portato ad estendere il trapianto a tutti i pazienti utilizzando anche familiari solo parzialmente compatibili, ovvero il trapianto aploidentico. Praticamente tutti i pazienti hanno un membro della famiglia con cui condividono un solo alplotipo. I geni HLA sono codominanti per cui ogni individuo presenta un patrimonio di molecole che derivano metà dalla madre e metà dal padre. Donatori aploidentici si possono reperire anche tra i parenti più lontani consentendo il trapianto alla quasi totalità dei pazienti con indicazione trapiantologica. In sintesi, il TMO aploidentico presenta indubbi vantaggi: immediata disponibilità del donatore; possibilità di scelta del miglior donatore tra tutti i familiari disponibili in funzione dell'età, della sierologia virale e del fenomeno della NK alloreattività; possibilità di infondere linfociti del donatore (DLI); maggiore effetto GvL^{4,5}.

Tuttavia il trapianto aploidentico è stato associato ad un rischio significativo di rigetto o di GVHD severa, entrambe manifestazioni di una non controllata allo-reattività tra le cellule T dell'ospite e quelle del donatore.

Nel tentativo di ridurre l'incidenza di GVHD nel setting aploidentico, dovuto all'incompatibilità tra donatore e ricevente, il gruppo di Perugia ha individuato pionieristicamente una tecnica di manipolazione, caratterizzata da una selezione positiva

di CD34, che eliminava dal graft una considerevole quota di linfociti T (deplezione di 4,5-5 log). Per superare, però, il rischio di rigetto dovuto all'eliminazione dal graft dei linfociti T, era inoltre indispensabile utilizzare una megadose di cellule staminali, per sfruttare il cosiddetto effetto veto di una percentuale di queste cellule, dotate di attività immunosoppressiva. In più di 15 anni di follow up, si è dimostrato come il limite di una eccessiva T deplezione (quale la selezione positiva delle CD34, che lasciava nel graft solo le cellule staminali, eliminando tutte le cellule del sistema immunitario), non sia il controllo della malattia, quanto la ricostituzione immunitaria post trapianto, ponendo quindi il paziente a maggiore rischio di sviluppare fenomeni infettivi. Per ovviare a questo limite e ridurre la mortalità trapianto-relata (TRM), diversi gruppi hanno messo a punto tecniche di deplezione volte a migliorare la ricostituzione immunitaria post HSCT. Passando attraverso la deplezione CD3/CD19, gravata comunque ancora da una elevata incidenza di rigetto, come pure di TRM, per la presenza di una quota di linfociti T 10 volte superiore a quella ottenuta con la selezione positiva delle CD34, si è arrivati ad un approccio più innovativo, attuato dal gruppo di Tubingen, caratterizzato da una deplezione linfocitaria selettiva mediata dal riconoscimento del recettore $\alpha\beta$ dei linfociti T da parte di anticorpi specifici. Questa tecnica permette di ottenere una T deplezione di 4.5-5 logaritmi, lasciando però nel graft numerose cellule in grado di esercitare un effetto antitumorale e antinfettivo, quali linfociti T $\gamma\delta$ (non alloreattivi), cellule NK e cellule dendritiche.

E' infine chiaro come una mancata deplezione T linfocitaria in un setting di trapianto incompatibile, come quello aploidentico, porti da un lato ad un ridotto rischio di rigetto, ma dall'altro ad un aumentata incidenza di GVHD. In quest'ottica diventa essenziale utilizzare una terapia immunosoppressiva post trapianto, che riduca l'alloreattività linfocitaria. Negli ultimi anni ha preso sempre più piede l'utilizzo della ciclofosfamide post trapianto, per la sua capacità di inibire i linfociti T alloreattivi, risparmiando quelli quiescenti, e permettendo così una buona ricostituzione immunitaria post trapianto.

Tutte queste tecniche permettono un utilizzo sempre più assiduo del donatore aploidentico, ampliando notevolmente il numero di pazienti potenzialmente sottoponibili a trapianto allogenico di midollo.

2. Emopoiesi e Microambiente Midollare

Il microambiente midollare è una complessa struttura che può essere considerata come una specifica area tissutale dove le cellule staminali emopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSCs) possono proliferare per automantenersi o per generare cellule mature⁶. Esso è costituito da una fitta rete di cellule, sia emopoietiche che non emopoietiche, da matrice extracellulare (ECM, Extracellular Matrix) e da una serie di fattori solubili o legati alle membrane, che cooperano per regolare e garantire il normale processo emopoietico⁷. Già negli anni '60, mediante una serie di esperimenti, si è compreso il ruolo cruciale del microambiente nel processo ematopoietico, dimostrando come alterazioni del microambiente possano significativamente compromettere anche l'emopoiesi⁸.

Diversi studi hanno dimostrato che il numero delle cellule HSCs in esso residenti è regolato da un complesso network di segnali inibenti e inducenti in equilibrio fra loro⁹.

2.1 Organizzazione del microambiente midollare

Il midollo osseo è contenuto nella cavità midollare delle ossa e viene distinto in midollo giallo in cui prevalgono adipociti e midollo rosso dove ha sede il microambiente midollare¹⁰. E' considerato l'unico organo emopoietico permanente nell'uomo¹¹. Infatti nelle prime fasi della vita embrionale le cellule primitive del sangue originano nel sacco vitellino e, successivamente, nel fegato. Dal terzo al settimo mese, la milza è la principale sede di attività emopoietica per poi passare definitivamente a livello della cavità midollare, con attività preponderante in alcuni segmenti scheletrici¹² (Fig. 1).

Il midollo osseo in attività è ricco di cellule staminali in replicazione e di precursori delle cellule ematiche mature; la prevalenza degli eritrociti in via di maturazione ne determina una colorazione rossa scura e da qui il nome di midollo rosso¹².

Dunque il microambiente midollare è costituito da:

- Componente cellulare: cellule delle normali linee emopoietiche in vari stadi di differenziazione, cellule dell'immunità (linfociti B e linfociti T, cellule NK, macrofagi, granulociti neutrofili, basofili e mastociti), cellule stromali midollari,

cellule endoteliali midollari e cellule coinvolte nell'omeostasi ossea come osteoclasti e osteoblasti;

- Componente non cellulare: proteine della matrice extracellulare (Extracellular Matrix, ECM) fibronectina, collagene, laminina, osteopontina, proteoglicani, glicosamminoglicani e da fattori solubili (citochine e fattori di crescita). Le fibre di collagene e le glicoproteine strutturali della ECM hanno funzione non solo adesive ma anche di segnalazione per gli elementi emopoietici, inoltre i proteoglicani presenti nel substrato hanno la funzione non solo di idratare il tessuto ma anche di legare fattori di crescita e altri modulatori dell'emopoiesi.

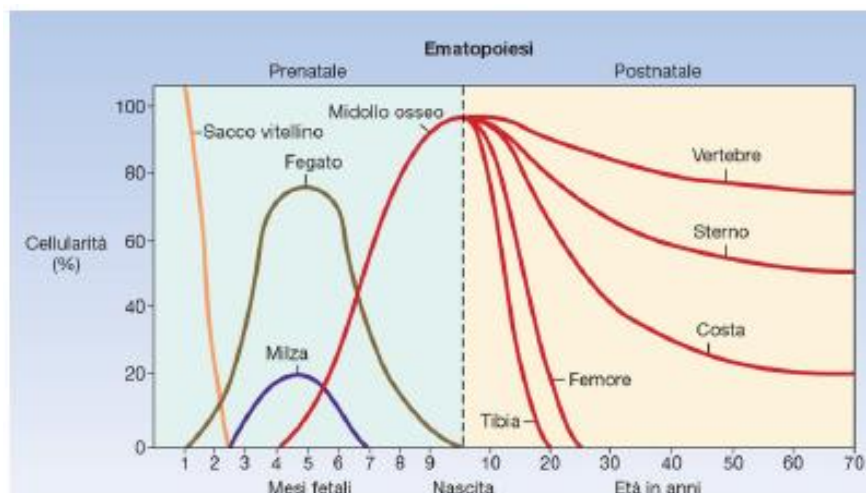


Figura 1 Grafico che mostra come aumenta la cellularità delle HSC nei vari organi emopoietici sia nella vita uterina che extrauterina. Ordinata: Cellularità (%); ascissa: Mesi fetali ed età in anni. (Robbins e Cotran, Le basi patologiche delle malattie: Patologia Generale, 2010)

2.2 “Nicchia” staminale

La nicchia si può definire come una microstruttura spaziale all'interno della quale alloggiano le cellule staminali emopoietiche, le quali, interagendo con stimoli esterni, vanno incontro a cicli di autorinnovamento. La nicchia staminale midollare rappresenterebbe, pertanto, una sorta di “santuario della staminalità”, in grado di mantenere il compartimento staminale in tutte le sue funzioni, proteggendolo al contempo da stimoli differenziativi e guidando essa stessa il destino delle cellule che la popolano.

Comprendere come la nicchia funzioni richiede, in primo luogo, una precisa caratterizzazione istologica del midollo osseo. Quello che fino a non molti anni fa veniva elusivamente indicato come “stroma midollare” di supporto, è in realtà un coacervo istologico di cellule mesenchimali, adipociti, osteoblasti, macrofagi, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce della parete dei sinusoidi, che infiltrano la struttura di osso trabecolare. Tutte queste cellule contribuiscono a generare una struttura architettale di supporto unica nel suo genere, oltre che secernere citochine e chemochine fondamentali per supportare il compartimento emopoietico.

Risultati di ricerche condotte negli ultimi anni hanno mostrato in modo inequivocabile il ruolo chiave svolto dagli osteoblasti nella regolazione del compartimento staminale. La “nicchia osteoblastica”, che si distingue per l’alto contenuto in glicoproteine extracellulari e l’alta densità di sali di calcio, svolge un ruolo primario nel mantenere la quiescenza di cellule staminali emopoietiche. La nicchia osteoblastica è in stretto contatto con la nicchia vascolare, struttura a diretto contatto con la superficie sinusoidale e costituita da cinque strati di cellule aventiziali o reticolari (CAR) che circondano le HSCs¹³. Le cellule endoteliali dei sinusoidi sono dotate di un’elevata attività endocitica e controllano il passaggio della maggior parte delle molecole tra l’interno e l’esterno del compartimento emopoietico.

Alla costruzione delle due nicchie partecipano anche le altre cellule stromali del midollo osseo quindi gli osteoclasti, le cellule endoteliali, le cellule adipocitiche e le cellule dello stroma midollare, che attraverso la produzione di citochine, chemochine, e segnali intracellulari svolgono un ruolo importante per la normale omeostasi midollare¹⁴. Infine all’interno di questa struttura emopoietica sono presenti anche dei macrofagi, coinvolti nei processi di fagocitosi dei detriti cellulari e delle cellule che sono eliminate durante il processo maturativo o per apoptosi¹².

2.3 Emopoiesi

L'emopoiesi è il processo mediante il quale si generano le cellule ematiche mature a partire dai rispettivi precursori. E' stato dimostrato che tutti i tipi cellulari del sangue sono derivati da una singola cellula staminale primitiva definita cellula staminale pluripotente. Questa cellula pluripotente presenta da un lato la capacità di mantenersi in un numero costante, dall'altro quella di fornire elementi cellulari che, attraverso successivi processi di differenziazione e maturazione, daranno origine agli elementi maturativi. Nello specifico, da tale cellula si generano cellule staminali multipotenti che danno origine alla linea linfoide e alla linea mieloide¹² (Fig.2).

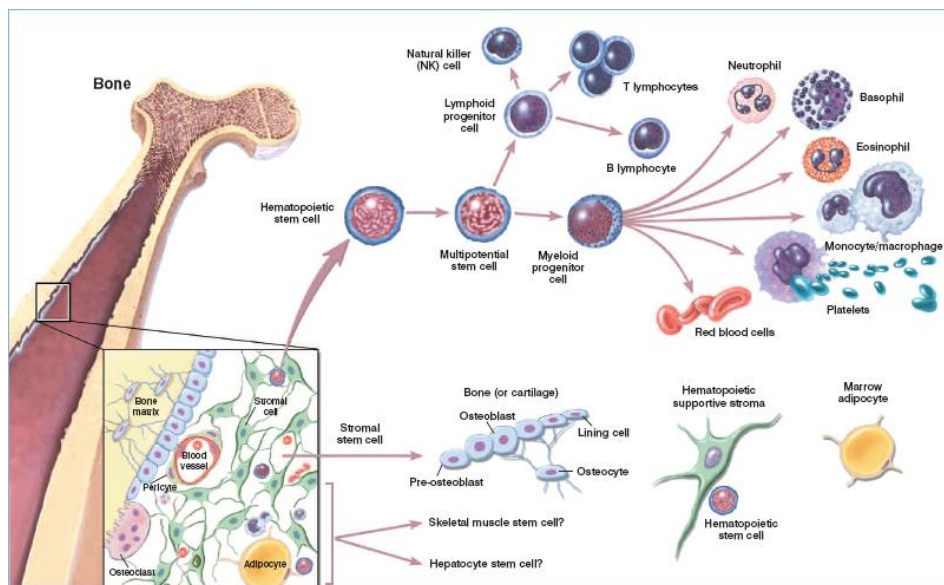


Figura 2 Rappresentazione schematica del processo emopoietico

2.4 Ruolo del microambiente nelle malattie ematologiche

Diversi studi hanno messo in evidenza come il microambiente giochi un ruolo importante nel determinare e sostenere le malattie ematologiche¹⁵. Sono stati proposti due meccanismi che potrebbero spiegare il ruolo che il microambiente alterato svolge in queste patologie⁷:

- Meccanismo 1: il clone maligno emopoietico induce modificazioni funzionali reversibili nel microambiente favorendo, così, la sopravvivenza del clone maligno.

- Meccanismo 2: anomalie primarie delle cellule stromali del microambiente sono direttamente coinvolte nella patogenesi delle neoplasie ematologiche.

La patologia che più di tutte viene presa come modello per descrivere il primo meccanismo, è il Mieloma Multiplo (MM)¹⁶, Infatti tale neoplasia ematologica è determinata non solo da anomalie genetiche della plasmacellula tumorale, ma anche da complesse interazioni bidirezionali tra le plasmacellule stesse e il microambiente, atte ad indurre cambiamenti funzionali che supportino la popolazione neoplastica.

Oltre al MM ci sono studi che dimostrano che questo di tipo di deregolazione funzionale del microambiente è responsabile anche di altre patologie ematologiche quali: disordini mieloproliferativi (MPS) e mielodisplasie (MDS). Nel caso della Leucemia Mieloide Cronica (LMC) le cellule emopoietiche alterate, che normalmente fanno parte del microambiente midollare come i macrofagi, interagiscono con le componenti del microambiente inducendo alterazioni funzionali che favoriscono la sopravvivenza del clone maligno¹⁷.

La conoscenza di questa deregolazione del microambiente è estremamente importante per trovare potenziali target per il trattamento di tale patologia. Inoltre il fatto che il trapianto di HSCs rappresenti una strategia terapeutica per le neoplasie ematologiche suggerisce che, nella maggior parte dei casi, le alterazioni del microambiente che contribuiscono alla patogenesi potrebbero essere difetti funzionali reversibili⁷.

Per quanto riguarda il secondo meccanismo, solo negli ultimi anni studi basati su modelli murini hanno fornito evidenze definitive circa il coinvolgimento diretto dello stroma nella patogenesi delle neoplasie ematologiche. In uno studio murino, per esempio, è stato dimostrato come la perdita condizionale di IKB- α , inibitore di NF κ B (Nuclear Factor Kappa B), ha portato ad un disturbo simile alla Leucemia Mielomonocitica Cronica (CMML) dell'uomo inducendo la morte dei topi entro una settimana dalla nascita. Non è comunque chiaro da questo studio se sia necessaria la perdita di IKB- α sia nel microambiente che nel compartimento stromale¹⁸. In un altro studio tramite il modello murino è stato dimostrato come l'inattivazione di un gene per

il retinoblastoma (RB), che svolge un ruolo essenziale nella regolazione del ciclo cellulare, causi un disordine mieloproliferativo nel topo. Gli autori hanno anche dimostrato come tale disordine rappresenti il risultato di un'interazione tra le cellule mieloidi e il microambiente, concludendo che tale alterazione debba essere presente sia nelle cellule ematopoietiche che nel microambiente affinché possa insorgere la malattia¹⁹.

Per quel che riguarda l'essere umano, sono stati effettuati solo pochi studi, nei quali è stata presa in considerazione la presenza di anomalie citogenetiche nelle cellule stromali mesenchimali midollari in pazienti con mielodisplasie ma i risultati di tali studi devono essere interpretati con cautela dato che molto spesso sono in contrasto fra di loro. Infatti alcuni studi indicano che le cellule stromali mesenchimali sono citogeneticamente normali mentre altri mostrano in esse la presenza di anomalie cromosomiche²⁰⁻²².

Riuscire a comprendere quali dei due meccanismi siano coinvolti nella patogenesi della neoplasie ematologiche è importante per poter adottare la strategia terapeutica adeguata, con una eventuale target therapy mirata alle cellule stromali⁷.

3. Cellule Stromali Mesenchimali

I precursori multipotenti dello stroma del midollo osseo sono state le prime cellule staminali mesenchimali ad essere identificate^{23,24} e sono oggetto di interesse per la loro capacità di migrare nei tessuti danneggiati e per le funzioni di riparazione, rigenerazione e modulazione della risposta immunitaria. Caratteristiche peculiari delle cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono la capacità di self renewal e il potenziale differenziativo nei vari fenotipi del foglietto germinativo mesenchimale²⁵ (Figura 3). Nel midollo osseo le MSCs rappresentano circa lo 0.01% delle cellule mononucleate e forniscono supporto strutturale e funzionale alle cellule staminali ematopoietiche (HSC)^{26,27}. Le MSCs sono state isolate da vari tessuti quali placenta, sangue cordonale, tessuto adiposo²⁸, muscolo scheletrico²⁹, sangue periferico³⁰, polpa dentale³⁰, e, più recentemente, endometrio³¹.

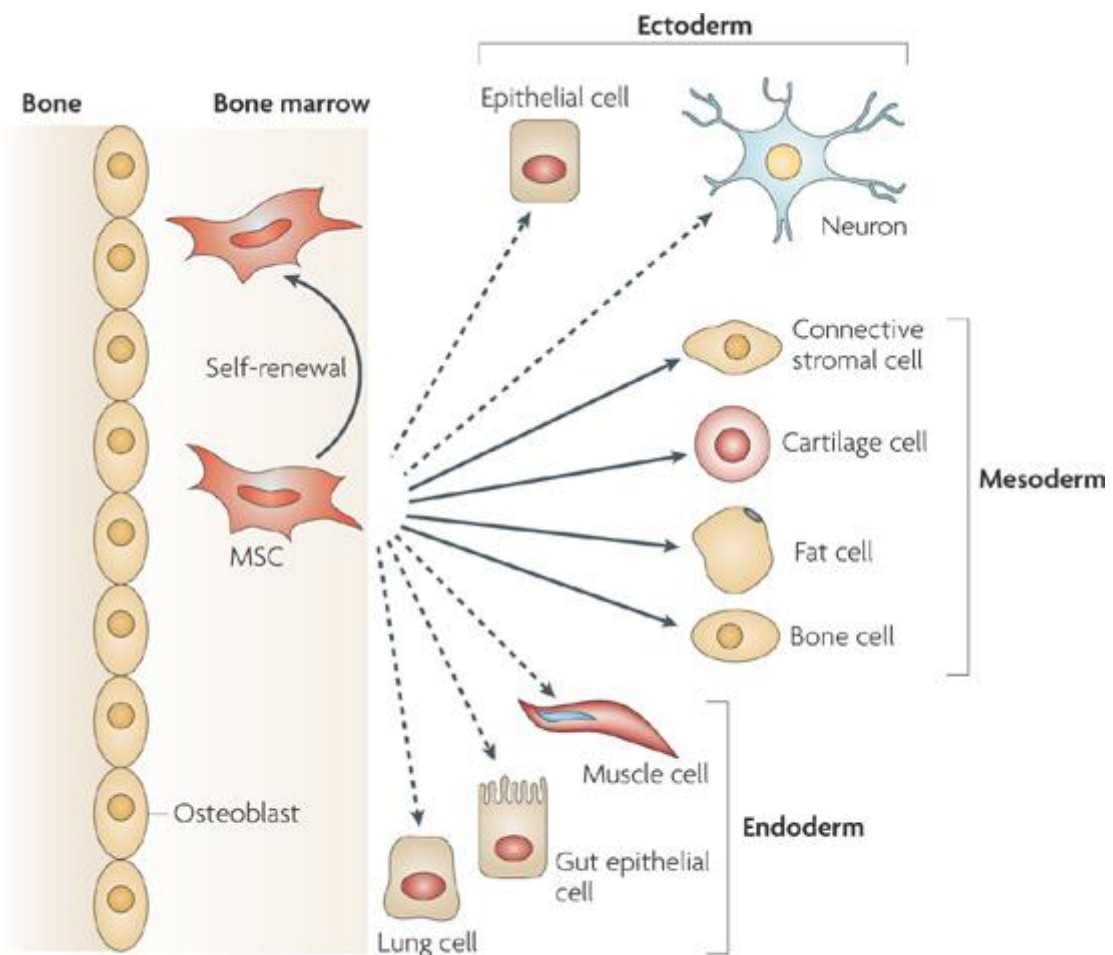
3.1 Caratteristiche delle MSCs

L'identificazione e la caratterizzazione delle MSCs sono tuttora ampiamente discusse. La mancata conoscenza di marcatori specifici delle MSCs e la variabilità della loro morfologia, legata alle condizioni di coltura e al passaggio, rende problematico identificarle in modo univoco. Per tale motivo, l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) ha stabilito requisiti minimi per identificare le MSCs, ovvero:

- a. L'aderenza alla plastica;
- b. L'espressione di CD73, CD90 e CD105, e l'assenza di espressione di marcatori ematopoietici;
- c. La capacità di differenziarsi in cellule mesenchimali, quali adipociti, condrociti e osteociti²⁵.

In particolare, l'aderenza alla plastica non sembra una caratteristica essenziale delle MSCs. Studi recenti hanno infatti dimostrato l'esistenza di una sottopopolazione di MSCs non aderenti (NA-MSCs) che presentano la stessa multipotenza delle MSCs aderenti. Inoltre, le MSCs non aderenti esibiscono la stessa capacità di migrare nei

tessuti danneggiati in vivo, come le MSCs aderenti, oltre a svolgere le stesse funzioni nella riparazione e rigenerazione tissutale^{32,33}. Gli antigeni di superficie sono un aspetto della caratterizzazione delle MSCs da considerare con attenzione perché l'espressione dei marcatori varia in base al microambiente circostante, alla durata della coltura e agli stimoli esogeni³⁴. In ultimo, a proposito della multipotenza, è ancora fortemente dibattuta l'esistenza di una sottopopolazione di MSCs del midollo osseo capace di differenziare non solo nel lineage mesenchimale, ma anche nelle linee, rispettivamente, dei foglietti germinativi ectodermico ed endodermico³⁵⁻³⁷ (Fig.3). Ulteriore interesse per le MSCs adulte è suscitato da altre due caratteristiche: le proprietà immunoregolatorie e la capacità e specificità di homing di tali cellule.



Nature Reviews | Immunology

Figura 3 La multipotenzialità delle MSCs

3.2 Fonti di MSCs: il Midollo osseo

Il midollo osseo adulto è definito come un organo composto dall'associazione di due principali tessuti, il tessuto ematopoietico e lo stroma di supporto, i quali cooperano nelle loro funzioni. Le MSCs occupano distretti anatomici precisi del midollo; nello specifico esse sono localizzate all'interno di nicchie dell'endostio, dello stroma e perivascolari³⁸. Le MSCs derivate dalla nicchia endostale rivestono la superficie ossea dove sono associate a osteoblasti e HSCs. In questa sede, le MSCs forniscono una fonte di osteoprogenitori e contribuiscono indirettamente all'osteogenesi tramite la secrezione di fattori di crescita e chemochine³⁹. L'ipotesi della nicchia vascolare delle MSCs deriva da osservazioni in vitro che dimostrano la similitudine tra i periciti e le MSCs⁴⁰. Questa ipotesi è stata confermata dimostrando in vivo la localizzazione nel sito perivascolare del midollo di una popolazione di progenitori cellulari multipotenti e capaci di auto rinnovarsi⁴¹. Tra l'altro, le MSCs rivestono un ruolo fondamentale nel mantenimento del pool di cellule staminali ematopoietiche quiescenti nel midollo osseo⁴². Si ritiene che le MSCs che esprimono la nestina si co-localizzano con le HSCs nei siti perivascolari dell'endostio e dello stroma. Inoltre, esse esprimono i geni per il mantenimento delle HSCs, fra cui CXCL12, e sono associate alle fibre nervose del sistema simpatico che regolano le HSCs nel flusso sanguigno⁴³. Friedenstein e collaboratori sono stati i primi ad utilizzare tecniche in vitro e in vivo per caratterizzare le cellule che compongono lo stroma del midollo osseo²⁴. Le modalità con cui le MSCs vengono coltivate in vitro variano considerevolmente. I protocolli di isolamento tipicamente utilizzano la centrifugazione su gradiente di densità per separare la frazione delle cellule mononucleate dalle altre componenti del midollo (eritrociti, plasma e lipidi). La frazione delle cellule mononucleate contiene una popolazione cellulare eterogenea arricchita di linfociti B e T, monociti, HSCs, progenitori endoteliali e MSCs (presenti in percentuale inferiore allo 0,5%). In seguito alla semina di MSCs, queste rappresentano la popolazione cellulare che cresce in adesione e forma colonie di cloni cellulari. È generalmente noto che le MSCs aderiscono alla plastica dopo pochi giorni dalla semina iniziale e che la coltura cellulare diventa priva di cellule ematopoietiche

non aderenti in seguito ai ripetuti cambi di terreno di coltura. Per ottenere una popolazione maggiormente purificata possono essere anche utilizzate biglie magnetiche per isolare le cellule in base alla granularità cellulare o all'espressione di antigeni di superficie. Al passaggio zero la popolazione delle MSCs è morfologicamente indistinguibile: le cellule sono piccole, fibroblastoidi e proliferanti⁴⁴. La popolazione cellulare tende a diventare morfologicamente più omogenea con la successiva espansione in vitro. L'arresto della crescita cellulare è spesso dipendente dalla variabilità del donatore, e ciò avviene tra il decimo e il trentottesimo passaggio di coltura⁴⁴, ed è associato alla riduzione della lunghezza dei telomeri⁴⁵; tuttavia, le modificazioni epigenetiche così come la metilazione del DNA possono avere un ruolo cruciale⁴⁶. In particolare, nelle colture senescenti i geni associati al ciclo cellulare, alla replicazione e alla riparazione del DNA sono poco espressi⁴⁷. In seguito a colture in vitro prolungate, le MSCs sembrano perdere la multipotenza e mostrano una predisposizione verso il differenziamento osteogenico⁴⁸. Ci sono evidenze sperimentali che suggeriscono che la semina cellulare delle MSCs a bassa densità aumenti la proliferazione, poiché si riduce il rischio di inibizione da contatto⁴⁸. Le MSCs sono comunemente espanse in un mezzo di coltura basale quale il "Dulbecco's modified Eagle's medium" (DMEM)/DMEM F-12 oppure alpha-MEM supplementato del 10% di siero fetale bovino (FBS). In alternativa, le MSC possono essere coltivate usando siero autologo, lisato piastrinico, plasma ricco di piastrine (PrP), fattori di crescita o in assenza di siero⁴⁹. In assenza di marcatori universali specifici, le MSCs sono identificate in base ad un repertorio di proteine espresse sulla superficie cellulare. Nel 2006 la International Society for Cellular Therapy ha proposto un pannello di marcatori di superficie positivi e negativi da utilizzare per la caratterizzazione delle MSCs (10): sono definite MSCs le cellule positive al 95% per CD105, CD73 e CD90 e negative al 95% per CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR. Esistono altri marcatori di superficie espressi dalle MSCs, ma in percentuale variabile: CD44⁵⁰, CD166⁵¹, Stro-1⁵⁰, CD106⁵¹, CD146.

3.3 Proprietà immunoregolatorie delle MSCs

Una delle proprietà funzionali delle MSCs più ampiamente descritta è il potente effetto sul sistema immunitario. Infatti, è ben noto che le MSCs hanno la capacità di sopprimere la risposta immunitaria⁵²⁻⁵⁶. Tuttavia, è stato anche dimostrato che le MSCs possono funzionare come cellule che presentano l'antigene (APC)^{57,58}. La caratteristica immunomodulante delle MSCs è stata sfruttata con successo in ambito clinico per superare la "graft versus host disease" (GVHD) dopo il trapianto di cellule staminali emopoietiche⁵⁹. Inoltre, le MSCs sono state usate per ridurre l'infiammazione nel morbo di Crohn⁶⁰ e ridurre gli effetti autoimmunitari che contrastano l'engraftment⁶¹. Numerose caratteristiche delle MSCs contribuiscono agli effetti immunosoppressivi. Queste cellule sono caratterizzate da una bassa espressione del Complesso Maggiore di Isotocompatibilità (MHCII) e delle molecole co-stimolatorie (B7-1 e B7-2); inoltre esse interferiscono con varie vie della risposta immunitaria tramite interazioni cellula cellula e secrezione di fattori solubili, come i membri della famiglia dei transforming growth factor- β (TGF β), le interleuchine 6 e 10 (IL-6 e IL-10), le metalloproteinasi della matrice (MMP), l'ossido nitrico e l'indoleamina 2,3 deossigenasi. Diversi studi hanno riportato che la capacità delle MSCs di inibire la proliferazione delle cellule T avviene molto probabilmente tramite la produzione di prostaglandina E2⁶². Inoltre, le MSCs possono rallentare la maturazione e la funzione delle cellule dendritiche e inibire la proliferazione, il differenziamento e la chemiotassi delle cellule B in vitro^{52,63,64}. Le proprietà immucostimolatorie delle MSCs sono state meno studiate e sembra che dipendano dalla produzione di citochine proinfiammatorie⁶⁵. La duplice funzione immunoregolatoria sembra dipendere dal numero di cellule: un alto numero di MSCs inibisce la proliferazione dei linfociti, mentre un basso numero sembra stimolarli⁶⁶ (Fig.4). Quest'ultima osservazione ha importanti implicazioni nell'utilizzo delle MSCs nelle terapie cellulari, poiché la dose cellulare è critica per le funzioni in vivo.

Altra importante applicazione riguarda il fatto che le MSCs potrebbero essere utilizzate, in associazione o meno a cellule staminali emopoietiche, allo scopo di 'rigenerare' il

microambiente midollare danneggiato dalla chemio-radioterapia o per migliorare la

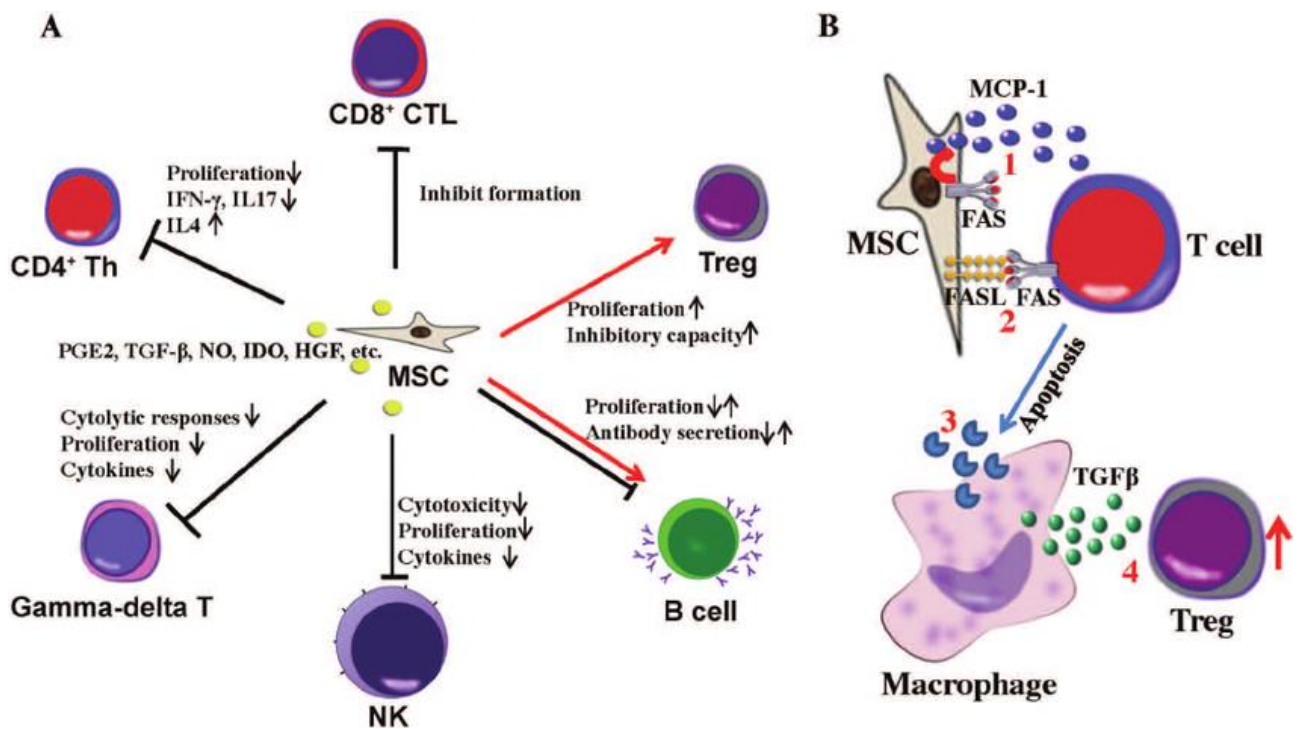


Figura 4 Proprietà immunomodulatorie delle MSCs

ricostituzione mieloide e linfoide dopo trapianto di cellule staminali. Infatti negli ultimi anni diversi trials clinici sono stati eseguiti per comprendere il ruolo delle MSCs nel trapianto di midollo osseo, in quanto le MSCs non soltanto sembrano presentare proprietà immunomodulanti, che giocano un ruolo importante nella tolleranza del trapianto, ma sembrerebbero soprattutto migliorare l'attecchimento delle HSCs e ridurre la citopenia^{50,51}. Tuttavia la trapiantabilità delle cellule stromali midollari nell'uomo ed il loro effetto rimane ancora materia di dibattito. Infatti nei rari lavori sull'uomo, presenti in letteratura, è stato dimostrato che l'attecchimento delle MSCs del donatore nel midollo del ricevente è un evento sporadico.

3.4 Limiti dell'applicazione clinica delle MSCs

E' opportuno sottolineare che, sebbene le MSCs possano svolgere un importante ruolo terapeutico, mostrano tuttavia qualche limite applicativo.

Un primo studio rivolto a comprendere gli svantaggi dell'infusione di MSCs è stato eseguito da Ning e colleghi: sono stati arruolati pazienti randomizzati a ricevere HSCs da donatori fratelli HLA-identici, arricchite e non da MSCs espanso in coltura dello stesso

donatore. Il tasso di ricaduta è risultato essere più alto nel gruppo con MSCs infuse piuttosto che nel gruppo con solo HSCs infuse, suggerendo che le MSCs prevengono efficacemente la GvHD ma non la Graft Versus Leukemia (GVL)⁶⁷. Dunque l'effetto immunomodulante locale delle MSCs potrebbe incidere sull'esito finale del trapianto, sull'attecchimento delle HSCs, sulla GvHD, sulla ricostruzione immunitaria e sulla ricomparsa di cellule leucemiche. Capire i differenti meccanismi di interazione tra MSCs e HSCs potrebbe predire l'esito del trapianto allogenico.

Infine bisogna prendere in considerazione anche un altro rischio relativo all'espansione delle MSCs. E' dimostrato che le MSCs, come le altre cellule staminali, possono continuamente crescere *in vitro* per 10/20 passaggi, ma anche esse sono soggette al limite di Hayflick⁶⁸. Infatti in uno studio del 2009 è stato osservato che su 24 colture a lungo termine di stromali (5-106 settimane) ben il 48% (11 su 24) presentava alterazioni maligne spontanee. Comparando le hMSCs con le stromali trasformate (TMC) si osservava in quest'ultime un notevole incremento del tasso di proliferazione e alterazioni morfologiche e fenotipiche⁶⁹.

Lo studio della biologia delle MSCs appare ancora ad uno stadio iniziale e molti aspetti devono essere adeguatamente esplorati prima che si possa procedere, in condizioni cliniche appropriate, a valutare l'impatto terapeutico delle MSCs nel contesto di strategie di terapia cellulare e terapia genica. Quindi è estremamente importante comprendere i limiti di queste colture cellulari per poter procedere con una terapia sicura.

4. Scopo del lavoro

Alla luce della fatto che i dati presenti in letteratura riguardo l'utilizzo delle cellule MSCs in ambito trapiantologico sono controversi e della possibilità di valutarli in un setting elettivo, come quello della deplezione T $\alpha\beta$ /CD19 , ho deciso di studiare un gruppo di pazienti sottoposto a tale tipo di trapianto, e analizzare il comportamento delle cellule mesenchimali. Si è voluto infatti verificare se in soggetti sottoposti a trapianto allogenico, le MSCs midollari fossero di origine del donatore o del ricevente, se vi fosse un diverso impatto sul trapianto stesso e su una eventuale GVHD.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Generalità

Il seguente studio è stato eseguito su campioni di aspirato midollare di pazienti affetti da malattie ematologiche sottoposti a trapianto allogenico di HSCs sex-mismatched presso il Centro Trapianti Midollo Osseo (CTMO) dell'Ospedale Maggiore di Parma.

E' stata programmata una valutazione dell'aspirato midollare ogni 4 mesi dalla data del trapianto, quindi: 4, 8, 12 mesi dopo il trapianto. Successivamente è stata prevista una valutazione dell'aspirato all'anno. Non per tutti i pazienti è stato possibile effettuare tutti i prelievi stabiliti.

L'allestimento e il processamento delle colture di MSCs e di HSCs provenienti dal midollo osseo ha compreso le seguenti fasi:

- ✓ Prelievo di 10-15 ml di sangue midollare dalla cresta iliaca.
- ✓ 750 µl di sangue midollare sono stati utilizzati per la coltura delle cellule emopoietiche
- ✓ Processamento delle HSCs
- ✓ In parallelo si è effettuato l'isolamento delle MSCs dalla frazione mononucleata (MNCs) mediante centrifugazione su gradiente di densità Ficoll-Hypaque della rimanente quantità di sangue midollare
- ✓ Espansione delle MSCs in un opportuno terreno di coltura
- ✓ Processamento delle MSCs

Sono state eseguite poi le seguenti analisi:

- 1) l'analisi FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) sulle HSCs per valutare l'attecchimento del trapianto, mediante il rilevamento della frazione cellulare del donatore e del ricevente tramite identificazione dei cromosomi XX/XY (chimerismo post-trapianto).
- 2) L'analisi FISH sulle MSCs per stabilire l'origine donatore/ricevente delle MSCs stesse.

3) L'analisi citofluorimetrica delle MSCs, per caratterizzarne il fenotipo. Esse devono infatti esprimere: CD105, CD 90, CD44 e CD 73, tipici delle MSCs, e non esprimere antigeni CD 45, CD 49d, CD33, CD34 e CD14, tipici markers emopoietici.

Tutte queste analisi sono state ovviamente effettuate in tutti i pazienti su ogni prelievo nei tempi stabiliti.

5.2 Caratteristiche dei pazienti

In questo studio sono stati inclusi 10 pazienti di età media di 47,7 anni, di cui sette sono maschi e tre femmine, affetti da neoplasie ematologiche. Tutti sono stati sottoposti a TMO allogenico presso il Centro Trapianti Midollo Osseo (CTMO) dell'Ospedale Maggiore di Parma.

Le caratteristiche dei pazienti sono riportate nella tabella 1.

In particolare in tutti i casi tranne uno sono state infuse cellule staminali da sangue periferico dopo stimolazione del donatore con fattore di crescita G-CSF a scopo mobilizzante, mentre in un caso è stato infuso midollo, ottenuto da aspirato midollare da donatore familiare HLA identico.

Sono stati analizzati 8 pazienti sottoposti a trapianto da donatore familiare HLA-incompatibile. In questo caso il condizionamento utilizzato è di tipo mieloablativo (MAC: MyeloAblative Conditioning), con treosulfano, tiotepa e fludarabina, associato a siero antilinfocitario (ATG), seguito da reinfusione di una megadose di cellule staminali emopoietiche, sottoposte a deplezione selettiva $\alpha\beta$ TCR/CD19 senza alcun tipo di profilassi farmacologica della GVHD.

Il paziente n.9 è stato sottoposto a condizionamento mieloablativo con Tiotepa, Fludarabina, Melfalane e ATG, con reinfusione di cellule staminali midollari da donatore familiare HLA identico, associando dal giorno -1 ciclosporina come profilassi della GVHD.

Il paziente n.10 è stato invece sottoposto a condizionamento ad intensità ridotta (RIC: Reduced Intensity Conditioning), che prevede l'utilizzo di TBI 2 Gy, Fludarabina e ATG, a

scopo immunosoppressivo e reinfusione di cellule staminali periferiche del donatore aploidentico, sottoposte a deplezione CD3/CD19 e utilizzo della Ciclofosfamide post trapianto come profilassi della GVHD, secondo un protocollo sperimentale interno alla nostra Unità Operativa.

	Sesso/Età	Patologia	Cariotipo alla diagnosi	Chemioterapia di condizionamento	Fonte HSCs	Tipo di trapianto
Paziente 1	M/22	LAL	46,XY	MAC	PBSC	Aploidentico con T-deplezione $\alpha\beta$ /CD19
Paziente 2	M/57	LAM	16% trisomia e tetrasomia del 22	MAC	PBSC	Aploidentico con T-deplezione $\alpha\beta$ /CD19
Paziente 3	M/68	MDS	46, XY	MAC	PBSC	Aploidentico con T-deplezione $\alpha\beta$ /CD19
Paziente 4	F/58	LAM	46, XX	MAC	PBSC	Aploidentico con T-deplezione $\alpha\beta$ /CD19
Paziente 5	F/43	LAL	Del(9)q	MAC	PBSC	Aploidentico con T-deplezione $\alpha\beta$ /CD19
Paziente 6	M/48	LAL	Complesso con 2 cloni	MAC	PBSC	Aploidentico con T-deplezione $\alpha\beta$ /CD19
Paziente 7	M/36	LAL	46, XY	MAC	PBSC	Aploidentico con T-deplezione $\alpha\beta$ /CD19
Paziente 8	F/45	LAM	46, XX	MAC	PBSC	Aploidentico con T- deplezione $\alpha\beta$ /CD19
Paziente 9	M/36	MDS	46, XY	MAC	midollo	Allo-HSCT da donatore familiareHLA compatibile
Paziente 10	M/54	MM	Complesso	RIC	PBSC	Aploidentico con T- deplezione CD3/CD19

Tabella 1 Caratteristiche dei pazienti: età, sesso, patologia, cariotipo alla diagnosi, tipo di condizionamento (MAC: MyeloAblative Conditioning; RIC: Reduced Intensity Conditioning), fonte di HSCs e tipo di trapianto.

5.3 Coltura e processamento delle HSCs (CITOGNETICA CONVENZIONALE)

Per coltura in vitro si intende una serie di metodologie che consentono il mantenimento e lo sviluppo di cellule su terreni di coltura a definita composizione chimica ed in condizioni sterili. Tutti i terreni di coltura devono contenere una miscela di sali

inorganici detta soluzione salina bilanciata (BSS). La funzione di questa soluzione salina è quella di mantenere costante il Ph e la pressione osmotica nel terreno e anche di fornire un'adeguata concentrazione di ioni inorganici essenziali. Tutti i terreni di coltura contengono anche una miscela completa di aminoacidi, un supplemento di vitamine e, in alcuni casi, componenti extra come coenzimi e intermedi metabolici; inoltre è richiesta l'aggiunta di siero per permettere la crescita di linee cellulari primarie.

Del sangue midollare dei pazienti e dei controlli sono state allestite colture a breve termine (24h-48h) secondo la metodica della citogenetica convenzionale: 750 µl di campione sono stati posti in una fiaschetta da 25 cm² a cui è stato aggiunto 8 ml di terreno RPMI, supplementato di FBS (FetalBovineSerum 20%), glutammina ed antibiotico 1% ed infine la fiaschetta è stata posta in termostato a 37°C e al 5% di CO₂. Al termine della coltura è stata aggiunta la colchicina (Colcemid, Invitrogen). La colchicina è un alcaloide policiclico molto velenoso contenuto nei tuberi (0.08-0.2%) e nei semi (0.2-0.4%) del *Colchicum autumnale*, pianta bulbosa perenne. Agisce inibendo la formazione dei microtubuli del fuso mitotico ed arresta le cellule in divisione nello stadio della metafase, quando la struttura dei cromosomi ha il massimo grado di condensazione. Al trattamento con la colchicina è seguita la fase del "processamento" costituita da due momenti:

- **il trattamento ipotonico**, ovvero l'incubazione delle cellule con una soluzione ipotonica di cloruro di potassio (KCl 0.075M) che, avendo una concentrazione salina inferiore a quella della cellula, richiama acqua all'interno della cellula stessa generando una forte pressione sulla membrana, mettendola in tensione. Questa pressione esercitata dall'acqua assunta che gioca un ruolo determinante sullo "spreading" dei cromosomi durante l'evaporazione finale del fissativo.
- **la fissazione**. Dopo il trattamento ipotonico, le cellule sono state fissate in una soluzione di metanolo ed acido acetico glaciale (fissativo di Carnoy) in rapporto 3:1. L'elevata quantità di alcol rispetto all'acido acetico impedisce a quest'ultimo di entrare in contatto con le molecole di acqua dell'umidità atmosferica. Infatti in assenza di alcol l'umidità atmosferica è sufficiente ad innescare l'azione dell'acido

acetico che in presenza anche solo di poche molecole d'acqua attacca le proteine ed i lipidi delle membrane cellulari distruggendole. L'alcol serve essenzialmente a proteggere le membrane cellulari delle mitosi dall'aggressione dell'acido acetico.

Alla fase di fissazione è seguito "**l'allestimento dei preparati**" facendo sgocciolare il pellet cellulare in fissativo su vetrini istologici che sono stati posti ad essiccare. Questo è il momento più importante dell'intera procedura, quando il film di fissativo rimasto sul vetrino incomincia ad evaporare. Prima evapora l'alcol che alla fine non è più in grado di impedire all'acido acetico di entrare in contatto con l'acqua presente nell'umidità atmosferica. Tale contatto innesca l'azione dell'acido acetico che attacca le membrane cellulari, degradandole. A questo punto la pressione dell'acqua interna, assorbita durante il trattamento ipotonico, non più trattenuta dalla resistenza della membrana cellulare, provoca un'espansione improvvisa della cellula. In questa fase l'energia liberata trascina con sé anche i cromosomi stirandoli (i cromosomi sono molto elastici), allungandoli e sparpagliandoli ("spreading"). Quando tutto l'acido acetico evapora i cromosomi restano fissati sul vetrino. A questo punto i vetrini sono pronti per l'eventuale analisi citogenetica convenzionale o FISH. Per questo studio sono stati sottoposti direttamente all'analisi FISH per la valutazione del chimerismo post-trapianto. L'analisi citogenetica convenzionale è stata eseguita routinariamente in tutti i pazienti alla diagnosi della malattia, considerando il suo fondamentale ruolo diagnostico e prognostico.

5.4 Isolamento da sangue midollare delle MSCs con gradiente di densità Ficoll Hypaque.

Dall'aspirato midollare è stato effettuato l'isolamento delle MNCs mediante gradiente di densità (Ficoll-Hypaque densità 1.077 g/ml, 800g, 30 min.). In questo modo è stata ottenuta la separazione delle cellule mononucleate da quelle polimorfonucleate e non nucleate che sono state messe in coltura (Fig.5) per poi arrivare all'isolamento delle MSCs.

Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

- Diluizione del campione 1:2 in PBS in un tubo da 50 ml
- Trasferire 25 ml di Ficoll sul fondo di un nuovo tubo da 50 ml e depositare molto delicatamente sul Ficoll 25 ml di sangue midollare diluito tenendo il tubo inclinato (ripetere questa operazione in più tubi a seconda del quantitativo iniziale di sangue)
- Centrifugare a 1900 rpm per 30 minuti senza freno
- Eliminare una parte di siero e recuperare l'anello centrale contenente MNCs, con il restante siero, evitando accuratamente di prelevare il pellet rosso. Porre in un altro tubo da 50 ml sterile
- Lavare portando a 50 ml con PBS e centrifugare a 2000 rpm per 10 minuti
- Eliminare il sovrantante e risospesione il pellet in 10 ml di PBS. Centrifugare a 1500 rpm per 10 minuti
- Risospesione in 10 ml di PBS

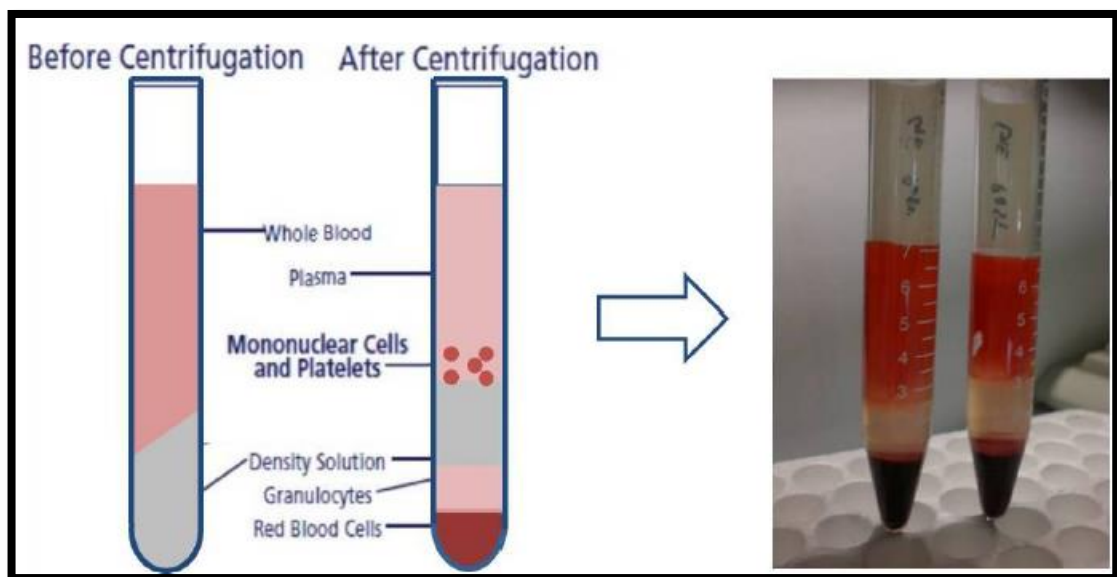


Figura 5 Rappresentazione di come appare il campione prima e dopo la centrifugazione

Infine, prima di procedere con la semina, è stata eseguita la conta cellulare mediante camera di Burker al microscopio ottico (Fig. 6). Per la conta il pellet è stato sospeso nel colorante Turk (diluizione 1:10-15) in modo da visualizzare le cellule al microscopio in campo chiaro.

- Formula 1: Concentrazione cell/ml= numero medio delle cellule per quadrante * 10.000 * fattore di diluizione.

- Formula 2: Numero totale = concentrazione cell * ml tot

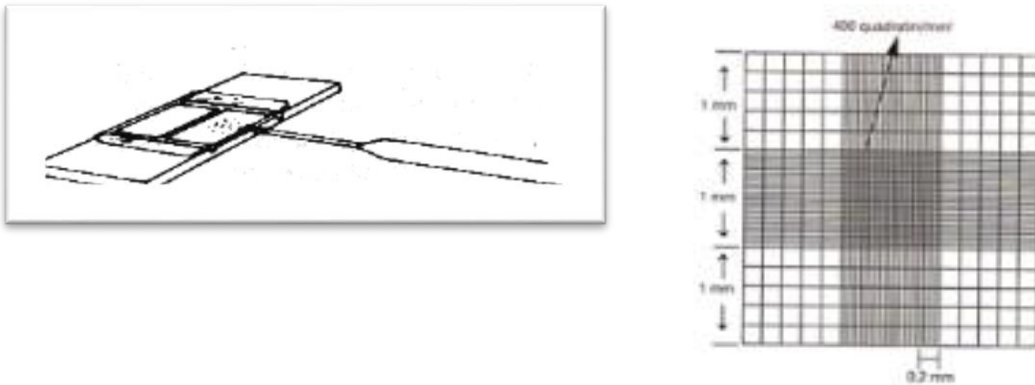


Figura 6 La prima immagine mostra l'allestimento della camera di Burkert, con una pipetta si trasferiscono 10 μ l di sospensione cellulare nella camera del vetrino (dapprima coperta da un vetrino copri-oggetto) permettendo il riempimento per capillarità. La seconda immagine mostra come appare al microscopio la camere di conta.

5.5 Colture ed espansione delle MSCs

Dati riportati in letteratura sostengono che la frequenza delle MSCs in un prelievo di aspirato midollare è di 1 su 18.000 cellule mononucleate e questo significa che da ogni prelievo il numero di mesenchimali midollari che si ottiene è molto limitato ed è quindi importante ricorrere all'espansione cellulare in vitro⁷⁰.

Dunque dopo separazione mediante gradiente di densità Ficoll, le cellule mononucleate sono state seminate in una fiasca di 25 cm² con il mezzo di crescita costituito da terreno α -MEM supplementato con il 15% di FBS (Siero Fetale Bovino, Gibco, Invitrogen, Paisley, UK), GlutaMAX™ 2mM (Gibco) e 100U/ml penicillina/streptomicina (Gibco).

Il valore medio di MNCs per ogni aspirato era di 40 X10⁶ cellule. Tali cellule sono state risospese in 8ml di terreno e si è proceduto con la coltura in fiasche da 25 cm². Tale passaggio viene definito P₀. Le fiasche così seminate sono state poste in incubatore a 37°C e al 5% di CO₂ per 24h.

Al giorno 1 si è effettuato il "passaggio a 24 ore", ossia le cellule ancora in sospensione sono state trasferite in una nuova fiasca da 25 cm². Questo è un passaggio molto

importante perché ci permette di effettuare una prima purificazione delle cellule dai monociti, i quali aderiscono alla plastica a partire dalle prime 24/48 ore. La fiasca è stata nuovamente posta in incubatore a 37°C.

Una volta raggiunta la confluenza (2-3 settimane), le cellule sono state staccate dalla fiasca mediante l'uso di tripsina. Tale processo richiede diversi passaggi: innanzitutto viene prelevato il terreno, si aggiunge 8 ml di PBS per eliminare dalla fiaschetta ogni traccia di terreno, dopodiché si preleva il PBS e si aggiunge 1,5 ml di tripsina che si lascia agire per 3 minuti incubando la fiaschetta nel termostato a 37 °C. Passati i 3 minuti si picchietta la parte posteriore della fiaschetta per facilitare il distacco delle cellule, si controlla al microscopio ottico l'avvenuto distacco delle MSCs e si procede con l'aggiunta di 1,5 ml di α -MEM, importante perché contiene FBS che blocca l'azione della tripsina la cui azione se prolungata potrebbe danneggiare le cellule. Si aggiunge nella fiaschetta 10 ml di PBS e il tutto viene trasferito in un tubo da 15 ml per essere centrifugato per 10 minuti a 1200 rpm. Alla fine della centrifuga si decanta si aggiungono 1 ml di α -MEM e si risospendono bene le cellule. Viene poi eseguita una nuova conta, in media sono state ottenute $4,5 \times 10^5$ cellule e si è proceduto alla semina nelle chamber slide, previa caratterizzazione immunofenotipica. Le chamberslides, sono vetrini per colture cellulari e per analisi in situ che permettono di coltivare le cellule per poi analizzarle su un vetrino per microscopio, esse sono costituite da una camera in plastica divisa in 2 pozzetti e incollata su un vetrino.

Le chamber slide sono state seminate con una densità di 20.000 cellule per pozzetto. Tale passaggio viene definito P₁.

Le chamberslides sono state, quindi, poste in incubatore a 37°C per permettere l'espansione delle cellule fino a confluenza.

5.6 Processamento chamber slide

Dopo circa 6-7 giorni segue la fase del "processamento":

1. Le chamberslides sono state svuotate dal terreno di coltura e riempite con circa 2 ml di soluzione ipotonica, una miscela costituita da Sodio Citrato 1% e Sodio Cloruro

- 0,3% in un rapporto finale di 3:2. La soluzione si è lasciata agire per 10 minuti a temperatura ambiente;
2. Si è aggiunto circa 2 ml di fissativo di Carnoy's. Questo viene definito "passaggio misto", che prevede che il fissativo agisca per 10 minuti insieme alla soluzione ipotonica;
 3. Le chamberslides sono, quindi, state svuotate e si sono aggiunti 2 ml di fissativo per 10 minuti a T ambiente;
 4. Le chamberslides sono state nuovamente svuotate e si è effettuato un ultimo lavaggio in fissativo (10 minuti a T ambiente);
 5. Dopo aver decantato il fissativo, si è effettuato un ultimo lavaggio, utilizzando una soluzione di acido acetico al 70% (1 minuto a T ambiente);
 6. Una volta asciugati i vetrini all'aria, la camera è stata rimossa facilmente con un attrezzo.

5.7 Citogenetica Molecolare (FISH)

I principali limiti della citogenetica convenzionale, cioè l'analisi delle mitosi in coltura dopo il bandeggio, sono costituiti dalla possibile assenza di mitosi nelle cellule da analizzare, che porta ad un fallimento tecnico dell'indagine; dall'assenza di mitosi nel compartimento cellulare neoplastico, che porta a risultati falsamente negativi; dalla cattiva morfologia cromosomica, che spesso rende difficoltoso il riconoscimento dei cromosomi ed ancor di più delle loro alterazioni. Per ovviare in parte a tali problemi sono state sviluppate tecnologie di citogenetica dette "molecolari", che sfruttano la capacità che hanno le molecole di DNA a singolo filamento ad ibridizzare in condizioni idonee con un filamento ad esso complementare. L'impiego di appositi frammenti di DNA, dette "sonde" che vengono marcate con sostanze fluorescenti, consente quindi di ibridizzare direttamente in cellule fissate sul vetrino, sia in interfase che in metafase, e quindi di identificare la struttura ed il numero di specifiche parti di cromosoma mediante osservazione con microscopio a fluorescenza, questo rappresenta il principio della FISH. Un ovvio vantaggio della tecnica è quello di poter identificare specifiche

regioni cromosomiche mediante ibridazione di nuclei interfascici. E' pertanto possibile per alcuni scopi evitare la fase di coltura cellulare semplificando l'analisi ed ovviare, così, al problema dell'assenza di mitosi. Inoltre l'elevata sensibilità e specificità della metodica, unitamente alla rapidità con cui può essere condotta hanno fatto sì che la FISH abbia assunto un ruolo fondamentale nella pratica clinica (Tab. 2).

La FISH in onco-ematologia	
✓	Dimostra anomalie numeriche e strutturali, tra queste ultime nuove traslocazioni criptiche alla citogenetica convenzionale
✓	Definisce l'origine e la natura di cromosomi marcatori e di cariotipi complessi
✓	Identifica amplificazioni e delezioni di geni o di loci polimorfici
✓	Definisce la chimera dopo trapianto allogenico di midollo osseo sex-mismatched
✓	Valuta la risposta ad una terapia svelando un'eventuale MMR
✓	Permette di stabilire quale/i filiera/e cellulare/i sia/siano coinvolta/e in quel determinato disordine onco-ematologico se impiegata insieme all'immunofenotipo

Tabella 2 La tabella descrive tutti i campi in onco-ematologia in cui si utilizza l'analisi FISH

Le sonde impiegate sono costituite da nucleotidi modificati chimicamente e legati in modo covalente a biotina o a digossigenina, o direttamente coniugati a vari fluorocromi. Il legame ("annealing") tra test probe e sequenza bersaglio, avvenuto grazie alla complementarietà delle loro sequenze, viene dimostrato dall'attacco del fluorocromo a streptavidina o ad anticorpi antidigossigenina, che hanno un'alta affinità per il probe. Al microscopio a fluorescenza quello che si vedrà sarà un segnale brillante. Esistono un numero vario di sonde differenti che si adattano ai diversi scopi e ai diversi esami; si possono distinguere (Fig. 7):

1) sonde centromeriche (o alfoidi, CEP Chromosome Enumeration Probes): ibridizzano le sequenze ripetitive alfa e beta satelliti presenti nei centromeri, utili per identificare specifici cromosomi o come controllo della presenza (o assenza) di determinati cromosomi. Vengono usate per contare il numero di copie di cromosomi presenti

nella cellula in modo da poter valutare le loro alterazioni numeriche (trisomie, monosomie). Tali sonde si possono utilizzare sia su cromosomi metafasici che su cromosomi interfasici.

- 2) sonde locus-specifiche** (LSI, locus specific identifier): sono sonde molto piccole che riconoscono porzioni corte del cromosoma; vengono utilizzate per evidenziare aberrazioni che coinvolgono un gene o una parte di esso. L'efficienza di ibridazione dipende dalle dimensioni del DNA bersaglio, più questo è lungo e migliore sarà l'efficienza di ibridazione. Queste sonde sono contenute in vari vettori (YAC, PAC, BAC). In onco-ematologia, fornendo segnali ben evidenti sia in metafase che in interfase, consentono di eseguire un rapido screening delle varie traslocazioni o delezioni cromosomiche o amplificazioni geniche. In commercio sono disponibili vari tipi di sonde locus specifiche a seconda del tipo di aberrazione genica: per la ricerca di specifiche traslocazioni ci sono le sonde dual color-dual fusion (es. BCR/ABL, PML/RAR α) che consentono di identificare il gene di fusione specifico, ma anche il reciproco, con un doppio segnale di fusione. Ci sono inoltre le sonde dual colore break-apart, che sono utilizzate per identificare i riarrangiamenti dei cosiddetti "geni promiscui", ovvero quei geni, come MLL o il locus IgH, che hanno molti partner differenti di traslocazione. Utilizzando queste sonde la presenza del riarrangiamento del gene è identificata tramite lo split del segnale, anziché il segnale di fusione.
- 3) Sonde telomeriche:** sono utili nell'identificazione di traslocazioni/delezioni che coinvolgono le regioni telomeriche
- 4) Sonde chromosome painting**(WCP, Whole Chromosome Painting): riconoscono sequenze specifiche per ogni singolo cromosoma localizzate lungo tutto il suo asse; il cromosoma appare interamente colorato. L'uso di queste sonde è riservato all'ibridazione di cromosomi metafasici, di cui permette di studiarne la struttura. E' pertanto un tipo di sonda che permette di risolvere traslocazioni complesse.

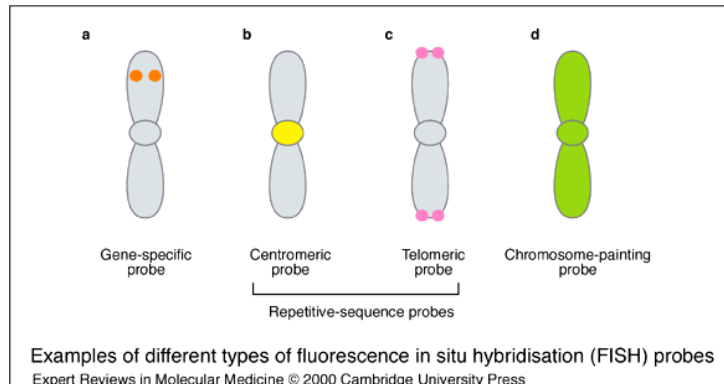


Figura 7 Rappresentazione delle sonde utilizzate per la FISH

In questo lavoro è stata utilizzata la sonda **CEP X SpectrumOrange/Y SpactrumGreen** (CEP X SO/ Y SG), specifica sia per la sequenza ripetuta alpha satellite presente nella regione centromerica del cromosoma X (Xp11.1-Xq11.1), marcata con il fluorocromo Spectrum Orange, ma anche per il DNA satellite III presente sul braccio lungo del cromosoma Y, a livello della banda 1, sottobanda 2 (Yq12), marcata con il fluorocromo SpectrumGreen (Fig. 8).

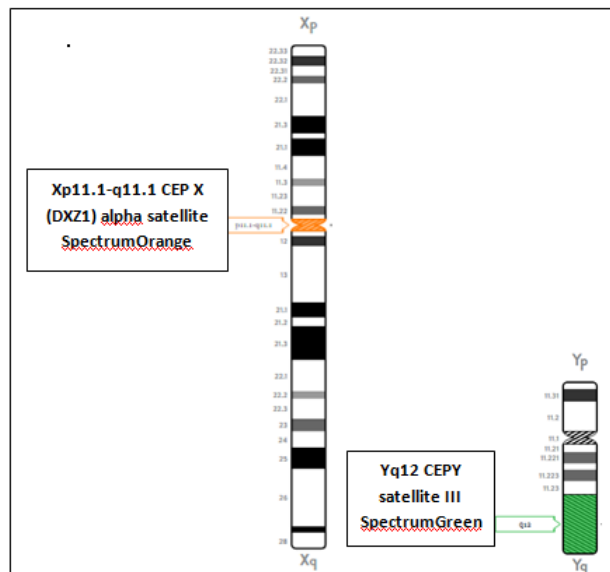


Figura8 CEP X SO/Y SG Abbott Molecular

Tale sonda centromerica consente la rapida identificazione dei cromosomi sessuali in cellule in interfase e metafase, pertanto tali sonde sono estremamente valide per valutare l'attecchimento del trapianto di midollo da donatore di sesso opposto. Infatti in seguito al trapianto la stima della proporzione delle cellule del donatore e del ricevente può essere usata per definire il successo del trapianto, per identificare la presenza di cloni maligni e per diagnosticare una recidiva. Ciò è vero soprattutto per il trapianto di

midollo sex-mismatched. Nel caso in cui si trovano il 100% di cellule del donatore significa che è avvenuto un attecchimento completo⁷¹.

L'ibridazione si osserva usando un microscopio a fluorescenza con appropriati filtri che consentono di osservare un intenso segnale arancione fluorescente a livello del centromero del cromosoma X e un intenso segnale verde fluorescente localizzato nella regione Yq12 del cromosoma Y.

I risultati vengono riportati come percentuale dei nuclei con XX, XY. L'interpretazione dei segnali segue uno schema ben preciso proposto dalla casa produttrice della sonda.

- 1) Due segnali vicini approssimativamente della stessa dimensione ma non uniti da un legame visibile vengono contati come 2 segnali diversi
- 2) Bisogna contare come unico segnale, un segnale luminoso diffuso se però la diffusione è continua ed in una regione specifica.
- 3) Due segnali piccoli e collegati fra loro devono essere contati come unico segnale
- 4) Non contare nuclei con segnali incerti

5.8 Tappe della metodica FISH

Il preparato, che nel caso delle cellule emopoietiche, a differenza delle MSCs, è stato precedentemente fissato e strisciato su vetrino portaoggetti secondo le comuni procedure della citogenetica convenzionale sopra descritte, ha subito i seguenti trattamenti (Fig. 9):

- 1) Deidratazione, tramite tre passaggi in una scala crescente di alcol etilico (ETOH 70%-85%-100%) di due minuti ciascuno.
- 2) Applicazione dei 10 µl di sonda sul vetrino e subito dopo viene applicato un vetrino copri-oggetto (22 mm x 22 mm) consentendo così alla sonda di disperdersi in tutta l'area d'ibridazione. La sonda, che viene conservata in freezer a -20 °C, prima di poter essere utilizzata viene riscaldata a T ambiente, per diminuire la sua viscosità e facilitare il pipettaggio, viene vortexata e spinnata in una microcentrifuga per 5 secondi.

3) Denaturazione con calore ($73\pm 1^\circ\text{C}$ per 5 min.) del DNA del campione in esame e del DNA della sonda simultaneamente (codenaturazione) in un singolo passaggio, ponendo il vetrino sul quale è stata dispensata la sonda, su una piastra riscaldata alla opportuna temperatura di denaturazione.

4) Ibridazione in incubatore a 37°C del campione in esame e della sonda per 12-16 h periodo di tempo nel quale viene permesso al DNA della sonda di riconoscere le sequenze complementari contenute nel DNA bersaglio ("annealing") del campione in esame.

Sono disponibili in commercio opportuni sistemi che consentono di combinare codenaturazione e ibridizzazione, in questo studio è stata utilizzata un'apparecchiatura (HIBrite VYSIS) fornita di una piastra che ha la capacità di ospitare più vetrini (sino a 12) e di variare la temperatura consentendo in tempi rapidi il passaggio dalla temperatura di denaturazione a quella di ibridazione. In tal modo viene ridotto il numero di passaggi e di conseguenza il tempo di svolgimento dell'intero processo.

5) Due lavaggi post-ibridazione eseguiti a temperature differenti tramite opportune soluzioni di lavaggio ($0.4\times\text{SSC}/0.3\%$ NP40 a $73\pm 1^\circ\text{C}$, $2\times\text{SSC}/0.1\%$ NP-40 a T ambiente), per eliminare la sonda in eccesso ed eventuali legami aspecifici.

6) Controcolorazione con DAPI.

7) Esame del preparato al microscopio a fluorescenza (Nikon Instruments) e acquisizione delle immagini mediante un software (GENIKON).

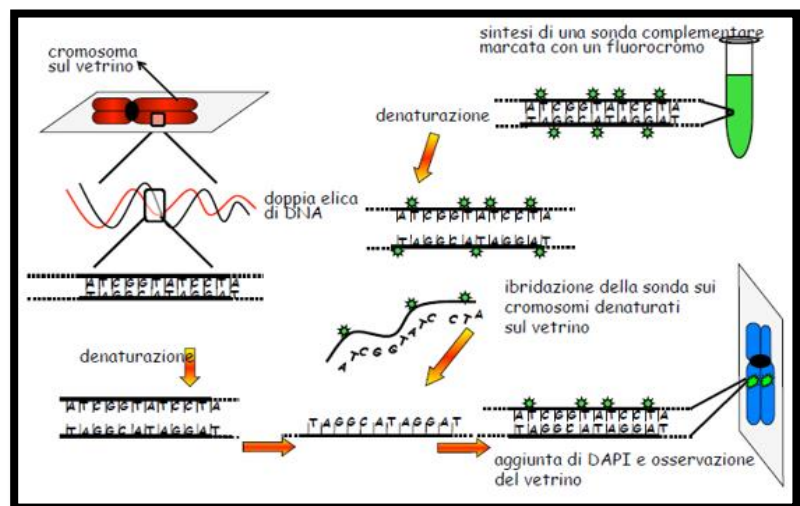


Figura 9 La figura mostra alcune fasi dell'analisi FISH

6 RISULTATI

Nei 10 pazienti sono stati eseguiti 28 prelievi totali di sangue midollare da cui sono state allestite colture cellulari. In circa 5/6 settimane ogni campione ha raggiunto una buona confluenza, ossia il monostrato di MSCs ha ricoperto il 75% della superficie della fiaschetta.

6.1 Analisi citogenetica delle HSCs

L'analisi citogenetica delle HSCs è stata effettuata soltanto alla diagnosi e nei casi in cui si è verificata la recidiva di malattia post trapianto. I risultati sono mostrati nella tabella 3. Sono state analizzate almeno 15-20 metafasi in ciascun paziente ed il cariotipo è stato descritto in accordo con "l'International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN (2009)". Le alterazioni sono state definite clonali se almeno due metafasi possedevano lo stesso riarrangiamento cromosomico o la stessa trisomia e se almeno tre metafasi possedevano la stessa monosomia. Quattro pazienti erano affetti da Leucemia Linfoblastica Acuta (LAL), 3 da Leucemia Mieloide Acuta (LAM), 2 da sindrome mielodisplastica (MDS) e 1 da Mieloma Multiplo (MM) (Fig. 10).

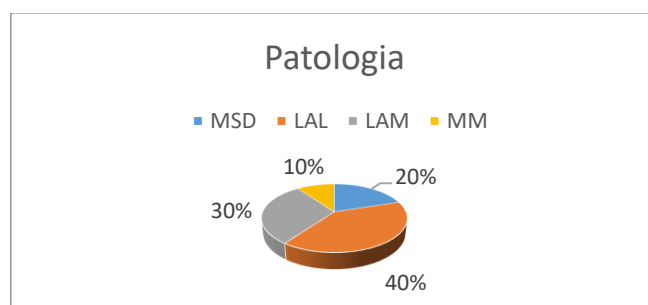


Figura 10 Grafico a torta che mostra la percentuale delle varie patologie ei pazienti

Il 60% dei pazienti (6/10) alla diagnosi presentava un cariotipo normale, il restante 40% mostrava cariotipo anomalo: nel paziente 3 si osservavano 2 cloni rispettivamente con trisomia e tetrasomia del cromosoma 22; il paziente 6, affetto da LAL Burkitt-like, invece, presentava un clone con traslocazione t(8;14) standard ed una traslocazione sbilanciata t(1;13)(q23;q22); il paziente 5 presentava, nel 75% delle metafasi, delezione del braccio corto del cromosoma 9; ed infine il Paziente 10, affetto da Mieloma Multiplo, presentava un cariotipo complesso caratterizzato dalla presenza di del (13q),

t(4;14) con duplicazione del der(14), amplificazione dell'1q e polisomia (tutte le caratteristiche dei pazienti sono riportate nella tabella 3).

Paziente (Data trapianto)	N° prelievi	HSCs	MSCs	Remissione/ Recidiva
Paziente 1 ♂	3	56% XX – 34% XY	70% XX – 30% XX	Dopo 6 mesi recidiva con comparsa di clone con cariotipo 47, XY + X Deceduto
		100% XX	94% XY – 6% XXYY	
		93.2% XX- 6.8% XY	97% XY – 3% XXYY	
Paziente 2 ♂	3	100% XX	98% XY – 2% XXYY	Dopo un anno 8% XX- 92% XY Deceduto
		100% XX	100% XY	
		100% XX	100% XY	
Paziente 3 ♂	1	100% XX	95% XY- 5% XX YY	Dopo 20 mesi recidiva con comparsa di clone con cariotipo: 46,XY,-7+mar Deceduto
Paziente 4 ♀	1	100% XY	100% XX	Remissione
Paziente 5 ♀	1	100% XY	100% XX	Remissione
Paziente 6 ♂	5	100% XX	100% XY	Remissione
		100% XX	92% XY 8% XXYY	
		100% XX	97% XY 3% XXYY	
		100% XX	100% XY	
		100% XX	100% XY	
Paziente 7 XY ♂	2	27% XX	1% XX	73% XY – 27% XX Deceduto
		97% XX- 3% XY	96.5 % XY- 1.5% XX- 2% XXYY	
Paziente 8 ♀	1	100% XY	95% XX – 15% XX XX	Deceduto
Paziente 9 ♂	3	100% XX	100% XY	Remissione
		100% XX	100% XY	
		100% XX	100% XY	
Paziente 10 ♂	2	28%XY-72%XX	100% XY	Remissione
		15%XY-85%XX	100% XY	

Tabella 3 La tabella mostra per ciascun paziente, il sesso, il numero dei prelievi, i risultati FISH delle HSCs e delle MSCs ed il decorso clinico (remissione o recidiva)

6.2 Analisi FISH HSCs e MSCs

La tabella 4 mostra i risultati di tutte le analisi FISH eseguite sulle HSCs e sulle MSCs nei 10 pazienti.

Per quel che riguarda le HSCs, dopo circa 20/ 30 giorni dal trapianto è stato eseguito un prelievo di sangue midollare in modo da valutare il loro attecchimento e definire così il successo del trapianto. Sui campioni, quindi, è stata eseguita analisi FISH utilizzando la sonda CEP X SpectrumOrange/Y SpactrumGreen (CEP X SO/ Y SG) e in tutti i campioni si è assistito ad un chimerismo completo, 100% cellule del donatore. Dei 10 pazienti 5 sono andati incontro a recidiva, documentata con la perdita del chimerismo donatore, a favore di una ricomparsa di HSCs del ricevente, espressione della ricomparsa del clone leucemico.

Per quel che concerne l'analisi FISH delle MSCs, in quasi tutti i prelievi abbiamo osservato un limitato o nullo attecchimento delle MSCs del donatore.

Come si può osservare in tabella 3, in tutti i pazienti (a parte il primo paziente la cui analisi è iniziata al momento della recidiva) è stata eseguita una analisi entro i primi tre mesi dal trapianto. Successivamente, nei pazienti analizzabili fino ad un anno di follow up, abbiamo ripetuto l'analisi a 6, 9 e/o 12 mesi. In tre pazienti è stato possibile proseguire l'analisi ad un follow up più lungo, fino a 24 e/o 36 mesi.

La scelta delle tempistiche è stata dinamica. Partendo dall'idea di analizzare i campioni a time point più ravvicinati, abbiamo successivamente deciso di dilazionare tale analisi, in relazione alla evidenza che in tutti i campioni analizzati nei primi mesi le MSCs risultavano essere del ricevente.

Un follow up più lungo è stato poi ovviamente possibile nei pazienti che non sono andati incontro a recidiva.

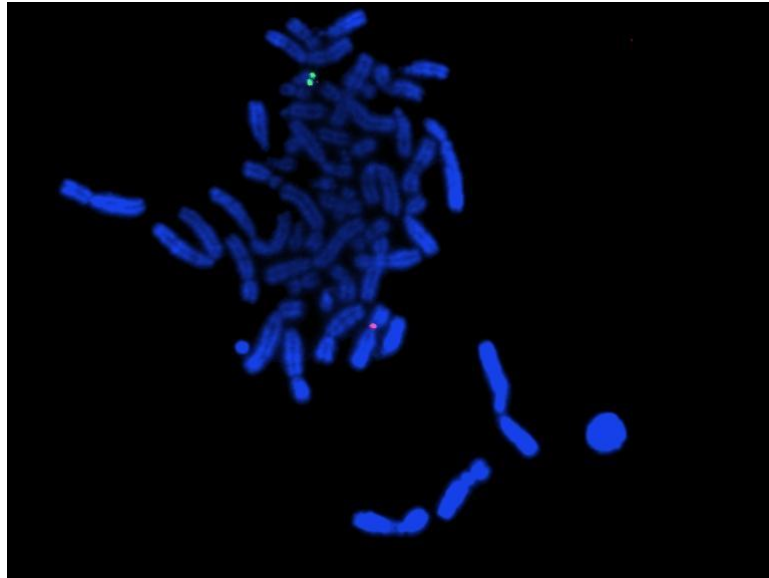


Figura 11 Fotografia di una metafase di una MSCs XY, il segnale rosso (in basso) indica la X, il segnale verde (in alto) indica la Y

Nella maggior parte dei pazienti (8/10 ovvero 80%), sin dal primo prelievo, le MSCs sembravano essere di origine del ricevente. Solo il rimanente 20% (Pz 1 e Pz 7) mostrava in piccola percentuale la presenza di MSCs del donatore. Nello specifico, nel paziente 1 al primo prelievo sono state messe in evidenza MSCs del donatore (30%) che non sono state tuttavia ritrovate nei prelievi successivi (Fig.12). Nel paziente 7, al primo prelievo, solo l'1% delle MSCs mostrava un pattern di ibridazione relativo alle cellule del donatore, condizione che si è mantenuta anche al secondo prelievo (MSCs del donatore: 1,5%).

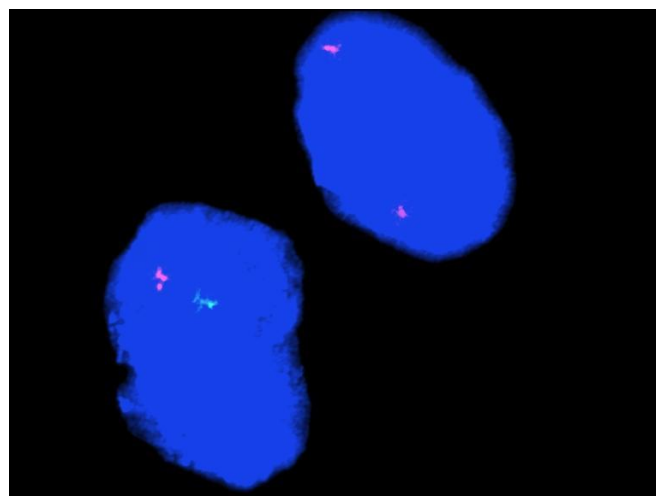


Figura 12 Fotografia al microscopio a fluorescenza che mostra le MSCs XX ed XY del paziente 1

Al paziente 5, femmina (XX), sono stati effettuati i prelievi previsti nei primi 12 mesi dopo il trapianto, ma solo uno ha permesso di ottenere MSCs analizzabili. Sono stati inoltre eseguiti 2 prelievi nei due anni successivi ed in tutti e tre i casi si sono ottenute MSCs del ricevente.

Al paziente 6, maschio (XY), è stato possibile effettuare non solo i prelievi previsti durante i primi 12 mesi post-trapianto, ma anche uno a 25 mesi, mostrando sempre un'assenza di MSCs del donatore, quindi MSCs 100% XY. Al secondo e al terzo prelievo in tale paziente si osservava la comparsa di un clone tetraploide XXYY, che inizialmente rappresentava l'8% e poi al successivo prelievo si è ridotto al 3% (Fig.13).

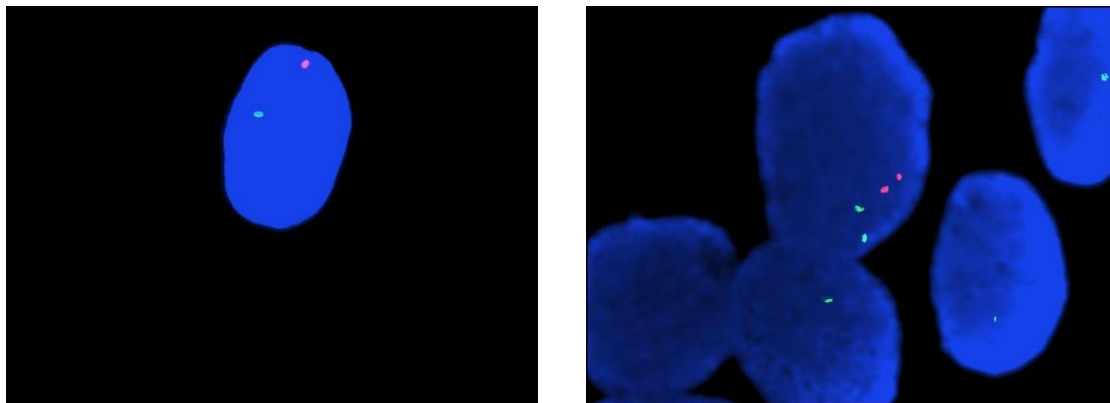


Figura 13 A destra MSCs XY, a sinistra si può notare una MSCstetraploide XXYY

In realtà la comparsa di cloni poliploidi sembrerebbe essere una condizione frequente, infatti nel 29% dei prelievi (8/28) l'analisi FISH ha evidenziato in una piccola percentuale di MSCs (3-8%) la presenza di pattern di ibridazione anomali e variabili (3G30, 4G40) a carico della sonda testata; tali patterns di ibridizzazione sembrerebbero suggerire un assetto cromosomico poliploide a carico delle MSCs dei pazienti esaminati.

Nel paziente 9 è stato possibile analizzare 3 prelievi durante il primo anno e un quarto prelievo effettuato a circa 20 mesi post-trapianto. Nelle quattro colture le cellule MSCs mostravano un pattern di ibridazione compatibile con le cellule del ricevente.

Del paziente 10 è stato possibile analizzare una prima coltura di MSCs isolate dal midollo a due mesi dal trapianto e una a 10 mesi, mostrando in entrambi i casi un pattern di ibridazione compatibile con le cellule del ricevente.

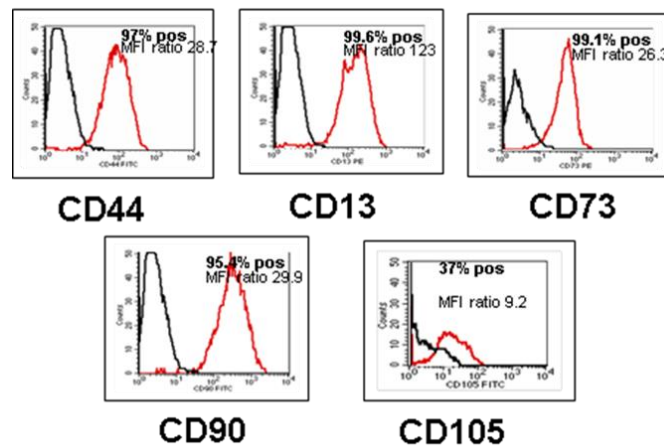
I risultati ottenuti dalla FISH delle sole MSCs sono riassunti più in dettaglio nella tabella seguente (Tab. 4).

PAZIENTE	N° prelievi	Time point (mesi)	Risultato FISH MSCs
Paziente 1 ♂	3	I prelievo	70% XY – 30%XX
		II prelievo	94%XY – 6% XXYY
		II prelievo	97%XY – 3% XXYY
Paziente 2 ♂	3	I prelievo	98% XY – 2% XXYY
		II prelievo	100% XY
		III prelievo	100% XY
Paziente 3 ♂	2	I prelievo	95% XY – 5% XXYY
		II prelievo	100% XY
Paziente 4 ♀	2	I prelievo	100% XX
		II prelievo	100% XX
Paziente 5 ♀	3	I prelievo	100% XX
		II prelievo	100% XX
		III prelievo	96%XX - 4%XXXX
Paziente 6 ♂	6	I prelievo	100% XY
		II prelievo	92% XY – 8% XXYY
		III prelievo	97% XY – 3% XXYY
		IV prelievo	100% XY
		V prelievo	100% XY
		VI prelievo	100% XY
Paziente 7 ♂	2	I prelievo	99% XY – 1% XX
		II prelievo	96.5% XY – 1.5% XX 2% XXYY
Paziente 8 ♀	1	I prelievo	95%XX – 5% XXXX
Paziente 9	4	I prelievo	100% XY
		II prelievo	100% XY
		III prelievo	100% XY
		IV prelievo	100% XY
Paziente 10 ♂	2	I prelievo	100% XY
		II prelievo	100% XY

Tabella 4 Nella prima colonna sono riportati i pazienti ed il sesso indicato come XY (maschio) e XY (femmina), nella seconda colonna il numero di prelievi ed i mesi corrispondenti nella terza. Nella quarta colonna i risultati della FISH delle MSCs.

6.3 MSCs: Analisi citofluorimetrica

Come descritto in precedenza, una volta raggiunta la confluenza le MSCs sono state sottoposte a tripsinizzazione. Una parte delle cellule “staccate”, qualora sia stato possibile ottenere un numero sufficiente di MSCs, è stata sottoposta all’analisi citofluorimetrica ed i risultati ottenuti dai 10 pazienti sono mostrati nella tabella 5. L’analisi effettuata ha messo in evidenza che le MSCs di tutti i pazienti mostravano i tipici marker stromali.



Paziente	T-point	CD44	CD33	CD34	CD45	CD90	CD105	CD146	CD75	VEGFR2	CD49D	CD14
1		+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
2		+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
3		+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
4		+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
5		+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
6		+	-	--	-	+	+	+	+	-	-	-
7		+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
8		+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
9		+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
10		+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-

Tabella 5: Caratterizzazione fenotipica delle MSCs dei 10 pazienti

7. Discussione

Diversi studi hanno mostrato come le MSCs abbiano la capacità di generare diversi tessuti, quali il tessuto muscolare, epatico, neuronale, endoteliale, rendendo così tali cellule particolarmente interessanti per il loro eventuale uso terapeutico. Modelli animali hanno dimostrato che le MSCs non solo hanno la capacità di impiantarsi nel midollo osseo ma anche di facilitare, mediante la produzione di citochine, l'attecchimento ed il recupero delle HSCs rimane ancora materia di dibattito⁷². Purtroppo però la validità di queste osservazioni e la loro interpretazione è ancora oggi estremamente controversa, poiché nei rari lavori presenti in letteratura è stato dimostrato che l'attecchimento delle MSCs del donatore nel midollo del ricevente, in seguito a trapianto allogenico, è un evento piuttosto sporadico⁷²⁻⁷⁴. Questi studi sono stati per lo più effettuati su trapianti da donatore HLA compatibile, familiare e non familiare, oppure con selezione positiva di CD34. Abbiamo quindi voluto valutare se la capacità di attecchimento delle cellule mesenchimali cambi nei trapianti aploidentici sottoposti a deplezione selettiva per il recettore $\alpha\beta$.

Nel mio lavoro di dottorato sono stati valutati 8 pazienti sottoposti a trapianto aploidentico con T-deplezione sia $\alpha\beta$ /CD19 e 1 CD3/CD19. L'analisi FISH ha mostrato MSCs appartenenti per il 100% al ricevente, ad eccezione del paziente 1 che al primo prelievo presentava il 30% delle MSCs del donatore, e del paziente 7 che al primo e al secondo prelievo mostrava rispettivamente l'1% e l'1.5% di MSCs del donatore. Nel paziente 1 tuttavia i prelievi successivi non hanno più mostrato alcuna evidenza di chimerismo misto delle MSCs. Una possibile spiegazione della presenza di queste cellule nel prelievo iniziale potrebbe essere fornita da un'eventuale contaminazione di cellule emopoietiche del donatore. Infatti la deplezione di monociti/macrofagi rappresenta un punto critico dello studio, come emerge anche dalla letteratura⁷², poiché tali cellule sono nella maggior parte dei casi responsabili di falsi positivi. Quello che abbiamo osservato è che la tripsinizzazione talvolta non è sufficiente all'eliminazione completa delle HSCs, soprattutto perché i macrofagi aderiscono precocemente e possono diventare parte integrate dello strato stromale. Questi, generalmente, dopo alcuni

passaggi tendono a non aderire nuovamente alla fiasca. Tuttavia l'eccessiva espansione delle cellule in coltura potrebbe determinare l'insorgenza di alterazioni a carico delle MSCs. Per tale motivo, le nostre colture sono state limitate a solo 1-2 passaggi di espansione. Per evitare, dunque, di falsare i risultati si può puntare, durante l'analisi dei vetrini al microscopio a fluorescenza in seguito a FISH, su un'attenta osservazione morfologica. In effetti la contro-colorazione col DAPI mostra i nuclei delle cellule emopoietiche con una colorazione molto più compatta rispetto a quelli delle MSCs; inoltre il nucleo stesso delle MSCs appare di dimensioni notevolmente maggiori rispetto a quello delle HSCs, oltre ad avere una forma allungata e non rotondeggiante come quella delle HSCs (Fig 14).

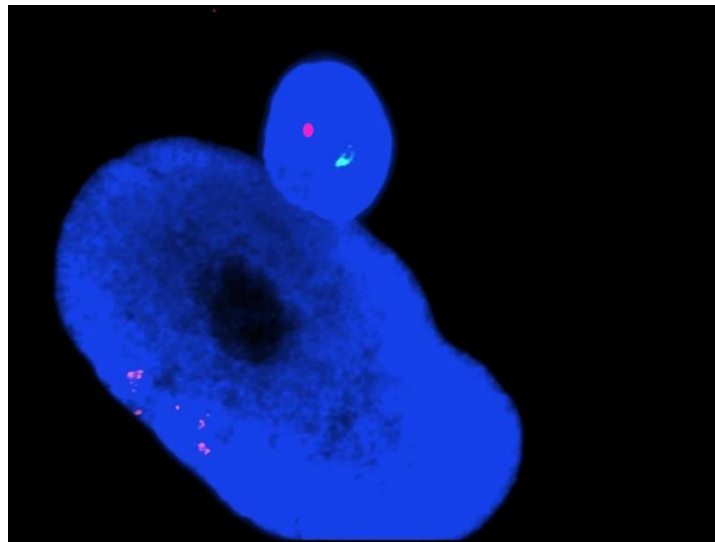


Figura 14 Fotografia che mostra come appare una cellula emopoietica (in alto) ed una MSCsal microscopio a fluorescenza in seguito a FISH

Riguardo al paziente 7 non è stato più possibile valutare l'eventuale reale attecchimento delle MSCs del donatore nei prelievi successivi, essendo deceduto in seguito ad infezione.

Anche nel paziente 9, al quale è stato effettuato un trapianto di midollo da familiare HLA-compatibile, non sono state rinvenute MSCs del donatore, risultato in linea con quelli che sono i dati della letteratura che evidenziano come non ci siano evidenze di un maggior numero di MSCs quando la sorgente del graft è il midollo rispetto alle PBSCs.

Infine, anche il paziente 10, sottoposto a trapianto con condizionamento non mieloablativo con successiva reinfusione di cellule staminali sottoposte a T-deplezione CD3/CD19 e Ciclofosfamide post-trapianto, ha mostrato la sola presenza di MSCs del ricevente.

I nostri risultati sembrano essere in accordo con quelli ottenuti da due studi presenti in letteratura^{73,74}, il cui il reale obiettivo era quello di indagare se le HSCs potessero differenziarsi in MSCs del microambiente midollare. Tale concetto si inseriva nell'ambito del più ampio discorso della plasticità della cellula staminale emopoietica, ovvero nella capacità di tale cellula di generare vari tessuti (muscolare, epatico, nervoso, endoteliale) con implicazioni terapeutiche importanti. In entrambi i lavori in quasi tutti i soggetti sottoposti a trapianto allogenico sex-mismatched le MSCs erano di origine del ricevente. Unica eccezione, nel lavoro di Rieger et al., riguarda una paziente donna in cui si osservava una bassissima percentuale di cellule del donatore (1%). In questo caso particolare si è pensato ad una possibile contaminazione di cellule emopoietiche, oppure al fatto che tale paziente solo due anni prima dal trapianto avesse partorito due gemelli maschi; dunque si è ipotizzato che tali MSCs potessero essere dei figli. Infatti recentemente è stato dimostrato che le MSCs fetali possono essere isolate nel sangue materno nel primo trimestre di gravidanza.

In un altro studio, condotto da Cilloni et al., si sono ottenuti risultati diversi: sono stati arruolati 41 pazienti sottoposti a trapianto aploidentico T-depleto; la fonte di HSCs era sia midollo (n = 5), sia PBSCs (n =1), sia midollo e PBSCs (N= 8). Per dimostrare l'origine delle MSCs è stata usata l'analisi PCR valutando il gene HUMARA per i pazienti maschi e il gene amelogenina per le pazienti femmine. Infine i risultati sono stati verificati con analisi FISH soltanto in 4 pazienti. In realtà l'analisi in PCR è stata condotta solo su 14 pazienti (34%) dato che solo tali campioni hanno raggiunto la confluenza; nei 27 casi restanti si osservava una crescita alterata dello strato stromale. Tale fenomeno, dai dati riportati in letteratura, appare piuttosto frequente. In definitiva, nel 50% dei pazienti analizzati è stato riscontrato un chimerismo misto a livello delle MSCs⁷², anche se bisogna sottolineare che nella maggior parte dei pazienti (72%) è stata effettuata una

sola analisi su un unico prelievo di sangue midollare, senza nessun controllo successivo. Come abbiamo già affermato precedentemente, nel nostro studio uno dei pazienti (Pz.1) aveva mostrato un chimerismo misto al primo prelievo, chimerismo non più confermato nei prelievi successivi. Possiamo quindi affermare come sia importante analizzare più prelievi per paziente; infatti nel nostro studio abbiamo effettuato il maggior numero di controlli possibili, dapprima nei primi mesi dopo il trapianto, successivamente a 12/24 mesi col procedere del follow-up.

In un altro lavoro presente in letteratura è stata dimostrata la presenza di MSCs del donatore nel midollo, nella milza e nel fegato del ricevente, anche se soltanto in due pazienti, poi deceduti per infezione fungina⁷⁵.

Diverse sono le ipotesi proposte per spiegare la mancanza di attecchimento delle MSC:

- 1) differenti metodiche trapiantologiche usate⁷²;
- 2) effetto della GvHD, complicazione del trapianto allogenico HLA-incompatibile non T-depleto, caratterizzata dalla produzione di citochine che potrebbero regolare negativamente l'homing e/o la proliferazione delle MSCs⁷²;
- 3) alto regime di condizionamento usato (che potrebbe danneggiare il potenziale proliferativo e differenziativo delle MSCs)⁷²;
- 4) impossibilità da parte delle cellule MSCs di attraversare il filtro polmonare⁷⁶.

Riguardo la prima ipotesi potremmo affermare che l'attecchimento delle MSCs del donatore non sembra essere influenzato dal tipo di trapianto effettuato. I nostri pazienti sono stati sottoposti a due innovative metodologie trapiantologiche (entrambe eseguite solo nell'Unità Operativa di Ematologia e CTMO dell'Ospedale Maggiore di Parma), che vanno a completare quelli che sono i dati della letteratura su altre tipologie di trapianto:

-T-deplezione $\alpha\beta$ /CD19 post condizionamento mieloablativo con treosulfano, tiotepa e fludarabina;

-T-deplezione CD3/CD19 post condizionamento ad intensità ridotta (fludarabina e total body irradiation a 3 Gy) e conciclofosfamide ad alte dosi post-trapianto.

In entrambi i subset i risultati osservati sono sovrapponibili ai dati ottenuti dagli scarsi trials clinici presenti in letteratura, in cui sono stati impiegati metodi di trapianto convenzionale. Anche nel nostro studio l'unico paziente (Pz.9) che ha ricevuto un trapianto convenzionale non ha mostrato risultati differenti in termini di attecchimento di MSCs del donatore.

Potremmo inoltre affermare che nei nostri pazienti il mancato attecchimento delle MSCs del donatore non dipenda dalla GvHD, in quanto essi, avendo ricevuto un inoculo T-depleto $\alpha\beta/CD19$, non hanno sperimentato questa complicanza post trapianto. L'insorgenza della GVHD è stata inoltre prevenuta anche nel trapianto del paziente 10, grazie all'utilizzo della ciclofosfamide post trapianto.

Per quanto riguarda la quarta ipotesi, Fischer e collaboratori (2009) hanno messo in evidenza che le dimensioni cellulari, insieme alle molecole di adesione espresse sulla superficie delle MSCs, sarebbero caratteristiche cruciali per il passaggio attraverso il filtro polmonare dopo infusione endovenosa delle stesse⁷⁶. Questa ipotesi è basata su uno studio effettuato da Scherepfer e collaboratori (2007), i quali hanno mostrato che microsfele di 4-5 μm sono in grado di attraversare il filtro polmonare, mentre altre di 20 μm , simili in dimensione alle MSCs (19-20 μm), venivano bloccate dal filtro⁷⁷. Tornando al lavoro di Fischer, gli autori sostenevano, inoltre, che le P-selettine erano coinvolte nell'adesione e nella extravasazione delle MSCs. Questo dato è stato precedentemente supportato da Ruster e collaboratori i quali hanno dimostrato che le MSCs interagivano con le cellule endoteliali in modo coordinato, coinvolgendo sia le P-selettine che le VCAM-1/VLA-4, impedendone quindi il passaggio attraverso il filtro polmonare.

E' interessante osservare anche che alcuni autori suggeriscono una differenziazione delle MSCs in HSCs e ciò potrebbe quindi spiegare la mancanza di cellule stromali nel midollo del ricevente⁷⁸.

Un altro studio interessante è quello di Pozzi et al., dove si dimostra che il midollo di pazienti pediatrici sembrerebbe essere particolarmente favorevole all'attecchimento delle MSCs rispetto al midollo degli adulti. Questo studio dimostra inoltre che le MSCs

sono in grado di attecchire anche se provenienti da sangue ombelicale crioconservato. In particolare è emerso che le MSCs provenienti da sangue ombelicale, sebbene numericamente inferiori rispetto al compartimento midollare, hanno una maggiore capacità di attecchimento, capacità che non viene abrogata dalle tecniche di crioconservazione⁷⁹.

Infine un altro studio rilevante è quello condotto da Ning et al., in cui si valuta più che l'origine delle MSCs, i loro effetti in seguito al co-trapianto delle stesse con le HSCs. Lo studio infatti è stato condotto su due gruppi di pazienti randomizzati in cui un gruppo è stato sottoposto ad infusione con MSCs ed un altro, invece, è stato infuso con le sole HSCs. Particolarmente interessanti sono i risultati ottenuti e, nello specifico, la scoperta più sorprendente è che il gruppo a cui erano state infuse MSCs presentava una maggiore frequenza di recidiva (60% gruppo con MSCs vs 20% gruppo No MSCs). Anche il tempo di comparsa della recidiva era diverso; infatti il gruppo con MSCs andava incontro precocemente alla ricomparsa della malattia rispetto all'altro gruppo. Inoltre anche la percentuale di soggetti che sopravviveva a tre anni dal trapianto era nettamente maggiore nel gruppo No-MSCs rispetto a quello con MSCs. Altro aspetto importante che emerge è che nel gruppo con MSCs la percentuale di soggetti affetti da GvHD era piuttosto bassa (26.7%). Tutto ciò dipende dall'azione inibente che le MSCs esercitano sui linfociti T, fenomeno che porta ad una prevenzione della GVHD ma contestualmente anche una inibizione dell'effetto GvL. L'inibizione della GvL spiegherebbe la maggiore incidenza di recidiva nel gruppo con MSCs mentre l'inibizione della GvHD spiegherebbe il motivo per il quale ben il 73.3% dei pazienti infusi con le sole HSCs andavano incontro a tale complicanza contrariamente al gruppo in cui erano state infuse MSCs. Nonostante ciò però non c'è ancora nessuna indicazione che possa dimostrare l'inibizione selettiva da parte delle cellule stromali della GvHD e non della GvL.

Per quanto detto sinora, le MSCs sembrerebbero a tutti gli effetti un'arma a doppio taglio, in quanto possono prevenire la GvHD, ma al tempo stesso possono favorire la comparsa di recidiva, bloccando la GvL.

In effetti tali risultati sono concordi con studi precedenti, in cui viene mostrato che le cellule stromali sono in grado non solo di inibire l'azione dei linfociti T allogenici, ma anche di bloccare la loro proliferazione mediante interazioni cellula-cellula e tramite fattori solubili, favorendo così la progressione del tumore⁸⁰.

E' stato dimostrato che le MSCs presentano un comportamento diverso *in vitro* e *in vivo*. Infatti sebbene *in vitro* le MSCs bloccano reversibilmente nella fase G1 del ciclo cellulare le cellule tumorali di origine emopoietica e non, in esperimenti eseguiti su topi NOD/SCID, l'infusione di cellule tumorali arricchite con MSCs sembra determinare una veloce progressione del tumore rispetto al gruppo in cui venivano infuse solo cellule tumorali. Gli autori quindi propongono che le MSCs siano in grado di preservare l'auto-rinnovamento delle cellule tumorali, fenomeno che secondo questi studiosi rappresenterebbe il meccanismo attraverso il quale il microambiente midollare influenza il corso delle malattie ematologiche⁸¹.

Tutto ciò si ricollega ad un altro concetto importante: che il microambiente midollare sia la chiave determinante nello sviluppo delle neoplasie emopoietiche è attualmente una ipotesi ben accreditata, tuttavia non è ancora chiaro se questo ruolo del microambiente midollare sia supportato da alterazioni genomiche delle MSCs, che possano coevolvere durante la leucemogenesi. Gli studi condotti fino ad oggi sono pochi ed inoltre hanno mostrato risultati discordanti⁸²⁻⁸⁵. Precedentemente, nel laboratorio di citogenetica, in cui ho svolto il mio lavoro di dottorato, durante il lavoro di tesi magistrale, ho svolto uno studio dal punto di vista citogenetico riguardante MSCs di 15 pazienti affetti da MDS. L'analisi mediante citogenetica convenzionale e FISH delle MSCs non ha mostrato la presenza di anomalie cromosomiche strutturali, ma soltanto la presenza di poliploidie, che per altro sono emerse anche frequentemente nei campioni esaminati in questo studio. Infatti nel 29% dei prelievi (8/28) l'analisi FISH ha evidenziato in una piccola percentuale di MSCs (3/8%) la presenza di pattern di ibridazione anomali e variabili (3G30, 4G40) a carico della sonda testata. Questi assetti cromosomici non sembrano essere rappresentativi di reali cloni anomali delle MSCs, essendo presenti in una bassa

percentuale di cellule per ciascun paziente. Si presuppone quindi che tale evento rifletta un fenomeno in vitro indotto dall'espansione cellulare.

Comprendere il ruolo dei difetti genetici primari delle cellule stromali nella patogenesi delle malattie ematologiche è essenziale. Infatti, nei pazienti affetti da malattie ematologiche sottoposti a HSCT, sarebbe estremamente importante dimostrare la presenza di alterazioni a carico delle MSCs di origine del donatore, qualora presenti.

8. CONCLUSIONI

In questo lavoro abbiamo dimostrato che nei nostri pazienti, sottoposti a trapianto aploidentico T-depleto $\alpha\beta$ /CD19, T-depleto CD3/CD19 e Allo-HSCT MRD, l'attecchimento delle MSCs del donatore è un evento estremamente raro, sia nelle prime fasi post trapianto che a distanza di anni. Le MSCs sembrerebbero avere una limitata capacità di ricostituzione del microambiente midollare. Ciò suggerisce che il trapianto di HSCs potrebbe essere associato alla generazione *ex vivo* e successivamente all'infusione di MSCs nei pazienti. Comunque è estremamente importante eseguire altri studi che vadano a valutare l'effetto delle MSCs cotrapiantate perché, come sostenuto da Ning e collaboratori, le MSCs potrebbero rappresentare un'arma a doppio taglio.

Inoltre dimostrare l'attecchimento delle MSCs del donatore nel midollo del ricevente avrebbe un impatto importante soprattutto nelle malattie ematologiche in cui il microambiente midollare alterato è coinvolto nel processo di leucemogenesi; in questi pazienti infatti, la ricostituzione del microambiente midollare, dovuta alla sostituzione delle MSCs alterate del ricevente con le MSCs del donatore, eviterebbe la comparsa di recidiva.

Ci poniamo come obiettivi futuri:

- 1) Aumentare la casistica e, soprattutto, il numero di prelievi per paziente, distribuiti in un arco di tempo il più ampio possibile, considerando che la comparsa del

chimerismo, ovvero l'attecchimento delle MSCs del donatore, può avvenire anche a distanza di anni.

- 2) Comprendere se le MSCs del donatore, qualora fossero effettivamente presenti nel ricevente, possano selettivamente avere un impatto su GvHD e suGvL.

9. Bibliografia

1. Lemoli RM DA. Hematopoietic stem cell mobilization. *Haematologica*. 2008;93(3):321-324.
2. Rizzoli V L V. Trapianto di cellule staminali emopoietiche. *Castoldi G, Liso V, Ed Mal del sangue e degli organi ematopoietici 5.a ed Milano McGraw-Hill Co.* 2007:641-654.
3. Schoemans H, Theunissen K, Maertens J, Boogaerts M, Verfaillie C, Wagner J. Adult umbilical cord blood transplantation: a comprehensive review. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38(2):83-93. doi:10.1038/sj.bmt.1705403.
4. Gahrton G, Iacobelli S, Bandini G, et al. Peripheral blood or bone marrow cells in reduced-intensity or myeloablative conditioning allogeneic HLA identical sibling donor transplantation for multiple myeloma. *Haematologica*. 2007;92(11):1513-1518. doi:10.3324/haematol.11353.
5. Aversa F. Hematopoietic stem cell transplantation from full-haplotype mismatched donors. *Transfus Apher Sci*. 2002;27(2):175-181. doi:10.1016/S1473-0502(02)00040-X.
6. Ohlstein B, Kai T, Decotto E, Spradling A. The stem cell niche: Theme and variations. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(6):693-699. doi:10.1016/j.ceb.2004.09.003.
7. Ramakrishnan A, Deeg HJ. A novel role for the marrow microenvironment in initiating and sustaining hematopoietic disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(1):21-28. doi:10.1517/14712590802603093.
8. ES R. Hereditary anemias of the mouse: review for geneticists. *Adv Genet*. 1979;20:274-283.
9. Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, et al. Wnt Signaling in the Niche Enforces Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Is Necessary to Preserve Self-Renewal In Vivo. *Cell Stem Cell*. 2008;2(3):274-283. doi:10.1016/j.stem.2008.01.003.
10. Martini F. H., Timmons M. J. TRB. *Anatomia Umana*. Edises s. r. (Cocco L., Manzoli L. ZG, ed.); 2004.
11. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell*. 2007;131(2):324-336. doi:10.1016/j.cell.2007.08.025.
12. Young B., Lowe J.S., Stevens A., Heath J. W. *Istologia E Anatomia Micoscopica*. ed Elsevie. (O C per l'edizione italiana C, ed.); 2001.
13. Kiel MJ, Yilmaz OH IT et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2007;121:1009-1121.
14. Morrison SJ, Spradling AC. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell*. 2008;132(4):598-611. doi:10.1016/j.cell.2008.01.038.
15. Dührsen U, Hossfeld DK. Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. *Ann Hematol*. 1996;73(2):53-70. doi:10.1007/s002770050203.
16. Podar K, Richardson PG, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC. The malignant clone and the bone-marrow environment. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(4):597-612. doi:10.1016/j.beha.2007.08.002.
17. Bhatia R, McGlave PB, Dewald GW, Blazar BR, Verfaillie CM. Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. *Blood*. 1995;85(12):3636-3645. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7780147>.
18. Rupec RA, Jundt F, Rebholz B, et al. Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking IκBα. *Immunity*. 2005;22(4):479-491. doi:10.1016/j.immuni.2005.02.009.
19. Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, Orkin SH. Rb Regulates Interactions between

- Hematopoietic Stem Cells and Their Bone Marrow Microenvironment. *Cell*. 2007;129(6):1081-1095. doi:10.1016/j.cell.2007.03.055.
20. Blau O, Hofmann W-K, Baldus CD, et al. Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp Hematol*. 2007;35(2):221-229. doi:10.1016/j.exphem.2006.10.012.
 21. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Flores-Guzman P et al. Cells, Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem. *Leuk Res*. 2008;32:1407-1416.
 22. Lopez-Villar O, Garcia JL, Sanchez-Guijo FM, et al. Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q-syndrome. *Leukemia*. 2009;23(4):664-672. doi:10.1038/leu.2008.361.
 23. Till JE ME. Repair processes in irradiated mouse hematopoietic tissue. *Ann N Y Acad Sci*. 1964;31:115-125.
 24. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK LK. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393-403.
 25. Al. C. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-650.
 26. Johnson A DK. Stromal cells in myeloid and lymphoid long-term bone marrow cultures can support multiple hemopoietic lineages and modulate their production of hemopoietic growth factors. *Blood*. 1986;68(6):1348-1354.
 27. Pittenger M, Mackay A, Beck S, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (80-)*. 1999;284(5411):143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143.
 28. Iyyanki T, Hubenak J, Liu J, Chang EI, Beahm EK, Zhang Q. Harvesting technique affects adipose-derived stem cell yield. *Aesthetic Surg J*. 2015;35(4):467-476. doi:10.1093/asj/sju055.
 29. Payumo FC, Kim HD, Sherling MA, et al. Tissue engineering skeletal muscle for orthopaedic applications. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;(403 Suppl):S228-42. doi:10.1097/01.blo.0000031992.92980.6f.
 30. Khan WS, Hardingham TE. The characterisation of mesenchymal stem cells: a stem cell is not a stem cell is not a stem cell. *J Stem Cells*. 2012;7(2):87-95. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23550347.
 31. Verdi J, Tan A, Shoaie-Hassani A, Seifalian AM. Endometrial stem cells in regenerative medicine. *J Biol Eng*. 2014;8(1):20. doi:10.1186/1754-1611-8-20.
 32. Leonardi E, Ciapetti G, Baglio SR, Devescovi V, Baldini N, Granchi D. Osteogenic properties of late adherent subpopulations of human bone marrow stromal cells. *Histochem Cell Biol*. 2009;132(5):547-557. doi:10.1007/s00418-009-0633-x.
 33. Zhang ZL, Tong J, Lu RN, Scutt AM, Goltzman D, Miao DS. Therapeutic potential of non-adherent BM-derived mesenchymal stem cells in tissue regeneration. *Bone Marrow Transpl*. 2009;43(1):69-81. doi:10.1038/bmt.2008.260.
 34. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905.
 35. Bahat-Stroomza M, Barhum Y, Levy YS, et al. Induction of adult human bone marrow mesenchymal stromal cells into functional astrocyte-like cells: potential for restorative treatment in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci*. 2009;39(1-2):199-210. doi:10.1007/s12031-008-9166-3.

36. Chen L, He D-M, Zhang Y. The differentiation of human placenta-derived mesenchymal stem cells into dopaminergic cells in vitro. *Cell Mol Biol Lett*. 2009;14(3):528-536. doi:10.2478/s11658-009-0015-3.
37. Banas A. Purification of adipose tissue mesenchymal stem cells and differentiation toward hepatic-like cells. *Methods Mol Biol*. 2012;826:61-72. doi:10.1007/978-1-61779-468-1_6.
38. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2008;26(9):2287-2299. doi:10.1634/stemcells.2007-1122.
39. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425(6960):841-846. doi:10.1038/nature02040.
40. Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res*. 1992;(275):287-299. doi:10.1097/00003086-199202000-00043.
41. Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301-313. doi:10.1016/j.stem.2008.07.003.
42. Méndez-Ferrer S, Michurina T V., Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-834. doi:10.1038/nature09262.
43. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*. 2001;294(5548):1933-1936. doi:10.1126/science.1064081.
44. Muraglia a, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 7:1161-1166. doi:10.1006/excr.1999.4592.
45. Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*. 2004;22(5):675-682. doi:10.1634/stemcells.22-5-675.
46. Redaelli S, Bentivegna A, Foudah D, et al. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of in vitro cultured human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2012;3(6):47. doi:10.1186/scrt138.
47. Wagner W, Horn P, Castoldi M, et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process. *PLoS One*. 2008;3(5). doi:10.1371/journal.pone.0002213.
48. Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol*. 2008;36(9):1176-1185. doi:10.1016/j.exphem.2008.03.019.
49. Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells: Choice of Serum Is a Determinant of Cell Proliferation, Differentiation, Gene Expression, and Transcriptome Stability. *Stem Cells*. 2005;23(9):1357-1366. doi:10.1634/stemcells.2005-0094.
50. Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2000;7(6):358-363. doi:10.1097/00062752-200011000-00007.
51. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2007;21(8):1733-1738. doi:10.1038/sj.leu.2404777.
52. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R FW. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+ -derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*.

2006;15(177(4)):2080-2087.

53. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367-372. doi:2005-07-2657 [pii]r10.1182/blood-2005-07-2657.
54. Mattar P, Bieback K. Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells. *Front Immunol*. 2015;6(NOV). doi:10.3389/fimmu.2015.00560.
55. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(4):34-43. doi:10.1186/scrt75.
56. Rameshwar P. IFN γ and B7-H1 in the immunology of mesenchymal stem cells. *Cell Res*. 2008;18(8):805-806. doi:10.1038/cr.2008.90.
57. Consentius C, Reinke P, Volk H-D. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: what has been seen *in vitro* and *in vivo* ? *Regen Med*. 2015;10(3):305-315. doi:10.2217/rme.15.14.
58. François M, Romieu-Mourez R, Stock-Martineau S, Boivin MN, Bramson JL, Galipeau J. Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Blood*. 2009;114(13):2632-2638. doi:10.1182/blood-2009-02-207795.
59. Baron F, Lechanteur C, Willems E, et al. Cotransplantation of Mesenchymal Stem Cells Might Prevent Death from Graft-versus-Host Disease (GVHD) without Abrogating Graft-versus-Tumor Effects after HLA-Mismatched Allogeneic Transplantation following Nonmyeloablative Conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(6):838-847. doi:10.1016/j.bbmt.2010.01.011.
60. Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*. 2011;60(6):788-798. doi:10.1136/gut.2010.214841.
61. Toubai T, Paczesny S, Shono Y, et al. Mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2009;4(4):252-259. doi:ABSTRACT # 08 [pii].
62. Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007;262(5):509-525. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01844.x.
63. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-1822. doi:10.1182/blood-2004-04-1559.
64. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: Central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009;113(26):6576-6583. doi:10.1182/blood-2009-02-203943.
65. Kaplan JM, Youd ME, Lodie T a. Immunomodulatory activity of mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2011;6(4):297-316. doi:10.2174/157488811797904353.
66. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal Stem Cells Inhibit and Stimulate Mixed Lymphocyte Cultures and Mitogenic Responses Independently of the Major Histocompatibility Complex. *Scand J Immunol*. 2003;57(1):11-20. doi:10.1046/j.1365-3083.2003.01176.x.
67. Ning H, Yang F, Jiang M, et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia*. 2008;22(3):593-599. doi:10.1038/sj.leu.2405090.
68. Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, et al. Long-term *in vitro* expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res*. 2008;68(11):4229-4238. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5272.

69. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res.* 2007;67(19):9142-9149. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4690.
70. Muschler G. F., Nitto, H. et al. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 2001;19:117-125.
71. Lawler SD, Baker MC, And HH, Morgenstern GR. Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow using the sex chromosomes as markers of cellular origin. *Br J Haematol.* 1984;56(3):431-443. doi:10.1111/j.1365-2141.1984.tb03973.x.
72. Cilloni D, Carlo-Stella C, Falzetti F, et al. Limited engraftment capacity of bone marrow-derived mesenchymal cells following T-cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2000;96(10):3637-3643.
73. Awaya N, Rupert K, Bryant E, Torok-Storb B. Failure of adult marrow-derived stem cells to generate marrow stroma after successful hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2002;30(8):937-942. doi:10.1016/S0301-472X(02)00821-4.
74. Rieger K, Marinets O, Fietz T, et al. Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Exp Hematol.* 2005;33(5):605-611. doi:10.1016/j.exphem.2005.02.004.
75. Meleshko A, Prakharenia I, Kletski S, Isaikina Y. Chimerism of allogeneic mesenchymal cells in bone marrow, liver, and spleen after mesenchymal stem cells infusion. *Pediatr Transplant.* 2013;17(8). doi:10.1111/petr.12168.
76. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, et al. Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery: The Pulmonary First-Pass Effect. *Stem Cells Dev.* 2009;18(5):683-692. doi:10.1089/scd.2008.0253.
77. Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem Cell Transplantation: The Lung Barrier. *Transplant Proc.* 2007;39(2):573-576. doi:10.1016/j.transproceed.2006.12.019.
78. Huss R, Hoy C a, Deeg HJ. Contact- and growth factor-dependent survival in a canine marrow-derived stromal cell line. *Blood.* 1995;85(9):2414-2421. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7537113>.
79. Pozzi S, Lisini D, Podesta M, et al. Donor multipotent mesenchymal stromal cells may engraft in pediatric patients given either cord blood or bone marrow transplantation. *Exp Hematol.* 2006;34(7):934-942. doi:10.1016/j.exphem.2006.03.007.
80. Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* 2003;101(9):3722-3729. doi:10.1182/blood-2002-07-2104.
81. Ramasamy R, Lam E-F, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia.* 2007;21:304-310. doi:10.1038/sj.leu.2404489.
82. 78) Awaya N, Rupter K BE et al. Marrow stromal cells are not derived from the malignant clone in myelodysplastic syndromes (MDS)". *Blood.* 2001;98.
83. Soenen V. KRBMLGMBJHVWFPTAC. Mesenchymal cells (MC) generated from patients with myelodysplastic syndromes (MDS) are devoid of cytogenetic abnormalities and support short and

long-term hematopoiesis in vitro. *Blood*. 2001;98(11 PART I):729a.

[http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-](http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-4243358820&partnerID=40&md5=45e85e86369149103952cdd4956085c1)

[4243358820&partnerID=40&md5=45e85e86369149103952cdd4956085c1](http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-4243358820&partnerID=40&md5=45e85e86369149103952cdd4956085c1).

84. Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutiérrez-Espíndola G, Pérez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: Phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk Res*. 2005;29(2):215-224. doi:10.1016/j.leukres.2004.06.011.
85. Blau O, Baldus CD, Hofmann W-K, et al. Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. *Blood*. 2011;118(20):5583-5592. doi:10.1182/blood-2011-03-343467.