



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina Veterinaria

Il potenziale terapeutico delle cellule stromali mesenchimali nella
terapia dei tumori: uno strumento innovativo per la medicina
veterinaria?

*The therapeutic potential of mesenchymal stromal cells in tumor therapy: an
innovative tool for veterinary medicine?*

Relatore:

Chiar.mo Prof. **Stefano Grolli**

Laureanda:

Valeria Arosio

Matricola n° 301964

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

INTRODUZIONE	9
PROPRIETA' BIOLOGICHE DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI	11
CAPITOLO 1 APPLICAZIONI CLINICHE DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI	17
FONTI DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI	17
TERAPIA DELLE LESIONI MUSCOLO-SCHELETRICHE NEL CAVALLO	18
UTILIZZI NEGLI ANIMALI DA COMPAGNIA: CANE E GATTO	20
<i>Osteoartrosi: gli studi nel cane</i>	20
<i>Degenerazione dei dischi intervertebrali nel cane</i>	22
<i>Fistole perianali nel cane</i>	23
<i>Inflammatory bowel disease (IBD)</i>	23
<i>Miocardiotipia dilatativa nel cane</i>	25
<i>Cheratocongiuntivite secca</i>	25
<i>Meningoencefalite granulomatosa infiammatorie</i>	26
<i>Insufficienza renale cronica nel gatto in fase finale</i>	27
CAPITOLO 2 TERAPIA CON MSCs AUTOLOGHE VS TERAPIA CON MSCs ALLOGENICHE	29
CAPITOLO 3 APPLICAZIONI DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI NELLA TERAPIA ONCOLOGICA	31
IL RAZIONALE BIOLOGICO DELL'USO TERAPEUTICO DELLE MSCs	32
<i>Ruolo nella rigenerazione tissutale e nella guarigione di ferite</i>	32
<i>Proprietà immunitarie</i>	32
<i>Immunità adattativa</i>	36
<i>Priming: ruolo dei toll-like receptors e grado infiammatorio</i>	36
<i>Esosomi derivati da MSCs</i>	37
<i>Il ruolo dell'interleuchina 6</i>	38
<i>Homing</i>	39
INTERFERENZE FRA MSCs E CELLULE TUMORALI	44
EFFETTI DEL MICROAMBIENTE TUMORALE SUL FENOTIPO DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI	45
CARATTERISTICHE DELLE CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI ASSOCIATE AL TUMORE (T-MSCs)	46
<i>Meccanismi di riprogrammazione</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
<i>Fattori del microambiente</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
MODIFICAZIONI EPIGENETICHE	52
CAPITOLO 4 UTILIZZO DELLE MSCs NELLA TERAPIA TUMORALE	54
INIBIZIONE DEGLI EFFETTI PRO TUMORALI DELLE MSCs	55
TRATTAMENTI DELLE FORME TUMORALI MEDIANTE MSCs	56

MSCs GENETICAMENTE INGEGNERIZZATE CON ATTIVITA' ANTI-TUMORALE	57
MSCs VEICOLANTI FARMACI ANTI-NEOPLASTICI	60
MICROVESICOLE DERIVATE DA MSCs: DEFINIZIONE ED APPLICAZIONI	61
<i>Caratteristiche biologiche delle vescicole extracellulari</i>	65
<i>Funzioni fisiologiche delle EVs derivate dalle MSC s nei tumori</i>	66
<i>Applicazioni delle EVs bioingegnerizzate derivate da MSCs</i>	71
L'UTILIZZO DI MSCs MODIFICATE GENETICAMENTE COME AGENTI ANTI-TUMORALI	73
TERAPIA ONCOLITICA CON VIRUS	74
<i>Virus utilizzabili per l'oncoterapia basata su MSCs</i>	77
<i>Utilizzo di viroterapia oncolitica in tumori spontanei di cane</i>	82
IMMUNOTERAPIA	87
<i>MSCs e sistema immunitario nei tumori</i>	89
CAPITOLO 5 LE PROBLEMATICHE ASSOCIATE ALLE TERAPIE ANTITUMORALI CON MSCs	91
TERAPIA CON ESOSOMI	91
<i>Facilitazione della crescita dei tumori e delle metastasi</i>	91
<i>Dormienza e induzione della chemioresistenza</i>	93
PROBLEMATICHE RELATIVE ALLE TERAPIE ANTI-TUMORALI CON VIRUS ONCOLITICI ASSOCIATI A MSCs	95
<i>Effetti sistemici della terapia oncovirale</i>	96
<i>Potenziiali limitazioni</i>	96
<i>Effetti distali del virus oncolitico inoculato localmente</i>	98
CONCLUSIONI	99
BIBLIOGRAFIA	101

GLOSSARIO

ACS (*Autologous Conditioned Serum*) - il siero condizionato autologo

ASCs (*Adipose derived Stromal Cells*) - cellule stromali mesenchimali da tessuto adiposo

AT-MSCs / Ad-MSCs (*Adipose derived Stem Cells*) - MSCs derivate dal tessuto adiposo

BM- MSCs (*Bone Marrow derived stem cells*) - MSCs derivate dal midollo osseo

BMS (*Bone Marrow Surnatant*) - surnatante preparato da midollo osseo

CAF (*Cancer Associated Fibroblasts*) - fibroblasti associati al cancro

CKD (*Chronic Kidney Disease*) - malattia renale cronica

NK (*Natural Killer cells*) - cellule natural killer

CSCs (*Cancer Stem Cells*) - cellule staminali del cancro

DCs (*Dendritic Cells*) - cellule dendritiche

DOX (*Doxorubicin*) - doxorubicina

ECM (*Extra-cellular Matrix*) - matrice extracellulare

EMT (*Epithelial-Mesenchymal Transition*) - transizione da tipologia epiteliale a mesenchimale

ESCs (*Embryonic Stem Cells*) - cellule staminali embrionali

EVs (*Extra-cellullar vescicles*) - vescicole extra-cellulari

FM-MSCs (*Fetal Membranes MSCs*) - cellule staminali derivate da membrane fetali

hAMSCs (*Human Adipose MSCs*) - cellule mesenchimali adipose umane

hBMSCs (*Human Bone Marrow MSCs*) - cellule staminali mesenchimali del midollo osseo umano

HIF (*Hypoxia Inducible Factors*) - fattori inducibili dell'ipossia

HLA I, HLA II (*Human Leukocyte Antigens*) - antigene leucocitario umano di classe I e di classe II

hUCMSCs (*Human Umbelical Cord MSCs*) - cellule staminali mesenchimali del cordone ombelicale umano

i-DC (*Immature Dendritic Cells*) - cellule dendritiche immature

Iniezione IA - iniezione intra-articolare

i-PSC (*Induced Pluripotent Stem Cells*) - cellule staminali pluripotenti indotte

LRS (*Lactate Ringer Solution*) - soluzione Ringer lattato

MCAO (*Middle Cerebral Artery Occlusion*) - ischemia dell'arteria cerebrale media

MCP (*Monocyte Chemoattractant Protein*) - proteina chemiotattica dei macrofagi

m-DC (*mature Dendritic Cells*) - cellule dendritiche mature

MenSCs (*Menstrual blood derived Stem Cells*) - cellule staminali mesenchimali isolate dal sangue mestruale

MHC (*Major Hystocompatibility Complex*) - complesso maggiore di istocompatibilità

MI (*Myocardial Infarction*) - infarto miocardico

MSC-EVs (*Extracellular derived MSCs*) - vescicole extracellulari derivate da MSCs

MSCs (*Mesenchimal Stem Cells*) - cellule mesenchimali staminali / stromali

MSCs-PTX (*Paclitaxel Loaded MSCs*) – MSCs caricate con PTX

N-MSCs (*Normal tissue MSCs*) - MSCs associate al tessuto normale

OA (*Osteoarthritis*) - osteoartrite

OAds (*Oncolytic Adenovirus*) - adenovirus oncolitici

OVs (*Oncolytic Virus*) - virus oncolitici

PBS (*Phosphatase Bufferd Saline*) - soluzione fisiologica salina tamponata

PRP (*Platelet-Rich Plasma*) - plasma ricco di piastrine

RNAi (*RNA interference*) - interferenza dell'RNA

rTRAIL (*Ricombinant TRAIL*) - TRAIL ricombinante

siRNA (*Short Interfering RNA*) - RNA interferente breve

TAFs (*Tumor Associated Fibroblasts*) - fibroblasti associati al tumore

TBI (*Total Body Irradiation*) - irradiazione totale del corpo

Tfs (*Transcription Factor*) - fattori di trascrizione

TH1 (*T-Helper Cells 1*) - cellule T Helper 1

TH2 (*T-Helper Cells 1*) - cellule T Helper 1

TLR (*Toll-Like Recepters*) - recettori Toll-Like

TME (*Tumor Microenvironment*) - microambiente tumorale

T-MSCs (*Tumor associated MSCs*) - MSCs associate al tumore

TRAIL (*Tumor Necrosis Factor-related apoptosis-inducing Ligand*) - fattore di necrosi tumorale

INTRODUZIONE

Le cellule stromali/staminali mesenchimali (MSCs, mesenchymal stromal/stem cells) sono definite come cellule adulte non specializzate capaci di differenziarsi, in seguito ad opportuni stimoli ambientali, in una delle molteplici e differenti tipologie cellulari di origine mesenchimale.

Le cellule staminali hanno due principali proprietà che le caratterizzano e distinguono da ogni altra tipologia: l'auto-rinnovamento e la capacità differenziativa. Per auto-rinnovamento si intende la capacità di compiere un indeterminato numero di cicli replicativi senza modificare il proprio stato di cellule indifferenziate. Questo processo può avvenire tramite due diversi processi di divisione cellulare: la prima definita "divisione asimmetrica obbligata", la seconda invece "differenziamento stocastico".

Secondo la prima modalità, una cellula staminale si divide generando una cellula identica alla cellula madre originale e una cellula "figlia" destinata alla differenziazione. Le due cellule hanno destino differente ricevendo, al momento della divisione, segnali interni differenti. In alternativa, stimoli esterni possono intervenire inducendo la differenziazione di una delle due cellule in base alla interazione con l'ambiente circostante. Secondo questa modalità di divisione asimmetrica sono fattori intrinseci od estrinseci alla cellula a determinare il diverso destino delle cellule figlie.

Nel differenziamento stocastico invece, da una staminale si ottengono due cellule figlie differenziate e in contemporanea un'altra staminale subisce mitosi, producendo due cellule staminali identiche all'originale.¹⁻⁵

Le diverse modalità di replicazione e differenziazione possono coesistere ed adattarsi alle necessità dei tessuti, permettendo e garantendo la conservazione della popolazione delle cellule staminali in funzione delle necessità dell'organismo.

La potenzialità differenziativa delle cellule staminali invece indica la capacità di queste cellule di dare origine a una o più linee cellulari diverse tramite il differenziamento. Nel caso specifico, le MSCs dimostrano pluripotenza, ossia la capacità di generare una varietà di tipi cellulari diversi, riferibili alla linea mesenchimale.

Le MSCs si ricavano sia da tessuti fetali quali la placenta, il liquido amniotico e il sangue del cordone ombelicale, sia da tessuti adulti quali il midollo osseo, il tessuto adiposo, il liquido sinoviale e il periostio, il derma, ed altri ancora. In pratica si ritiene che tutti i tessuti che hanno una componente stromale presentino una popolazione di MSCs.

La spiegazione di questa alta diffusione risiede nella probabile origine perivascolare delle cellule, per cui esiste una correlazione diretta tra la loro frequenza e la densità dei vasi sanguigni nei tessuti stromali.

Le prime ricerche relative alle MSCs risalgono agli anni 70, ad opera di A.J. Friedenstein⁶, che isolò una popolazione di cellule staminali derivate dallo stroma del midollo osseo e distinte dalle cellule staminali ematopoietiche. L'osservazione di una loro capacità differenziativa verso cellule di tipo mesenchimale (in primis osteoblasti e condroblasti), negli anni successivi ha spinto ad un attento studio sulle loro possibili applicazioni terapeutiche nelle patologie muscoloscheletriche.

Più recentemente gli studi su queste cellule hanno dimostrato una spiccata capacità di secernere una varietà di molecole bioattive, allargando il loro potenziale utilizzo a numerose altre patologie e facendo supporre un complesso ruolo biologico di queste cellule nel mantenimento dell'omeostasi dei tessuti.⁷⁻⁹

Attualmente anche la loro denominazione originale di "cellule staminali mesenchimali" è stata messa in discussione, privilegiando la denominazione di "cellule stromali mesenchimali". Questa nuova denominazione sottolinea più l'origine delle cellule che non le loro effettive capacità staminali, spesso messe in discussione nelle applicazioni terapeutiche.

La ricerca sulle MSCs negli ultimi anni ha evidenziato come queste cellule svolgano una serie di attività biologiche, non necessariamente legate al concetto di staminalità, che nell'insieme giustificano la notevole varietà di applicazioni cliniche in cui sono state proposte come agente terapeutico: a queste cellule sono riconosciute una spiccata capacità secretoria, anche attraverso la produzione di vescicole extracellulari, l'attività immunomodulante, la capacità migratoria, l'attività antibatterica. Nell'insieme, queste funzioni contribuiscono in modo complesso alla regolazione del mantenimento, del rinnovo e della guarigione dei tessuti.

La complessità di queste azioni ha recentemente indotto anche a valutare il comportamento di queste cellule nei confronti delle cellule tumorali e degli eventi associati alle patologie oncologiche.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è l'analisi della recente letteratura scientifica che analizza il possibile rapporto tra le funzioni biologiche delle MSCs, lo sviluppo dei tumori e le potenziali applicazioni terapeutiche di queste cellule nei confronti delle patologie tumorali.

PROPRIETA' BIOLOGICHE DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Le MSCs posseggono determinate proprietà che le rendono uniche rispetto alle altre popolazioni di cellule staminali: trofiche, anti-infiammatorie e immunomodulatorie, anti-apoptotiche e anti-microbiche.

PROPRIETA' TROFICHE

Le MSCs possono effettuare la secrezione di fattori di crescita e altre citochine per indurre la proliferazione cellulare e l'angiogenesi.

Questo è possibile grazie alla loro espressione di proteine mitogene e pro-differenziative come: il fattore di crescita TGF- α e TGF- β , il fattore di crescita degli epatociti (HGF), il fattore di crescita epiteliale (EGF), il fattore di crescita dei fibroblasti di base (FGF-2) e il fattore di crescita simile all'insulina-1 (IGF-1) che hanno effetto sulla replicazione cellulare sia dei fibroblasti, sia delle cellule epiteliali ed endoteliali e sul loro differenziamento.¹⁰⁻¹³

PROPRIETA' ANTI-INFIAMMATORIE ED IMMUNOMODULATORIE

In numerosi traumi muscolo-scheletrici, ma anche in patologie sistemiche o d'organo, le condizioni di infiammazione, se non controllate e risolte, impediscono il naturale processo di guarigione mediato dalle cellule progenitori locali mature.

Le MSCs contribuiscono alla riparazione e alla ricostituzione dell'omeostasi tissutale mediante meccanismi paracrini che, oltre a modulare la rigenerazione tramite la loro azione trofica, esplicano una azione di controllo sul processo infiammatorio mediante processi anti-infiammatori e immunomodulatori: in risposta a molecole infiammatorie come interleuchina 1 (IL-1), interleuchina 2 (IL-2), interleuchina 12 (IL-12), fattore di necrosi tumorale (TNF- α) e interferon gamma (INF- γ), rilasciano una serie di fattori di crescita e proteine anti-infiammatorie con un complesso sistema di feedback tra i vari tipi di cellule immunitarie.

La tabella in seguito riportata riassume i rapporti fondamentali che si instaurano tra MSCs e cellule del sistema immunitario, le molecole responsabili della interazione funzionale e gli effetti determinati sulle cellule.¹⁴⁻¹⁹

Target cell	Mechanism	Primary effect	Secondary effect
Dendritic cells	PGE2/direct contact	↓ TNF- α , IL-12, differentiation and activation	Impairs effect on resting NK cells ↓ T-cell proliferation
Immature Dendritic cells	PGE2, IL-6, IL-8 and SDF-1	↑ IL-10	↓ INF- γ by T _H 1 cells ^a
	PGE2	↑ IL-10	↑ IL-4 by T _H 2 cells ^a ↑ Treg production, ↑ IL-10 by Treg cells
T cells (CD4+, helper T cells)	PGE2, IDO, HGF, TGF- β 1 and NO	↓ CD4+ T-cell proliferation by S-phase entry block and G ₀ /G ₁ phase arrest Inhibits T-cell functions	↓ B-cell proliferation ↓ Ig antibody production by B cells
T cells (CD8+, cytotoxic T cells)	IL-10	Inactivate T _H 1 cells	
Treg cells	sHLA-G5	↓ cytotoxicity	
	IL-10	↑ Treg production ↑ IL-10 by Treg cells	
B cells	sHLA-G5	↓ Treg differentiation	
	PGE2, HGF, TGF- β 1, IDO, NO and PD-L1	↓ B-cell proliferation by G ₀ /G ₁ phase arrest ↓ Ig antibody production by B cells, ↓ B-cell chemotaxis	
NK cells	PGE2, IDO, sHLA-G5, HGF, TGF- β 1	↓ INF- γ ↓ NK cell proliferation ↓ cytotoxicity	
		↓ Monocyte proliferation by G ₀ /G ₁ phase arrest ↓ Monocyte difference to DC	
Monocytes	PGE2		
Macrophages	IL-6	↓ TNF- α	↓ TNF- α and IL-1
	TSG-6	↓ NF- κ B	↓ MMP synthesis
	PGE2	Converts M1 (pro-inflammatory) type to M2 (anti-inflammatory) type macrophages	↓ IL-10 ↓ IL-12 ↓ TNF- α
Neutrophils	IL-6	↓ respiratory burst ↓ apoptosis	
No specific target	VEGF	Pro-angiogenic	Increased nutrient, O ₂ and waste transport
	IL-1Ra	Antagonizes IL-1	
	sTNF-R	Inhibits TNF- α production	↓ T-cell proliferation, ↓ INF- γ by T _H 1 cells ^a

Tabella 1. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine, Matthew B Murphy, 2013²⁰

Le cellule staminali mesenchimali prevengono la proliferazione e l'attività di cellule infiammatorie immunitarie quali linfociti T, cellule natural killer (NK), linfociti B, monociti, macrofagi e cellule dendritiche.^{15,21,22}

In corso di infiammazioni croniche vi è il persistente disequilibrio tra tipologie delle cellule T helper e macrofagi.²³⁻²⁵ Le MSCs indirettamente promuovono la transizione delle cellule T helper 1 (TH1) in T helper 2 (TH2) mediante la riduzione dell'INF- γ e l'aumento di IL-4 e IL-10.^{14,26}

L'instaurazione dell'equilibrio TH1/TH2 permette di incrementare la rigenerazione tissutale nelle ferite cartilaginee, muscolari e di altri tessuti molli, alleviare i sintomi di una malattia auto-immunitaria e avere un effetto anti-diabetogeno.²⁷⁻³¹

In modo simile, la riduzione dell'interferone gamma e la secrezione dell'interleuchina 4 promuovono la trasformazione dei macrofagi M1 (pro-infiammatori, inibenti l'angiogenesi e la crescita tissutale) in macrofagi M2 (anti-infiammatori, favorenti il rimodellamento e la guarigione tissutale), permettendo così la rigenerazione e la riparazione nel corso di patologie scheletriche, muscolari e neurologiche.^{23,29,31-34}

Per evitare di esser riconosciute dal sistema immunitario, le MSCs esprimono livelli medio-bassi di antigene leucocitario umano di Classe I (HLA I) e livelli bassi di HLA di classe II, i quali sono un insieme di proteine di membrana che consente ai linfociti di riconoscere le cellule come proprie (self) oppure come estranee anche denominato MHC (complesso maggiore di istocompatibilità).^{35,36}

Questa proprietà è fondamentale nell'ipotetico caso di una terapia allogenica, in cui le cellule MSCs del donatore riescono a non esser rilevate dal sistema immunitario del ricevente, evitando così possibili rigetti e complicazioni legati al riconoscimento di tipi cellulari estranei.³⁷⁻⁴⁰

PROPRIETA' ANTI-APOPTOTICHE

In corso di esposizione ad agenti traumatici, ipossia, agenti chimici, pH estremi, danni meccanici e radiazioni, le cellule colpite innescano il processo di apoptosi, ovvero morte cellulare programmata, che se non controllato può essere causa del mantenimento e del progressivo aggravarsi della condizione patologica. Il controllo di questo processo di morte cellulare è in larga parte effettuato dalle MSCs, che sono in grado di interrompere il circolo negativo innescato dall'apoptosi.

Il meccanismo anti-apoptotico non è del tutto chiarito nei suoi aspetti molecolari, tuttavia son state identificate delle proteine chiave coinvolte nel processo: la secrezione di IGF-1 e IL-6 aumenta l'espressione della proteina chinasi B (Akt) e dell'NFκB.

Gli elevati livelli di Akt incrementano la secrezione della SFRP-1 (Secreted frizzled-related protein 1), un membro della via di trasduzione del segnale Wnt (acronimo dei geni omologhi wingless (wg) e Int-1 codificanti le glicoproteine secretorie, descritti rispettivamente nella mosca e nel topo) e un mediatore fondamentale per il processo di anti-apoptosi nei fibroblasti.^{16,41-44}

E' stato dimostrato poi che il fattore di crescita endoteliale (VEGF), il fattore di crescita epatocitario (HGF) e il fattore di crescita trasformante (TGF-β 1) hanno un ruolo nell'invertire la morte cellulare programmata delle cellule endoteliali.

Infine, nell'apoptosi indotta da ipossia, la produzione ed emissione del fattore di crescita endoteliale da parte delle MSCs sono notevolmente aumentati.⁴⁵

PROPRIETA' ANTI-MICROBICHE

La difesa immunitaria nativa contro infezioni microbiche include molecole effettori definite "polipeptidi antimicrobici", come lisozimi, lactoferrina, defensine e catelicidine.⁴⁶⁻⁴⁸ All'ultima famiglia elencata, appartiene il peptide Hcap-18/LL-37, il quale è comunemente secreto dalle cellule epiteliali e macrofagi per eliminare batteri Gram positivi e Gram negativi, ma viene espresso anche dalle MSCs, specialmente in corso di infezioni da Escherichia Coli. Questa scoperta portò a considerare le cellule mesenchimali staminali come un potente agente terapeutico per infezioni acute e sistemiche.⁴⁹⁻⁵⁴

I principali effetti trofici, immunomodulatori e anti-batterici delle MSCs sono illustrati nella seguente figura:²⁰

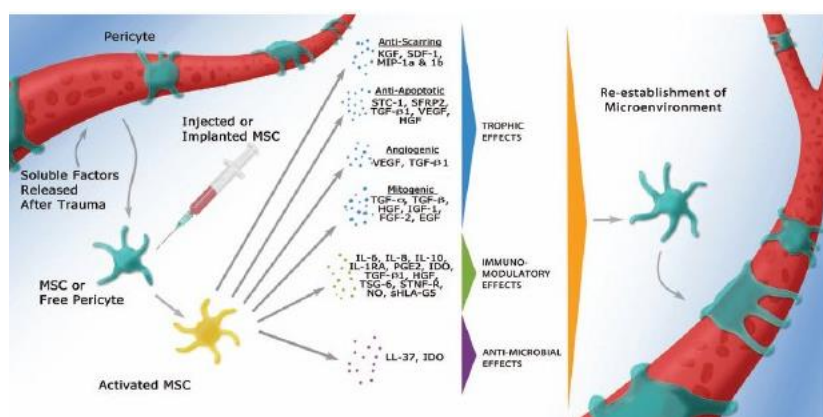


Figura 1. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine Meethew B Murphy, 2013²⁰

FENOMENO DI HOMING DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Con il termine di homing si intende il fenomeno di arresto e localizzazione delle MSCs all'interno di uno specifico tessuto, sede di eventi patogeni, infiammazione o ipossia. Il processo prevede l'arresto delle cellule a livello del sistema vascolare del tessuto, seguito da transmigrazione attraverso l'endotelio e infine localizzazione interna.

In parole più semplici, per homing si intende la capacità di queste cellule di giungere esattamente nel sito in cui se ne ha la necessità.,

Da studi effettuati non è ancora chiaro se le MSCs effettuano l'homing in modalità attiva, utilizzando i meccanismi di adesione e transmigrazione tipici delle cellule simil leucitarie oppure in modalità passiva, rimanendo intrappolati nei vasi sanguigni di piccolo diametro, come arteriole o venule post capillari.

La modalità passiva è probabilmente una funzione della dimensione cellulare e della deformabilità complessiva delle cellule. Quest'ultimo concetto è di particolare importanza per l'utilizzo terapeutico delle MSCs.

Tali cellule infatti si ingrandiscono durante il processo di espansione cellulare in vitro, il quale è un passaggio necessario durante la terapia MSCs, ma questo aspetto particolare derivato dalla coltura cellulare in vitro va attentamente considerato poichè può aumentare il rischio di intrappolamento delle cellule in tessuti aspecifici.

L'intrappolamento geometrico e meccanico è stato primariamente descritto in uno studio^{55,56} dopo una iniezione sistemica di MSCs e successivamente in un secondo studio⁵⁷ dopo un'iniezione di cellule progenitrici endoteliali nel microcircolo tumorale.

E' possibile distinguere l'arresto passivo dall'arresto attivo tramite l'osservazione di un alterato flusso di sangue. Le cellule che effettuano l'homing attraverso i meccanismi di adesione dei leucociti si appiattiscono rapidamente e si diffondono sull'endotelio vascolare sottostante in preparazione alla trasmigrazione, meccanismo biologico che riduce la possibilità di un flusso sanguigno alterato.

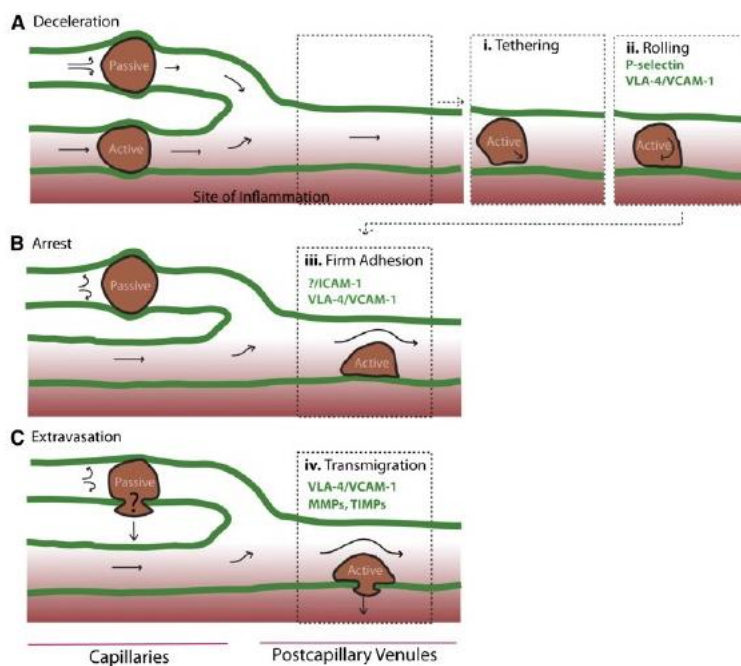


Figura 2. Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details, Jeffrey M. Karp, 2009⁵⁸

La figura 2⁵⁸ soprastante riporta una rappresentazione grafica dei due possibili meccanismi con cui le MSCs decelerano nei vasi durante il processo di homing.

Consideriamo (A) nella figura 2 la fase di decelerazione: le grandi dimensioni delle MSCs e/o le minori dei capillari più stretti potrebbero ridurre la velocità cellulare in seguito alle interazioni fisiche, portando all'intrappolamento passivo (cella superiore).

In alternativa, le MSCs che si deformano probabilmente passano, attraverso i capillari, alle venule postcapillari similmente all'homing dei leucociti.

In questo caso la cellula può prima legarsi (i) e poi rotolare sulla vascolarizzazione (ii) attivata nei siti di infiammazione, da un gradiente di chemochine (di colore verde).

Analizziamo ora il processo di arresto (B): nella modalità passiva, si osserva un flusso sanguigno alterato (freccette). Al contrario, durante quello attivo, le cellule si appiattiscono rapidamente, interagendo con l'endotelio sottostante e il flusso sanguigno rimane praticamente invariato.

Infine vi è la fase di uscita dai vasi (C): dopo l'arresto attivo, le MSCs possono trasmigrare, ma il destino di quelle arrestate passivamente non è chiaro.

In verde sono segnate le interazioni molecolari che regolano l'homing delle MSCs:

VLA-1, very late antigen-4; VCAM-1, fattore cellulare di adesione vascolare ve-1; ICAM-1, fattore di adesione intercellulare; MMPs, matrix metallo-proteinasi; TIMPs, inibitore tissutale delle metalloproteinasi.

Una terza possibilità di attecchimento delle MSCs all'interno di tessuti infiammatori comporta l'arresto passivo all'interno del sistema vascolare prossimale al sito di infiammazione, seguita dalla trasmigrazione in risposta a un gradiente di chemochine nel tessuto circostante.

È anche possibile che le proprietà fisiche delle MSCs aumentate di dimensioni in coltura, riducano abbastanza la velocità cellulare all'interno delle sedi nel versante postcapillare tanto da consentire una salda adesione ai recettori, portando così a un meccanismo che incorpora entrambi gli aspetti dell'homing attivo e passivo.

CAPITOLO 1

APPLICAZIONI CLINICHE DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

FONTI DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Secondo quanto stabilito dalla International Society for Cell Therapy: una popolazione cellulare espansa in vitro per definirsi come “staminale mesenchimale” deve:

- essere positiva per CD105, CD73, CD90;
- essere negativa per CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 e HLA-DRA's;
- essere capace di differenziarsi in osteoblasti, adipociti, condroblasti in opportune condizioni di differenziazione;

Prima di una qualunque applicazione terapeutica, le MSCs vanno raccolte dai tessuti che le ospitano, isolate ed espanse per ottenerne un numero adeguato alla terapia. L'isolamento avviene a partire da diverse fonti. Tra i tessuti da cui sono state isolate vanno elencati il midollo osseo, il tessuto adiposo, il sangue periferico, la membrana sinoviale, il liquido sinoviale, la membrana amniotica, il sangue e i tessuti del cordone ombelicale.

Nonostante l'ampia varietà di fonti, non tutte sono ugualmente idonee per le applicazioni cliniche: le più utilizzate e studiate sono infatti il midollo osseo (prelevabile a livello di sterno ed ileo) ed il tessuto adiposo, anche se si sta incrementando lo studio relativo alle cellule isolate dal sangue periferico e alle fonti perinatali, essendo risorse non invasive per il soggetto.

Inoltre le MSCs perinatali presentano una espressione minore dei markers immunogeni, rendendole potenzialmente più adatte ad una possibile applicazione allogenica. Va ricordato tuttavia che l'utilizzo di cellule prelevate dagli annessi fetali, necessariamente implica il loro utilizzo allogenico in quanto la finestra temporale per il loro isolamento è ovviamente ridotta e queste cellule non saranno disponibili per la terapia autologa di un animale adulto.

Ritornando alle fonti maggiormente utilizzate, son state mostrate in vitro differenti proprietà tra le cellule staminali isolate dal midollo osseo e quelle derivate dal tessuto

adiposo, fatto che potrebbe essere rilevante per i loro utilizzi, decretando quali siano meglio a seconda della tipologia di danno.

Son stati effettuati studi su lesioni tendinee indotte sperimentalmente confrontando le due tipologie cellulari e, sebbene le diversità tra i due trattamenti siano risultate piccole, le BM- MSCs (bone marrow, midollo osseo) hanno ottenuto un risultato migliore rispetto alle AT- MSCs (adipose tissue), soprattutto per la terapia muscolo-scheletrica.⁵⁹⁻⁶¹

Negli ultimi anni l'applicazione di terapie cellulari basate su MSCs ha ricevuto un notevole interesse da parte della comunità scientifica, sia in campo umano che veterinario.

Se l'uso routinario di queste terapie si può ancora considerare lontano, si può comunque affermare che anche la comunità clinica veterinaria si sta aprendo alla possibilità di introdurre questi approcci terapeutici innovativi in diverse patologie.

Nei paragrafi seguenti verranno brevemente illustrati alcuni esempi di patologie in cui l'uso di MSCs è stato descritto in letteratura.

TERAPIA DELLE LESIONI MUSCOLO-SCHELETRICHE NEL CAVALLO

Le principali vie di somministrazione per lesioni singole focali di tendini e legamenti, sono iniezioni dirette intra-lesionali usando ad esempio l'ultrasonografia che permette di eseguirle nella sede corretta.

Nelle lesioni non facilmente accessibili o quando si riscontrano lesioni estese o multifocali, le MSCs possono essere iniettate all'interno della guaina tendinea (se applicabile) o mediante perfusione regionale attraverso un catetere endovenoso.

La somministrazione intra-arteriosa non viene comunemente utilizzata a causa del rischio di trombosi conseguente.^{62,63} Per le patologie articolari come l'osteoartrite (OA) o lesioni meniscali, le MSCs possono essere direttamente iniettate a livello intra-articolare.

Nelle lesioni cartilaginee focali, è stato suggerito di trattenere le cellule staminali in una "intelaiatura" e posizzionarle direttamente nel difetto anatomico sotto guida artroscopica.

Nella maggior parte delle situazioni sopra menzionate, così come in altre non correlate a lesioni muscoloscheletriche, la somministrazione richiede il passaggio attraverso un ago/catetere, che può influire sulla vitalità cellulare e, pertanto, deve essere preso in considerazione il diametro.

L'aspirazione e la re-iniezione di MSCs equine utilizzando aghi di diverso calibro (G), replicando l'effetto della ri-sospensione delle cellule prima dell'iniezione, ha portato ad una maggiore vitalità cellulare e percentuale di cellule intatte quando sono stati utilizzati aghi da 20 G rispetto ad aghi di diametro minore (25 G).⁶⁴

Uno studio⁶⁴ ha valutato l'effetto di queste due manovre tramite aghi di diverso diametro, osservando che quest'ultimo non ha influito sulla vitalità cellulare durante l'iniezione di cellule, ma l'aspirazione della sospensione MSCs con diametri dell'ago di 20G ha portato a una diminuzione della vitalità cellulare, che potrebbe essere stata dovuta alla pressione negativa durante l'aspirazione.

Pertanto, un effetto negativo sulle staminali al momento del passaggio attraverso un ago viene prodotto principalmente nell'aspirazione piuttosto che durante l'iniezione, dunque è necessario utilizzare aghi da 18 G o più grandi per prendere la sospensione cellulare dalla fiala di spedizione nella siringa, mentre uno da 20 G è raccomandato per l'iniezione, che deve essere eseguita lentamente per evitare un eccessivo stress cellulare.⁶⁵

Protocolli terapeutici: quantitativo di cellule, tempistica e frequenza per una iniezione

Ad oggi, non ci sono studi "dose-risposta" che chiariscano il numero ottimale di cellule da somministrare per le lesioni muscoloscheletriche^{66,67}

Ad ogni modo, l'attuale dose consigliata per l'OA equina mediante iniezione diretta intra-articolare (IA) è di $4-20 \times 10^6$ MSCs, anche se il numero di cellule risiede all'interno di intervalli piuttosto ampi.^{68,69} Non ci sono studi che chiariscano il momento più appropriato per applicare le cellule, ma si ritiene che la finestra terapeutica ottimale sia durante la fase subacuta della riparazione tissutale, quando l'infiammazione è diminuita e la formazione di tessuto cicatriziale è ancora limitata.⁷⁰

Nella maggior parte degli studi, le MSCs autologhe sono somministrate nelle lesioni tendinee entro le 2-4 settimane dopo il trauma,^{71,72} anche se altri lavori hanno descritto somministrazioni più precoci,^{66,73} ma solo per il fatto che in questo secondo caso si trattava di una lesione indotta sperimentalmente con la possibilità quindi di isolare ed espandere prima del danno le MSCs.

La sicurezza delle iniezioni ripetute è stata valutata nel cavallo,^{74,75} ma in termini di efficacia, la maggior parte degli studi si è concentrata su una singola iniezione.

Tuttavia, somministrazioni ripetute hanno mostrato benefici in altri modelli animali, come quello suino di lesione del menisco.⁷⁶

Prodotti che possono essere combinati con le MSCs

Le MSCs possono essere somministrate dopo essere state risospese sia in una soluzione isotonica a pH neutro come una soluzione fisiologica salina tamponata (PBS) o una soluzione Ringer lattato (LRS), sia con prodotti biologici come Plasma Ricco di Piastrine (PRP), surnatante preparato da midollo osseo (BMS) o il siero condizionato autologo (ACS).

Empiricamente queste cellule sono spesso combinate con PRP o BMS per danni ai tendini o legamenti.

Per l'uso intra-articolare, è possibile la combinazione delle cellule staminali con gel iniettabili come acido ialuronico (HA) o glicosaminoglicani polisolfati (PSGAG) o idrogel di poliacrilammide (PAAG), anche se quest'ultimo ha mostrato causare una diminuzione della vitalità cellulare del 50-70% entro 24-48 ore in vitro, possibilmente a causa del pH più basso⁷⁷.

Per prevenire la flogosi articolare, si raccomanda prima della somministrazione di MSCs una dose di farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS), e, in un secondo momento, un bendaggio che deve essere lasciato in situ nelle 24-48 ore successive alla somministrazione.

Infine si dovrebbe evitare di unire le cellule e altri prodotti in una unica siringa, anche se si possono somministrare tramite lo stesso ago, inserito in sede di inoculo, se in sequenza.⁶⁸

Prodotti che non dovrebbero essere combinati con le MSCs

La sedazione e l'anestesia locale sono comunemente eseguite per permettere trattamenti muscolo-scheletrici. Gli effetti dei farmaci utilizzati sulle MSCs sono stati valutati in vitro tramite la stima della quantità che vi entrerebbe in contatto in vivo dopo la somministrazione endovenosa (per i farmaci sedativi), o durante l'esecuzione di anestesia loco-regionale.

Da queste valutazioni si è mostrato che la romifidina, la detomidina e il butarfanolo non hanno condizionato significativamente la vitalità cellulare, al contrario della xilazina, che leggermente ne ha causato una diminuzione, per cui si raccomanda di evitarla quando le MSCs vengono somministrate. Per quanto riguarda gli anestetici locali usati per il blocco perineurale, essi non influenzano la vitalità cellulare.⁷⁸

UTILIZZI NEGLI ANIMALI DA COMPAGNIA: CANE E

GATTO

Se nel cavallo l'utilizzo di terapie cellulari basate su MSCs si è concentrato prevalentemente sulle patologie muscolo-scheletriche, negli animali da compagnia, e nel cane in particolare, le applicazioni descritte in letteratura spaziano all'interno di un ampio spettro di patologie che interessano apparati ed organi differenti

OSTEOARTROSI: GLI STUDI NEL CANE

Per questa patologia sono stati presi in considerazione 5 diversi studi: quattro inerenti alla displasia dell'anca e uno a quella del gomito. Tutti i protocolli analizzati negli studi

impiegavano singole iniezioni intrarticolari di cellule staminali derivate da tessuto adiposo (Ad-MSC).

Le cellule sono state utilizzate con quattro metodiche differenti:

- da sole ⁶⁴
- in combinazione con infiltrazioni intrarticolari di PRP⁷⁹
- insieme ad acido ialuronico⁸⁰
- con agenti condroprotettivi⁸¹

Sono stati messi a confronto i risultati ottenuti tra infiltrazione di MSCs derivate da tessuto adiposo (Ad-MSCs) con PRP e Ad-MSCs con acido ialuronico.

In tutte le ricerche è stato osservato un netto miglioramento del ROM (Range Of Motion), del dolore e della scala di valutazione visiva (VAS) nei cani. Non si sono evidenziati effetti collaterali entro i 6 mesi e i risultati positivi ottenuti sono perdurati nei 3- 6 mesi successivi.⁸²

Questi studi hanno dimostrato la fattibilità, la sicurezza e la reale efficacia dell'attività biologica delle cellule, iniettate per via intra-articolare, in cani con osteoartrosi.

DEGENERAZIONE DEI DISCHI INTERVERTEBRALI NEL CANE

Questa patologia può presentarsi con o senza erniazione del disco ed è caratterizzata dalla seguente sintomatologia:

- dolorabilità alla schiena
- paresi o paralisi
- decorso subacuto

La contusione spinale può variare in termini di gravità, localizzazione e cronicità del decorso. Tutti gli studi effettuati riguardavano cani con assenza della sensibilità profonda e cronicità della lesione, per la durata variabile dai 60 giorni ai 6 mesi.

In una di queste ricerche sono stati arruolati quattro cani refrattari al trattamento chirurgico e con forma degenerativa cronica (da più di 60 giorni), ai quali è stata effettuata una seconda laminectomia e contestualmente un infiltrato di cellule staminali da midollo osseo (BM-MSCs) in sei punti differenti della lesione.

Successivamente, sono state eseguite delle valutazioni neurologiche nei 18 mesi successivi e risonanza magnetica nei 12 mesi. In questo caso specifico, nonostante la risonanza non manifestasse alcun cambiamento, l'atassia, la dolorabilità e i riflessi sono migliorati⁸³.

In un altro studio effettuato su sei cani con degenerazione cronica dei dischi, dopo 30 giorni dal trattamento con laminectomia decompressiva senza esito, sono state iniettate cellule allogene fetali (BM-MSC) per via transcutanea a livello della lesione.⁸⁴

Anche in questo caso al controllo con la risonanza non si sono riscontrate modificazioni, ma la valutazione ha portato a concludere che a seguito del trattamento di 90 giorni, si è potuto evidenziare un lieve miglioramento dei seguenti parametri:

- supporto della massa corporea
- piccoli passi incoordinati
- ritorno del tono della coda
- riflessi profondi
- defecazione
- tono muscolare

Questi studi garantiscono la necessità di approfondire un modello che se adeguatamente sviluppato e confermato rispetto ai primi parziali risultati nel cane, potrebbe diventare utile anche per l'uomo, considerando che ad oggi questi trattamenti si sono dimostrati fattibili e sicuri.

FISTOLE PERIANALI NEL CANE

La letteratura riporta un lavoro in cui un gruppo di sei cani con fistole refrattarie al trattamento classico con ciclosporina, è stato trattato con le MSCs, direttamente all'interno della lesione, in diverse posizioni in modo da assicurare la dispersione delle cellule all'interno dell'intera area coinvolta dalla lesione.

Tutti i pazienti hanno mostrato una remissione dei sintomi tranne uno che ha avuto una recidiva a 6 mesi dal trattamento.⁸⁵

INFIAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)

La malattia infiammatoria intestinale (IBD) del cane è una condizione cronica che provoca infiammazione del tratto gastrointestinale. I sintomi possono variare a seconda della gravità della malattia e della posizione dell'infiammazione.

L'IBD si può presentare in differenti varianti istopatologiche

- la forma linfoplasmacellulare
- la colite istiocitica ulcerativa
- la colite eosinofila
- la colite granulomatosa

La forma più comune nel cane, la linfoplasmacellulare, è caratterizzata da: un aumento del numero di mast cellule, infiltrazione della lamina propria da parte di cellule T del sistema immunitario e altri fattori comuni alle due specie.

Uno studio è stato condotto su 12 cani con parziale tolleranza ai trattamenti tradizionali e diagnosi istologica confermata di IBD linfoplasmacellulare.⁸⁶ Questi pazienti hanno ricevuto una iniezione intravenosa di cellule allogeniche staminali da tessuto adiposo (Ad-MSCs) al dosaggio di 2×10^6 /Kg di peso.

Il controllo è durato solo 42 giorni sia con valutazioni di laboratorio sia con osservazioni cliniche, anche da parte del proprietario, quali:

- appetito
- frequenza e consistenza delle feci
- vomito
- prurito
- ascite
- edema periferico
- peso corporeo

Inoltre sono stati monitorati anche alcuni marker biologici:

- folati
- cobalamina
- albumine seriche
- CRP (Proteina Reattiva C)

Tutti i biomarkers (escluso il CRP) hanno evidenziato un netto miglioramento rispetto ai valori iniziali, così come i segni clinici. Purtroppo, l'assenza del gruppo di controllo non ha consentito di valutare pienamente la reale portata dell'impatto del trattamento sulla malattia.

Un altro studio,⁸⁷ in cieco, ha trattato gatti con enterite linfoplasmacellulare iniettando le loro cellule staminali da tessuto adiposo (Ad-MSCs); mentre al gruppo di controllo è stato somministrato un placebo.

Entrambi i gruppi hanno continuato, successivamente alla terapia, il trattamento tradizionale.

Il procedimento è stato effettuato due volte in una settimana a dosaggio di 2×10^6 /Kg di peso e si è mostrato sicuro ed efficace sui 5/7 gatti rispetto ai 4 di controllo con placebo, per i due mesi di valutazione fatta.

Gli studi effettuati sulla IBD non hanno consentito di comprendere attraverso quali meccanismi molecolari e cellulari il trapianto di MSCs per via endovenosa sia stato in grado di avere un effetto efficace sull'intestino infiammato, ma ne hanno comunque dimostrato la capacità immunomodulatrice ed effettiva possibilità di applicazione.

MIOCARDIOPATIA DILATATIVA NEL CANE

Negli animali da compagnia spesso sono presenti diverse patologie cardiache non ischemiche:

- cardiomiopatia ipertrofica (HCM) nel gatto
- cardiomiopatia dilatativa (DCM) nel cane
- prolasso della valvola mitrale (MVP)
- cardiomiopatia aritmica ventricolare destra

L'unico studio pubblicato sull'applicazione delle cellule staminali in una patologia non ischemica, riguarda proprio la Miocardiopatia Dilatativa nel cane (DCM).⁸⁸

Il trattamento applicato su 15 cani consiste in una iniezione singola di cellule staminali di origine adiposa (Ad-MSCs), modificate con adenovirus (subtype2), al fine di ottenere una iper-espressione del gene, associato ad uno stimolo del processo di homing, con lo scopo di favorire l'innesto ed integrazione delle cellule nel miocardio. Le cellule sono state inoculate e trasportate attraverso la via venosa coronarica retrograda.

Su 15 cani trattati, 14 sono stati dimessi in 24 ore dall'innesto cellulare, mentre uno ha presentato una aritmia ventricolare maligna prima, durante e dopo il trattamento, morendo per arresto cardiaco. Il follow up ha avuto una durata di 2 anni.

Sono stati confrontati i controlli degli anni precedenti con i due anni a seguire e non si sono evidenziate differenze significative inerenti:

- la sopravvivenza media
- progressione verso l'insufficienza cardiaca congestizia (valutata con ecocardiografia)
- parametri di ECG
- indici ematici

I risultati ottenuti sono indicativi rispetto alla sicurezza del trattamento, della via di somministrazione, dell'applicazione del virus specifico ed un aumento della funzione di homing. Lo studio non permette di trarre conclusioni relativamente alla efficacia terapeutica.

CHERATOCONGIUNTIVITE SECCA

Si tratta di una patologia su base immuno-mediata che crea un danno delle ghiandole salivari e lacrimali con ridotta funzione secretoria esocrina.

La causa è una infiltrazione della ghiandola della terza palpebra con linfociti B, e altre cellule (mastociti e simili) che si riducono dopo terapia oftalmica con ciclosporine.

Uno studio effettuato si è basato su un protocollo in cui veniva testata l'efficacia di una singola iniezione di cellule staminali mesenchimali di origine adiposa, trapiantate intorno alla ghiandola lacrimale principale e alla ghiandola della terza palpebra su 12 cani, per un totale di 24 occhi.⁸⁹

I 24 occhi trattati son stati monitorati per 9 mesi dopo il trattamento, valutando quattro parametri:

- il punteggio del test di Schirmer
- scolo oculare
- iperemia
- opacità corneale

Si è visto che i parametri medi sono nettamente migliorati e il punteggio migliore è persistito per nove mesi dopo il trattamento. Inoltre grazie ad un precedente studio con tracciamento delle cellule staminali dopo il trapianto, si è messo in evidenza che le stesse persistono per sole 2 o 3 settimane.⁹⁰

Ciò porta a pensare che le MSCs impiantate abbiano esercitato un effetto paracrino sulla ghiandola lacrimale, con anche effetto immunomodulatore e trofico rigenerativo, migliorando così la composizione e la reologia della secrezione.

MENINGOENCEFALITE GRANULOMATOSE INFIAMMATORIE

Tra le meningoencefaliti ad eziologia sconosciuta sono comprese anche diverse forme infiammatorie non infettive, in cui si pensa vi sia una componente autoimmunitaria.

Nello specifico, la meningoencefalite granulomatosa è caratterizzata da:

- infiltrazione di cellule T linfocitarie e gliali macrofagiche
- ipersensibilità ritardata
- aumento dei livelli di CL19/MIP3b nel liquido cerebrospinale

Le meningoencefaliti granulomatose, colpiscono il prosencefalo, il tronco encefalico ed il midollo spinale. Possono esitare in differenti forme:

- diffuse
- multifocali
- focali
- oculari

Un gruppo di ricercatori⁹¹ ha valutato l'efficacia di un singolo impianto di cellule staminali mesenchimali (BM-MSCs) in 8 cani refrattari al trattamento tipico con corticosteroidi.

Le vie di somministrazione utilizzate son state:

- intratecale (4×10^6) e intravenosa (2×10^6)
- intratecale (4×10^6) e intracarotidea (2×10^6)

Il follow up è durato dai 6 mesi ai 2 anni e i risultati son stati i seguenti:

- nessuna reazione avversa se non un leggero rialzo termico transitorio
- 7 degli 8 cani trattati sono sopravvissuti all'intero periodo di follow up
- progressivo miglioramento dei segni clinici
- scomparsa dei segni di infiammazione (pleiocitosi mononucleare)
- Solo due cani hanno necessitato di terapia antiepilettica, mentre gli altri non sono stati sottoposti ad alcun trattamento.

INSUFFICIENZA RENALE CRONICA NEL GATTO IN FASE FINALE

Questa malattia è caratterizzata da una eziologia poco conosciuta e, da punto di vista patologico, da una nefrite tubulo interstiziale, con progressiva infiltrazione di linfociti, plasmacellule e macrofagi. L'utilizzo terapeutico delle cellule staminali è stato effettuato utilizzando sia cellule allogenicche che autologhe.

In un primo studio⁹² son stati considerati sei gatti (quattro con insufficienza renale e due sani) trattandoli con Ad-MSCs e BM-MSCs per via intrarenale, con una sola somministrazione ad un dosaggio approssimativo di 1×10^5 cellule.

In questo studio:

- non ci sono stati effetti collaterali degni di nota

- in due gatti sottoposti a scintigrafia è stato notato un leggero miglioramento della funzionalità renale

Un secondo studio⁹³ ha preso in considerazione la via intravenosa di somministrazione di Ad-MSCs crioconservate. Sono stati considerati undici gatti con insufficienza renale cronica infondendo loro tre somministrazioni a due settimane di distanza:

- cinque gatti al dosaggio di 2×10^6 per Kg
- sei gatti al dosaggio di 4×10^6 per Kg

Il primo gruppo di gatti non ha mostrato effetti collaterali, mentre il secondo ha dimostrato le seguenti reazioni avverse: vomito, scialorrea, dispnea.

Non è stato dimostrato nessun miglioramento della funzionalità renale.

CAPITOLO 2

TERAPIA CON MSCs AUTOLOGHE VS TERAPIA CON MSCs ALLOGENICHE

Col termine autologhe si intendono cellule provenienti dallo stesso organismo su cui si effettua la terapia, mentre allogeniche sono quelle provenienti da un individuo diverso rispetto al paziente, seppur appartenente alla stessa specie.

Dal punto di vista normativo, le terapie con cellule allogeniche non sono consentite secondo l'accordo Stato Regioni del 29 aprile 2010 per motivi di sicurezza, riguardo sia la possibilità di risposte avverse del sistema immunitario, che la possibilità di trasmettere agenti patogeni.

I dati presenti in letteratura tuttavia dimostrano come esista una ampia discussione nella comunità scientifica sulla sicurezza ed efficacia dei trattamenti allogenici.

Difatti sta aumentando l'evidenza che le MSCs, a lungo considerate "privilegiate" dal sistema immunitario e quindi non riconosciute e attaccate, subiscono un riconoscimento e successiva eliminazione da parte del sistema immunitario dell'organismo ricevente.

Espressioni variabili del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo I (MHC –I) e di tipo II (MHC-II) insieme alla mancata corrispondenza delle MSCs tra donatore e ricevente potrebbe portare alla risposta immunitaria cellulare e/ umorale.^{94,95}

Le molecole di MHC-I e MHC-II espresse dalle staminali del donatore potrebbero essere riconosciute direttamente dalle cellule T CD8+ o CD4+ del destinatario, rispettivamente.

Il riconoscimento diretto dalle cellule T naive richiederebbe anche molecole di co-stimolazione come CD40, CD80 o CD86 che non sono espresse dalle MSCs in condizioni basali.

Il riconoscimento indiretto, che non dovrebbe necessitare di segnali di co-stimolazione, potrebbe verificarsi tramite l'internalizzazione dei frammenti dell'MHC-I e MHC-II da parte delle cellule presentanti l'antigene del destinatario e la successiva presentazione alle cellule B e T, generando potenzialmente memoria immunitaria che potrebbe limitare ed ostacolare ripetute somministrazioni⁹⁶.

Inoltre, l'esposizione a molecole infiammatorie può incrementare l'espressione del MHC-II e delle molecole di co-stimolazione come CD40 nelle cellule MSCs, con probabilità di aumentarne l'immunogenicità.

Tuttavia, gli stimoli infiammatori promuovono il profilo immunomodulatorio delle MSCs, che potrebbe facilitare l'evasione delle cellule allogeniche dal sistema immunitario.⁷³

Ad ogni modo le implicazioni cliniche non sono ancora chiare: somministrazioni intra-articolari (IA) singole e ripetute di MSCs allogeniche hanno mostrato di essere sicure sia nelle articolazioni equine sane^{74,97} sia in quelle colpite spontaneamente da malattie.⁷⁷

L'infiammazione lieve e transitoria alle articolazioni rilevata dopo il trattamento, autologo o allogenico che sia, è solitamente auto-limitante e di risoluzione spontanea in pochi giorni.^{74,98}

Ciononostante, le preoccupazioni inerenti alle MSCs allogeniche dovrebbero essere prese in considerazione ed è necessaria un'ulteriore comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari coinvolti per chiarirle.

CAPITOLO 3

APPLICAZIONI DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI NELLA TERAPIA ONCOLOGICA

Le MSCs sono attivamente studiate sia relativamente ai loro aspetti biologici che per le loro varie applicazioni cliniche.

Negli ultimi anni una linea di ricerca che si è andata sviluppando, prende in considerazione i rapporti tra MSCs e tumori. In particolare grazie alla loro capacità immunomodulatoria e alle loro capacità differenziative le MSCs potrebbero avere comportamenti variabili nei confronti delle cellule tumorali, fungendo talora da agente pro-tumorale e, in altre situazioni, al contrario come agente in grado di contrastare la crescita tumorale.

Quest'ultima innesca e mantiene una situazione caratterizzata da infiammazione cronica, rimodellamento tessutale e indebolimento immunitario, alla quale le MSCs partecipano attivamente.

Il principale meccanismo con cui le staminali influenzano l'inizio e la progressione del tumore sono gli effetti immunomodulatori da loro esercitati sull'immunità innata e adattativa, mediante contatti cellula-cellula, produzione di esosomi e altri fattori secreti.

Le MSCs possono avere effetti opposti sulle cellule immunitarie: da una parte promuovono l'infiammazione ed esprimono caratteristiche immunosoppressive favorevoli la progressione tumorale, dall'altra sfruttano la loro plasticità verso l'espressione di proprietà anti-tumorali, anti-infiammatorie e pro-immunogene che possono essere una futura opzione terapeutica.

Tutto ciò richiede una comprensione completa e approfondita della relazione funzionale tra cellule tumorali, staminali e immunitarie, in particolare in che modo le prime modificano le seconde per indurle ad un funzionamento a loro favore e le caratteristiche fondamentali della plasticità delle MSCs che consentono tale cambiamento.

IL RAZIONALE BIOLOGICO DELL'USO TERAPEUTICO DELLE MSCs

RUOLO NELLA RIGENERAZIONE TISSUTALE E NELLA GUARIGIONE DI FERITE

L'infiammazione causata da una lesione e il conseguente rimodellamento tissutale forniscono segnali che mobilitano le MSCs e guidano la loro differenziazione verso diverse componenti stromali, alcune delle quali utilizzate come sostituzione alle cellule danneggiate.

Queste possono o esser residenti nel tessuto coinvolto oppure giungere dal midollo osseo.

Come risposta ai mediatori solubili derivati dal microambiente dei tessuti danneggiati, quali il fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF- α), interleuchina-1 (IL-1), interferone-gamma (IFN- γ) e tossine da agenti infettivi, le cellule mesenchimali hanno la capacità di rilasciare un'ampia gamma di altre molecole: il fattore di crescita epidermico (EGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita trasformante-beta (TGF- β), il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), il fattore di crescita degli epatociti (HGF), il fattore di crescita insulino-simile -1 (IGF-1), angiopoietina-1 (Ang-1), il fattore di crescita dei cheratinociti (KGF), la proteina G6 stimolata dal TNF (TSG-6), l'antagonista del recettore dell'interleuchina-1 (IL-1RA), la prostaglandina E2 (PGE2), indoleamina 2,3 diossigenasi (IDO), l'ossido nitrico (NO) e il fattore di derivazione stromale 1 (SDF-1).

Tutte queste hanno la funzione di promuovere l'attivazione di fibroblasti, cellule endoteliali e cellule progenitrici dei tessuti, andando quindi ad attivare e regolare i fenomeni di angiogenesi, di inibizione dell'apoptosi, di deposizione dell'ECM ed infine di sostituzione delle cellule danneggiate,^{99,100 101-103} che a loro volta permettono la rigenerazione e la riparazione tissutale.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶

Inoltre le MSC possono partecipare attivamente all'azione battericida attraverso la secrezione del peptide LL-37.⁵⁴

PROPRIETÀ IMMUNITARIE

Le proprietà funzionali fondamentali per il ruolo immunitario delle cellule staminali sono principalmente due: la capacità di indurre immunosoppressione e quella di esercitare quello che è stato definito privilegio immunitario.

La prima è stata prettamente associata con MSCs derivanti dal midollo osseo, mentre negli studi che utilizzano altre origini si sono dimostrate sia immunosoppressive sia pro-infiammatorie e questo può essere dovuto a fattori dipendenti dal tessuto e specie-specifici.

Per privilegio immunitario si intende quella situazione in cui alcuni distretti dell'organismo dei mammiferi sono in grado di tollerare l'introduzione di antigeni senza suscitare una risposta immunitaria infiammatoria; ad esempio in un trapianto di tessuto, i suoi innesti possono sopravvivere per lunghi periodi in quelle regioni anatomiche, senza il verificarsi del rigetto.

I siti immunologicamente privilegiati includono:

- gli occhi
- la placenta e il feto
- i testicoli
- il sistema nervoso centrale

I meccanismi di questo fenomeno sono in gran parte sconosciuti, ma con alta probabilità per quanto riguarda le MSCs son dati dalla bassa espressione delle molecole MHC I e MHC II accoppiate alle funzioni immunosoppressive delle MSCs.

Questa proprietà, ritenuta fondamentale per diverse applicazioni terapeutiche, non è tuttavia stabile poiché il reclutamento (ossia l'attivazione funzionale di queste cellule) e la differenziazione cellulare che ne può derivare, tramite IFN- γ sovra-regolano l'espressione dell'MHC 1 e, in minor misura, anche dell'MHC II, portando così ad un miglioramento della capacità sia immunogenica sia di presentazione antigenica delle MSCs e ad una riduzione del privilegio immunitario.¹⁰⁷

Gli effetti immunosoppressivi delle cellule staminali necessitano della vicinanza alle loro cellule bersaglio, quali linfociti T, linfociti B e cellule NK.

Le molecole MHC di classe I, i recettori di adesione ICAM-1 e VCAM-1 e la molecola immunosoppressiva PD-L1 (il ligando della morte programmata 1) sono sovra-regolati dalle MSCs innescate ed attivate.

Le ultime tre molecole sopracitate riescono a riconoscere ligandi sulle cellule immunitarie, stimolando così l'adesione cellula-cellula con conseguente ottimizzazione dell'esposizione delle cellule immunitarie ai mediatori immuno-soppressivi secreti.¹⁰⁸

A seguito dell'attivazione, il complesso immunosoppressivo secreto derivato dalle MSCs comprende: HLA-G, TGF- β , PGE2, TSG-6 (fattore della necrosi tumorale inducibile dalla proteina 6 del gene), HO-1 (eme ossigenasi 1), HGF, IL-10, IL-6, IDO1 (indoleamine-pirrolo 2,3-diossigenasi), ARG1/2 (arginasi), NOS2 (nitrico ossido sintasi 2A), adenosina e LIF (fattore inibitorio della leucemia), così come PD-L1/2 e ligando Fas (FasL).¹⁰⁹

I due mediatori chiave dell'immunosoppressione sono il TGF- β e il PGE2.

Il primo provoca inibizione diretta delle azioni delle cellule effettrici antitumorali (NK, cellule T CD8+ e cellule T $\gamma\delta$) mediante down-regulation del recettore attivante NKG2D, generando e reclutando cellule T regolatrici e cellule T $\gamma\delta$.¹¹⁰⁻¹¹⁹

Per quanto riguarda l'immunità innata, le MSCs hanno una relazione funzionale con il sistema del complemento, ad esempio le BM-MSCs esprimono i recettori delle anafilatossine C3aR e C5aR, suggerendo che C3a e C5a possono essere chemiotattici verso i siti di lesione.

Le cellule staminali mesenchimali esprimono gli inibitori del complemento CD46, CD55 e soprattutto CD59, che le proteggono sia dall'opsonizzazione attuata da questo sia dalla lisi, inoltre secernono il fattore H, un ulteriore inibitore.^{115,120,121}

Le MSCs agiscono attivamente nel reclutamento dei neutrofili tramite la secrezione di citochine chemiotattiche e chemochine, includendo IL-6, IL-8, IFN- β , GM-CSF e il fattore inibitorio dei macrofagi (MIF).

Promuovono anche la sopravvivenza neutrofilica, che contribuisce ad eliminare i patogeni¹²² e a rispondere al rilascio di istamina da parte dei mastociti, indotto dalla produzione di IL-6.¹²³

Esse contribuiscono direttamente e indirettamente alla proliferazione, produzione di citochine e, in alcune condizioni, alla citotossicità delle cellule natural killer.

Le interazioni tra quest'ultime e le MSCs hanno un certo grado di complessità e dipendono soprattutto dal microambiente e dallo stato di attivazione delle seconde: quelle derivate dal midollo osseo (BM-MSCs) hanno la capacità di inibire la proliferazione, la citotossicità e la produzione di citochine delle NK mediante la secrezione di IDO1, TGF- β , HLA-G e PGE2.^{21,123-127}

Ad esempio nelle neoplasie polmonari umane, le T-MSCs (tumor-associated MSCs) hanno mostrato una immunosoppressione maggiore rispetto alle N-MSCs (normal tissue-associated MSCs) tramite PGE2 e, in minor misura, IL-6.

Tali molecole causano la riduzione della produzione di IFN- γ e la downregulation dell'espressione dei recettori attivanti delle cellule NK quali NKp44, NKp30, NKG2D, DNAM-I e NKG2A.

Le T-MSC anche possono indurre una inversione del rapporto CD56^{bright/dim} delle cellule NK in favore del fenotipo CD56^{dim}, che è associato in maniera contatto-dipendente alla degranolazione piuttosto che ad una produzione di citochine elevata.¹²⁴

Le cellule staminali mesenchimali influenzano anche la funzione delle cellule dendritiche (DC), poiché hanno azione inibente diretta sia sulla maturazione dei monociti e delle cellule precursori CD34+, sia sulla attivazione delle DCs stesse tramite PGE2, IL-6, TSG-6 e M-CSF (fattore stimolante le colonie di macrofagi) e azione mediata da Jagged-2.¹²⁸⁻¹³⁰

Tutte le cellule dendritiche sono sensibili all'azione delle MSCs, sia quelle mature (m-DC) sia quelle immature (i-DC), difatti in presenza di tali cellule, le i-DC mostrano una ridotta capacità nella presentazione dell'antigene e nella stimolazione della proliferazione delle cellule T e della differenziazione delle cellule T naïve, causando così una inefficace attivazione delle T cells.

Le cellule dendritiche mature possono anche essere ripristinate ad un fenotipo immaturo a causa della downregulation della espressione sulla superficie cellulare di molecole presentanti l'antigene e di molecole co-stimolatrici, della soppressione della secrezione di IL-12 e dell'incapacità di stimolare la proliferazione linfocitaria in vitro, il tutto per opera sempre delle MSCs.¹³⁰

Sembra che queste favoriscano la comparsa del fenotipo mieloide delle cellule soppressori (MDSC) tramite la secrezione di molecole come IL-6, HGF e CXCL3 (ligando 3 delle chemochine con struttura C-X-C), le quali stimolano le MDSC alla produzione di COX2 (enzima cicloossigenasi-II, PTGS2), IDO, PD-L1, PD-L2 e MMP9 (metalloproteinasi 9 della matrice).^{1,31,132}

Le cellule staminali mesenchimali conducono la mobilitazione dei monociti dal midollo osseo e dei macrofagi, ai siti di infiammazione affinché si attui la riparazione della ferita tramite secrezione dei ligandi delle chemochine (con struttura C-C) CCL2, CCL3 e CCL12. Tali cellule svolgono un ruolo anche nella differenziazione dei monociti verso macrofagi M2 (associati alla riparazione tissutale), mediante secrezione di PGE2, IL-6, IDO e contatto diretto intercellulare^{52,133}.

La segnalazione dell'interleuchina 6 dei macrofagi è ciò da cui dipende profondamente la capacità sia della regolazione del fenotipo macrofagico (M1 o M2) sia della stimolazione della immunosoppressione da parte delle MSCs.¹³⁴

Si stanno compiendo studi sulla relazione tra MSCs e cellule T $\gamma\delta$, le quali sono in grado di produrre sia citochine pro-infiammatorie come IFN- γ , TNF- α e IL-17, sia antinfiammatorie quali TGF- β , IL-4 e IL-10, in base alle tipologie di segnali predominanti nel microambiente tissutale. Inoltre queste cellule hanno la capacità di esercitare effetti antitumorali ma anche protumorali.¹³⁵

Nella risposta regolatrice mediata dalle MSCs svolge un ruolo fulcro il TGF- β , mediante l'induzione delle cellule Treg CD4+ e $\gamma\delta$.

D'altra parte le staminali sono potenti soppressori della proliferazione delle cellule $\gamma\delta$, della produzione di citochine e delle risposte citolitiche (effetto antitumorale) in vitro, grazie alla elaborazione di COX2-dipendente di PGE2.¹³⁶

IMMUNITÀ ADATTATIVA

Le cellule staminali mesenchimali hanno la capacità di regolare l'attivazione e la funzione dei linfociti T e B.

Nella soppressione della proliferazione delle cellule T mediata da MSCs agiscono numerosi fattori, quali iNOS (NO sintasi inducibile), IDO, semaforina-3A, B7-H4, HLA-G, LIF, galectina(e), HO-1, IL-6, IL-10, PD-L1/2, FasL e PGE2.¹³⁷⁻¹³⁹

Mediante sia secrezione di PD-1, PGE2, IL-10 sia promozione di quella dell'interleuchina IL-4 dai Th2, le cellule staminali possono esercitare effetti non solo inibitori verso cellule Th1 e Th17 (pro-infiammatorie),¹⁴⁰ ma anche stimolatori sulle seconde.

Inoltre le MSCs hanno l'abilità di promuovere la differenziazione delle Treg mediante secrezione di TGF- β , IL-6 e IL-10 ed espressione di IDO.¹⁴

L'IFN- γ ha il ruolo di stimolare la funzione immunosoppressiva delle staminali, inducendo nell'uomo la produzione di chemochine, IDO, PGE2, HGF e TGF- β con la finalità di attrarre e sopprimere le cellule T.^{141,142}

Le funzioni immunosoppressive delle MSCs verso le cellule T sono mediate non solo dai fattori solubili, ma anche dal contatto cellula-cellula, incluse interazioni ICAM-1-LFA-1 e PD-1/PD-L1.

Ulteriori meccanismi di soppressione sono verificati attraverso microRNA e rilascio di esosomi.¹⁴²⁻¹⁴⁴

Le interazioni tra cellule B e MSCs sono meno investigate ad oggi, nonostante alcuni ricercatori suggeriscano la presenza della capacità inibitoria delle seconde inerente sia alla attivazione, proliferazione, differenziazione delle prime, sia a risposte chemiotattiche.^{145,146}

PRIMING: RUOLO DEI TOLL-LIKE RECEPTORS E GRADO INFIAMMATORIO

L'attività immunomodulatoria delle cellule mesenchimali staminali non è solo determinata da citochine derivanti da un microambiente pro-infiammatorio (come di infiammazione, cancro o infezione), in particolare IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , ma anche dalla stimolazione dei recettori Toll-Like (TLR).¹⁴⁷⁻¹⁵³

Le MSCs, che esprimono TLR1-6, TLR2-4, proteine 7 e 9, possono essere indirizzate verso un fenotipo immunosoppressivo o un pro-infiammatorio come conseguenza della stimolazione TLR: difatti quelle innescate da TLR4 sono polarizzate verso un fenotipo MSC1 pro-infiammatorio (agente nella inibizione della crescita tumorale), mentre quelle stimulate da TLR3 verso il fenotipo MSC2 immuno-soppressivo.^{154,155}

Un ulteriore aspetto importante nella polarizzazione è dato dal grado infiammatorio presente: le MSCs divengono immunosoppressive solo se esposte ad alti livelli di

citochine pro-infiammatorie quali TNF- α e INF- γ , come accade nelle ultime fasi del processo flogistico,^{108,156} specificando però che il fenotipo MSC2 è influenzato anche dalla stimolazione TLR3.¹⁵⁶

Al contrario, durante le prime fasi, vi è presenza di bassi livelli delle due molecole, per cui le cellule possono esprimere un fenotipo MSC1 pro-infiammatorio, migliorando le risposte immunitarie parzialmente tramite il TLR4 presente sulla loro superficie.¹⁵⁵

La stimolazione di quest'ultimo induce la secrezione di IL-6, IL-8 e TGF- β , mentre la stimolazione di TLR3 incrementa IL-4, IL-1RA (antagonista del recettore dell'interleuchina-1), IDO e PGE2.^{149,155,157,158}

ESOSOMI DERIVATI DA MSCs

Le MSC-EVs sono vescicole extracellulari originate da cellule mesenchimali staminali e svolgono un ruolo rilevante nel microambiente tumorale (TME)^{159,160} inteso come insieme di molecole, cellule, tessuti, strutture circondanti il tumore e in apparenza sono parti dell'organismo non patologiche.

In questo ambiente le vescicole vengono rilasciate tramite un meccanismo di comunicazione intercellulare usato da cellule sia tumorali sia stromali.

Degli EVs fanno parte gli esosomi (la frazione più piccola derivante da endosomi intracellulari) e le microvescicole, ottenute tramite gemmazione dalla membrana del plasma.

Queste vescicole hanno la capacità di attivazione diretta dei recettori superficiali della cellula bersaglio attraverso l'interazione con ligandi proteici e lipidici bioattivi specifici. La risposta cellulare indotta è mediata dall'attivazione di fattori di trascrizione, espressione di fattori di crescita, proteine di varia attività funzionale, RNA regolatori non codificanti, causando così dei cambiamenti funzionali nelle cellule riceventi

Le MSCs possono avere effetti opposti sulle cellule tumorali: alcuni sono anti-oncogeni, altri, al contrario, pro-oncogeni.

Similmente, le MSC-EVs posseggono duplice azione sulla progressione neoplastica: gli esosomi derivati da cellule mesenchimali staminali nel carcinoma polmonare non a piccole cellule, hanno dimostrato di promuovere la chemioresistenza;¹⁶¹ oppure, le EVs tumorali possono anche mediare la resistenza ai farmaci attraverso meccanismi che includono il sequestro della molecola, consegna di specifici miRNA e proteine, comunicazione tra cellule tumorali e MSCs.^{162,163}

Si è mostrato che le MSC-EVs svolgono anche un ruolo modulatore del microambiente tumorale, instaurando condizioni favorevoli per la metastasi delle cellule neoplastiche, avendo la possibilità di imitare gli effetti delle staminali sulla promozione della crescita tumorale.¹⁶⁴

All'interno delle EVs possono essere contenute citochine (compresi IL-6, IDO, PGE2, IL-10) e chemochine (compresi CXCL2, CCL2, CXCL8) insieme ad acidi nucleici e modulatori post-trascrizionali che potrebbero influenzare la risposta infiammatoria una volta attivata.^{165,166}

Gli esosomi infatti hanno l'abilità di inibire la proliferazione delle cellule B¹⁶⁷ e aumentare l'attività Treg.¹⁶⁸

In condizioni fisiologiche, è stato osservato che gli MSC-EVs modulano la risposta immunitaria cellulare per agevolare la riparazione tissutale, poiché favoriscono i macrofagi M2 anti-infiammatori e pro-rigenerativi rispetto ai macrofagi M1 pro-infiammatori, e incrementano l'espressione di citochine antinfiammatorie IL-10 e TGF- β .¹⁶⁹

Nei tumori, l'infiammazione cronica promuove l'immunosoppressione almeno in parte attraverso il rilascio di EVs, che quindi contribuisce alla progressione dello stesso.^{170,171}

IL RUOLO DELL'INTERLEUCHINA 6

Nella comunicazione tra MSCs ed il loro microambiente svolgono un ruolo importante TGF- β , PGE2 e soprattutto IL-6.

Quest'ultima è una citochina pleiotropica, secreta ad alti livelli da cellule tumorali stromali che supporta la proliferazione della cellula neoplastica, la sua sopravvivenza ed infine la disseminazione metastatica.

Inoltre, l'IL-6 agisce su numerose tipologie cellulari all'interno del microambiente neoplastico per sostenere un sistema un pro-tumorale, favorendo l'angiogenesi e l'evasione dalla sorveglianza immunitaria, ma nonostante ciò, può anche promuovere l'immunità adattativa antitumorale.^{172,173}

Le cellule mesenchimali staminali, soprattutto quelle isolate dallo stroma tumorale, secernono livelli più elevati di IL-6^{124,174} che, insieme a PGE2, partecipano alla soppressione dell'attività delle cellule NK e facilitano sia la disseminazione sia la metastasi.¹⁷⁴

La secrezione di questa citochina da parte delle MSCs è parte della risposta regolatrice tardiva, insieme al TGF- β , che ha lo scopo di indurre cellule Natural Killer senescenti.

Ad esempio nell'osteosarcoma il TGF- β secreto dalle MSCs può aumentare la migrazione delle cellule tumorali, che successivamente stimolano la secrezione di IL-6, la quale favorisce la staminalità e l'aggressività delle cellule tumorali.^{175,176}

Infine l'interleuchina 6 modifica il profilo di secrezione di molecole solubili delle MSCs, causando un incremento di PGE2 e VEGF.

IL-6 e PGE2 derivate dalle cellule staminali mesenchimali possono portare la differenziazione dei monociti verso la formazione di macrofagi esprimenti IL-10.¹⁷⁷

HOMING

Con il termine “homing” si indica la capacità delle cellule staminali mesenchimali, circolanti o esogene, di localizzarsi e successivamente integrarsi in un determinato ambiente, inteso come distretto anatomico specifico.

Ad esempio, considerando le MSCs originate dal midollo, la migrazione può verificarsi anche verso tessuti lesi.

Perché è importante focalizzarsi sull’homing?

Le MSCs si caratterizzano, come già detto, per la mutevole plasticità di adesione, la capacità di differenziarsi in varie tipologie di tessuto connettivo, l’abilità di angiogenesi, di proliferazione e di immunosoppressione.¹⁷⁸

Tali cellule hanno un potenziale nel miglioramento dei decorsi ed esiti clinici inerenti ad infiammazioni e malattie degenerative.

Vengono somministrate per via endovenosa o per inoculo in situ oppure possono essere mobilitate e reclutate a distanza dal tessuto danneggiato.

Ognuna di queste modalità di utilizzo prevede lo sfruttamento del fenomeno di homing delle MSCs, che utilizza la maggior parte degli stessi passaggi di quello delle HSPC (cellule progenitrici ematopoietiche): include la presenza di selectine, l’attivazione mediante citochine, l’arresto tramite le integrine, la diapedesi attraverso rimodellatori di matrice ed infine la migrazione extravascolare verso gradienti di chemochine.¹⁷⁹

Metodi utilizzati per sondare l’arresto attivo delle MSCs

Come già descritto, la trans-migrazione delle MSCs attraverso la parete vasale può sfruttare meccanismi attivi o passivi.

Le MSCs infuse hanno una particolare tendenza a migrare verso siti di infiammazione o di lesione.

Uno studio¹⁸⁰ ha esaminato questo aspetto sottoponendo dei topi ad irradiazione corporea totale (TBI) e in alcuni casi in combinazione con un’ulteriore irradiazione locale nell’area addominale o nella zampa posteriore.

La distribuzione delle MSCs infuse per via sistemica è stata valutata 15 giorni dopo il trattamento, constatando che i livelli cellulari sono risultati più elevati nei topi sottoposti a TBI (Total Body Irradiation) rispetto a quelli non irradiati.

La TBI ha causato un aumento di 2.8 volte dei livelli di incisione delle MSCs nel cervello, di 3 volte nel cuore, di 2.5 volte nel fegato, di 2.6 volte nel midollo osseo e di 1.7 volte nei muscoli, mentre i livelli di localizzazione nel polmone non sono stati influenzati.

Questo studio suggerisce che le cellule in seguito alla somministrazione sono migrate e si sono localizzate nei diversi tessuti e/o organi in risposta al danno da radiazioni.

Probabilmente questa mancanza di cambiamenti nel polmone è il risultato di un processo passivo.

Tuttavia, non si può escludere la possibilità che, oltre all'up-regulation dell'integrina, in particolare quella di VCAM-1,¹⁸¹ l'irradiazione o l'induzione di infarto miocardico (MI) porti anche a cambiamenti locali del diametro dei microvasi, dando costrizione,^{182,183} influenzando in questo modo l'arresto passivo e spiegando così l'accumulo di MSCs nel tessuto infiammato.

L'evidenza più significativa dell'arresto attivo delle cellule mesenchimali staminali all'interno di tessuti infiammati è data dal meccanismo che prevede il blocco dell'integrina¹⁸⁴ e studi di knockout¹⁸⁵ che mostrano una dipendenza dalle interazioni tra selectina e integrina.

Ad esempio, si è dimostrato¹⁸⁴ che il blocco sulle MSCs della b1-integrina, una componente della molecola di adesione VLA-4 regolatrice dell'arresto dei leucociti sull'endotelio attivato, ha diminuito la loro capacità di localizzazione nel miocardio ischemico.

Inoltre, utilizzando topi knockout per la P-selectina, si è dimostrato con la microscopia intravitale che è presente un numero minore di staminali rallentate nelle venule postcapillari rispetto ai topi wild-type.¹⁸⁵

Questo suggerisce che l'innesto all'interno dei tessuti bersaglio dipende da specifiche interazioni molecolari precedenti la fase di tras migrazione, piuttosto che da fenomeni sterici passivi.

Uno studio¹⁸⁶ ha esaminato l'adesione delle MSCs su endotelio attivato o meno, mettendo in evidenza il ruolo dominante di VLA-4 e VCAM-1 come effettori dell'adesione stessa.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹

Un ulteriore studio¹⁹⁰ ha riportato che le MSCs possono trasmigrare attraverso monostrati endoteliali non attivati grazie alle interazioni VCAM-1/VLA-4, tendendo ad integrarsi con lo strato endoteliale, forse come periciti incorporati.

E' stato osservato che alcune componenti della matrice, come la tropoelastina, aumentano l'homing e la proliferazione di staminali nello sviluppo e riparazione di ferite.¹⁹¹

Infine, come nell'homing HSPC, le MSCs devono effettuare una migrazione verso il sito della lesione e ciò è permesso mediante segnali chemiotattici come PDGF α ,¹¹⁶, il fattore 1 di crescita dell'insulina,¹⁹² il CXCL12 e altre chemochine, tra cui il fattore di crescita degli epatociti e il fattore di crescita epidermico.¹⁷⁰

Le MSCs esprimono CXCR4, CXCR7 (l'altro recettore per CXCL12¹⁹³) e in modo variabile anche numerosi differenti recettori per le chemochine e ciò ha un ruolo significativo nel determinare verso quali tessuti migreranno.

Ad esempio, in un modello di difetto del femore, il TGF- β -3 (trasforming growth factor) è capace di aumentare la migrazione delle MSCs endogene originarie dal midollo verso la testa femorale con conseguenti aumenti nel volume osseo e nella densità minerale.

Questo grazie al TGF- β che può indirettamente aumentare l'espressione della proteina chemiotattica dei macrofagi-1 (MCP) e reclutare anche cellule CD31+ vascolari.¹⁹⁴

Un altro esempio è il fattore di necrosi tumorale- α , che ha la capacità di incrementare la migrazione di MSCs mediante sovra-regolazione di CCR2, CCR3 e CCR4.¹⁹⁵

Come con gli HSPC, lo stato di fucosilazione delle molecole di adesione può influenzare l'homing.

È stato scoperto che le staminali derivate dal midollo umano, in vitro, attuano questo processo tramite tras migrazione delle cellule del rivestimento endoteliale mediante attivazione del PI3KAkt, MAPK e vie di segnalazione Jak/Stat in risposta alla produzione cellulare endoteliale di PDGF stimolata da CXCL12.

Si giunge così all'attivazione delle chinasi di adesione focale e ai cambiamenti citoscheletrici che possono aiutare nella tras migrazione.¹⁹⁶

L'homing e l'alloggiamento delle MSCs possono essere tessuto-dipendenti, in quanto quelle derivanti dal midollo sono state osservate essere in grado di ospitare tumori dell'ipofaringe,¹⁹⁷ ma non sembra che si siano insediate, ad esempio, nei tumori primari della prostata.

Allo stesso modo, nella malattia renale cronica (CDK), è presente un livello di homing basso ed una scarsa sopravvivenza delle MSCs di derivazione midollare trapiantate.^{198,199}

Quindi tale capacità differenziale di localizzazione dipende sia dal tessuto bersaglio, sia dalle alterazioni intrinseche delle staminali: ad esempio quelle positive alla molecola di adesione delle cellule del melanoma (CD146, MCAM) posseggono una maggiore tras migrazione verso i dischi intervertebrali degenerativi rispetto alle loro controparti negative.²⁰⁰

In conclusione, si può affermare che il fenomeno di homing è una delle proprietà delle MSCs che più vengono sfruttate per fini terapeutici.

Si presume che l'efficacia di tali cellule infuse per via sistemica sia basata sia sulla loro extravasazione e sul loro innesto nell'organismo, dove possono esercitare un'attività trofica o paracrina a livello locale oppure possono localizzarsi in un tessuto non specifico e rilasciare fattori paracrini a livello della vascolarizzazione con un conseguente effetto sistemico.^{55,201}

Metodi utilizzati per valutare il ruolo degli enzimi nell'homing delle MSCs

Le cellule dotate di capacità migratoria all'interno dei tessuti, oltre a chemochine e a molecole di adesione, spesso secernono enzimi che sono essenziali per la loro migrazione.

Questi sono proteasi, che regolano sia la trasmigrazione sia l'invasione della membrana basale dell'endotelio e degradano la matrice extracellulare (ECM) durante la chemiotassi.

I ruoli della MMP2 (metalloproteasi di matrice 2), della MT1-MMP e del TIMP-2 (inibitore della metalloproteasi 2) nell'invasione delle MSCs è stato confermato da uno studio,²⁰² dove si è anche dimostrato che la migrazione guidata da gradienti chemiotattici poteva essere ostacolata dall'inibizione delle proteasi.

La downregulation di MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 tramite RNA interference (RNAi) ha compromesso la migrazione delle MSCs rispettivamente del 72%, 75% e 65%, in confronto alle cellule di controllo che avevano ricevuto un siRNA non diretto a un bersaglio.

In un altro studio¹⁹⁰ è stata effettuata la perfusione di staminali in cuori di topo isolati e successivamente è stata rilevata la presenza di gelatinasi nei siti di invasione delle MSCs mediante zimografia in situ, che ha quindi permesso di mostrare la loro capacità di superare la membrana endoteliale e di migrare verso fattori chemiotattici.

Le notevoli proprietà migratorie delle MSCs infuse per via sistemica sono state dimostrate anche da un'ulteriore ricerca²⁰³ condotta su un modello di occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAO): le staminali umane marcate con Feridex (una sospensione colloidale di molecole di ossido di ferro rivestite di destrano usata come agente di contrasto) sono state immesse direttamente nell'emisfero omolaterale o controlaterale del cervello lesa e sottoposte poi a risonanza magnetica una volta alla settimana fino a 10 settimane.

E' stato osservato che, indipendentemente dal sito di infusione, le MSCs erano in grado di migrare e successivamente localizzarsi sia nella zona periferica che in quella centrale del tessuto infartuato.

Questo risultato è stato confermato dalla colorazione in blu di Prussia e dall'immunoistochimica con un anticorpo nucleo-specifico umano, dove le cellule positive a entrambe le metodiche erano esclusivamente nella regione danneggiata.

Tali capacità migratorie quindi sono probabilmente una funzione della loro reattività ai fattori chemiotattici e alla produzione di enzimi degradanti la matrice extracellulare.

INTERFERENZE FRA MSCs E CELLULE TUMORALI

Prove accumulate dalla letteratura scientifica suggeriscono che le MSCs hanno la capacità di migrare verso le sedi tumorali²⁰⁴ in risposta a un'ampia gamma di tipologie cellulari derivate dal cancro.

All'interno del microambiente tumorale (denominato come "TME" tumor microenvironment), le staminali possono esercitare, tramite interazioni dirette o indirette con le cellule tumorali, sia effetti stimolatori sia inibitori sulla loro crescita, invasione e metastasi (Figura 3).

Tuttavia, dal bilancio tra l'effetto pro-tumorigenico e anti-tumorale, quello risultante predominante sembra essere il primo e questo dipende da: tipo di tumore, eterogeneità intratumorale, ecologia dell'ambiente ospitante, ed eventualmente la composizione della stessa popolazione di MSCs.

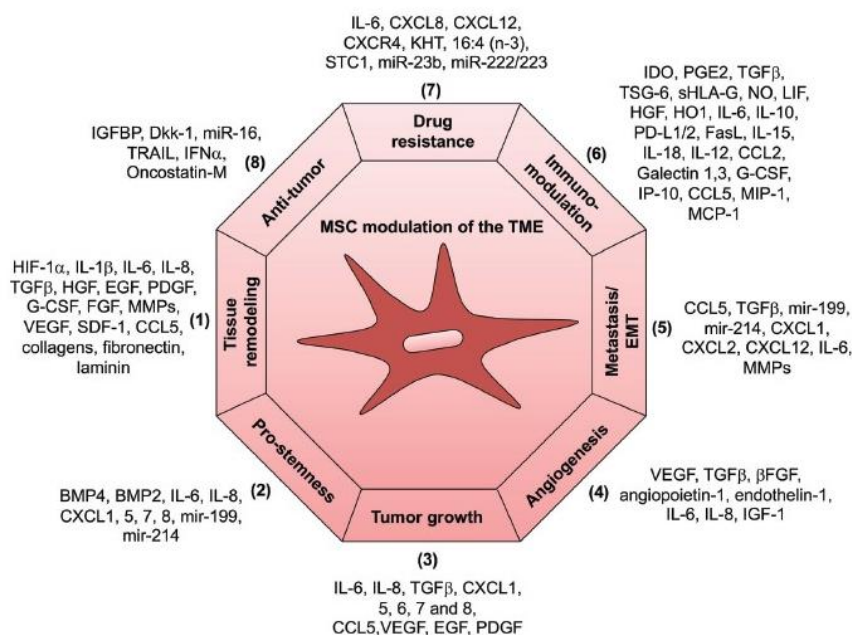


Figura 3. Mesenchymal stromal cells in cancer: a review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression, Sabine Galland, 2020²⁰⁵

All'interno del tumore primario, si è osservato che le MSCs hanno la capacità di guidare le cellule neoplastiche verso l'acquisizione della capacità invasiva e metastatica.

Le staminali inducono l'espressione sia della transizione da tipologia epiteliale a mesenchimale (EMT), sia dei geni correlati all'ipossia nelle cellule tumorali primarie e ne promuovono la disseminazione.¹⁷⁴

Inoltre svolgono anche le seguenti funzioni:

- depositano matrice extra-cellulare ECM;²⁰⁶
- partecipano al rimodellamento della TME;
- secernono IL-6 e TGF- β , che induce EMT;
- agevolano la creazione di una nicchia che promuova l'angiogenesi e l'invasione tumorale;²⁰⁷

EFFETTI DEL MICROAMBIENTE TUMORALE SUL FENOTIPO DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

La neoplasia libera dei segnali con la capacità di modulare il fenotipo delle MSCs residenti nei tessuti e reclutate dal tumore (chiamate "T-MSCs"), le quali andranno ad essere delle costituenti della massa tumorale e svilupperanno caratteristiche differenti da quelle appartenenti a tessuti normali (N-MSCs o MSCs non associate al tumore) o di midollo osseo (BM-MSCs).²⁰⁸

Possono comparire differenze tra le T-MSCs e le N-MSCs, soprattutto legate alla risposta verso citochine ed esosomi prodotti dal microambiente neoplastico.

Tale affermazione è sostenuta dalle osservazioni secondo cui le MSCs trattate con IFN- γ e TNF- α sovra-regolano l'espressione di TGF- β e VEGF.^{209,210}

Il TGF- β a sua volta può promuovere l'EMT, che può facilitare l'invasione e le metastasi.

I fattori IFN- γ e TNF- α possono incrementare gli effetti immunosoppressivi locali delle MSCs, favorendo in questo modo la disseminazione delle cellule tumorali.

Focalizzandoci ad esempio su uno specifico tumore, come quello al seno e alle ovaie, si è osservato che gli esosomi provenienti dalle cellule tumorali possono indurre le MSCs del tessuto adiposo ad adottare un fenotipo CAF (Fibroblasti Associati al Cancro) caratterizzato in parte da un'espressione sovra-regolata di α -SMA (marker della formazione di miofibroblasti), e possono anche stimolare l'espressione di SDF-1, VEGF, CCL5 (RANTES) e TGF- β da parte delle staminali.^{211,212}

Negli ultimi anni sono stati compiuti ulteriori studi nel tumore mammario, dimostrando che le MSCs residenti e derivate da midollo osseo, si differenziano verso una sottopopolazione con fenotipo simile a CAF che esprime diversi geni correlati alla risposta immunitaria.

L'analisi dell'espressione genica in queste cellule o nelle loro metastasi polmonari ha mostrato cambiamenti trascrizionali tessuto-specifici, il che significa che vi è influenza sulla programmazione delle cellule staminali da parte del microambiente.

Inoltre, queste cellule staminali CAF-simili son risultate importanti per la crescita del tumore, essendo più efficienti delle loro controparti residenti nel promuovere l'angiogenesi.

Da queste osservazioni si è potuto dedurre che le MSCs reclutate nei tessuti neoplastici possono essere riprogrammate in un tessuto specifico locale affinché inducano l'infiammazione promuovente il tumore e favoriscano l'angiogenesi e la crescita della neoplasia.²¹³

CARATTERISTICHE DELLE CELLULE MESENCHIMALI

STAMINALI ASSOCIATE AL TUMORE (T-MSCs)

Le T-MSCs non subiscono trasformazioni e sono euploidi, ovvero il numero di cromosomi è un multiplo intero (2n, 3n, 4n ecc...) di quello della cellula aploide (n).^{214,215}

La loro presenza è maggiore nei tessuti neoplastici che nei tessuti sani adiacenti^{174,216} e mostrano una capacità proliferativa nettamente aumentata rispetto alle cellule staminali associate ai distretti anatomici normali.^{215,217-219}

Inoltre, le T-MSCs mostrano sia un'abilità nel migrare più intensa delle N-MSCs sia una più potente capacità immunosoppressiva delle BM-MSCs.^{205,215,218-223}

E' stato dimostrato infine che promuovono la proliferazione del tumore²¹⁵ aumentando in proporzione le cellule staminali neoplastiche.^{215,224}

Andando ora ad approfondire l'argomento, partendo dal presupposto che riuscire a comprendere quale sia l'origine del cancro sarebbe un notevole progresso che permetterebbe di sviluppare un trattamento completo, negli ultimi due decenni numerosi studi hanno osservato che solo una piccola sottopopolazione di cellule tumorali possiede la capacità della tumorigenesi e son state denominate "cellule staminali del cancro" (CSC), o anche T-MSCs, come prima riportato.

Queste condividono differenti caratteristiche con le cellule staminali normali: sono in grado di auto-rinnovarsi per formare cellule figlie identiche mediante divisione cellulare e di differenziarsi in vari tipi di progenie.²²⁵

Le CSCs dei tumori solidi sono state identificate per la prima volta nel cancro al seno (CD44+CD24-/lowLin-), e successivamente in altri tipi di neoplasie comuni quali cerebrale, ovarico, prostatico, al colon, pancreatico, epatico, epidermico, polmonare, e sono stati suggeriti marcatori CSCs comuni o unici per questi tumori.^{226,227}

Un'altra caratteristica di queste è la resistenza alle terapie antitumorali convenzionali: posseggono infatti meccanismi endogeni di resistenza alle radiazioni e alla

chemioterapia, che conferiscono un vantaggio in termini di sopravvivenza rispetto alle controparti differenziate.^{228,229}

Inoltre possono indurre una diversa composizione delle cellule in un tessuto tumorale, che porta alla generazione di sottoclone fenotipicamente variegati, causando così un aumento della possibilità di lasciare una frazione resistente dopo la terapia antitumorale.²³⁰

Il microambiente circostante influenza in modo critico i tumori regolando la fisiologia delle CSCs: esso infatti non solo fornisce segnali che favoriscono la crescita, ma partecipa anche alla resistenza terapeutica, proteggendo le cellule tumorali dai danni indotti dalla terapia.²³¹

La presenza di CSCs all'interno di un tumore è frequentemente connessa ad una maggiore invasività e capacità metastatica,²³²⁻²³⁵ caratteristiche più salienti delle neoplasie maligne.

Studi recenti stanno approfondendo la plasticità delle CSCs che consiste in una transizione dinamica del fenotipo cellulare tra epiteliale e mesenchimale a seconda delle fasi di invasione o metastasi.²³⁶

Vi sono due concetti rappresentativi sulla loro origine: uno postula la presenza di cellule staminali adulte trasformate come loro fonte, e l'altro dimostra che le cellule tumorali differenziate possono essere riprogrammate per acquisire questo particolare fenotipo.²³⁷

Tali ricerche hanno mostrato che la riprogrammazione si verifica in un'ampia varietà tumorale e influisce sull'eterogeneità delle CSCs in due modi: tramite riprogrammazione di cellule non CSC geneticamente diverse, oppure tramite il passaggio dinamico di stato delle CSCs.^{225,238,239}

MECCANISMI DI RIPROGRAMMAZIONE

Segnali di staminalità e fattori di trascrizione (TF) fondamentali per la riprogrammazione

Le cellule staminali normali e le CSCs condividono le principali vie di segnalazione della staminalità, come Notch, Hedgehog, WNT/ β -Catenina, JAK/STAT e NF κ B,²⁴⁰ le quali posseggono ruoli fondamentali nel mantenimento delle loro proprietà e nella regolazione della loro differenziazione durante numerosi processi di sviluppo e progressione tumorale.

L'attivazione di questi segnali nella regolazione della plasticità delle cellule staminali agisce sia in tessuti normali sia in quelli tumorali, ad esempio, nella corteccia cerebrale

normale, i tipi di cellule gliali come gli astrociti reattivi hanno una multipotenza simile a quella delle cellule staminali neurali in vivo e in vitro e, attraverso l'induzione del segnale Sonic Hedgehog (SHH) dopo una lesione invasiva, si ri-differenziano in neuroni.²⁴¹

Questo significa che alcuni tipi di cellule differenziate agiscono come progenitori tissutali attraverso la de-differenziazione col fine di riparare le lesioni tissutali.

In maniera analoga, l'SHH secreto dalle cellule endoteliali promuove le proprietà simili alle CSCs delle cellule di glioma,²⁴² per cui l'esposizione ad appropriati segnali di staminalità permette di indurre meccanismi di de-differenziazione nei tessuti normali. Tali meccanismi sono utilizzati dalla neoplasia per costruire una gerarchia cellulare.

In alcuni studi è stato identificato che il processo di riprogrammazione in condizioni fisiologiche coincide in una trasformazione della cellula epiteliale in tipo mesenchimale, attraverso un processo denominato EMT (transizione epiteliale-mesenchimale) e questo si manifesta sia nelle cellule normali che in quelle tumorali.²⁴³

I meccanismi dell'EMT e delle CSCs condividono molti fattori di trascrizione (TF) come agenti determinanti, come Twist, ZEB1/2 e HIF e le vie di segnalazione di TGF- β , WNT/ β -Catenina, Notch e Hedgehog.²⁴⁴

Ultimamente, differenti studi hanno dimostrato l'importanza del segnale infiammatorio NF κ B mediato nella biologia delle CSCs, soprattutto nel MET.²⁴⁵

Per esempio il tumore al seno induce il programma EMT attraverso l'asse NF κ B-Twist attivato dalla stimolazione di TNF α .²⁴⁶

L'alterazione finale dell'espressione genica è sotto diretto controllo dei TF, nonostante le CSCs attivino le vie di segnalazione della staminalità, come la rete di riprogrammazione mediata da HGF-Cmet che richiede la funzione di Nanog, uno dei TFs embrionali.²⁴⁷

Il legame tra la riprogrammazione delle CSCs e le principali reti di TFs delle staminali è di fondamentale importanza nelle i-PSC (cellule staminali pluripotenti indotte) originate da cellule somatiche mediante espressione ectopica di 4 TF, OCT3/4, SOX2, KLF4 e cMYC,²⁴⁸ che hanno la funzione di regolare i vari geni necessari per la pluripotenza.

L'attivazione dei fattori di riprogrammazione delle iPSC è stata identificata in molti tipi di tumori quali il glioblastoma e i carcinomi della mammella, del fegato, della prostata e del polmone, soprattutto nelle CSCs.²⁴⁹⁻²⁵²

Alcuni studi che si occupano di questi TFs associati alla staminalità hanno dimostrato il loro ruolo nell'acquisizione di proprietà delle CSCs tramite esperimenti di gain-of-function.

Dunque per colpire queste cellule è necessario comprendere a fondo i segnali di riprogrammazione extracellulare come i ligandi, le loro cascate di segnali a valle e i TFs corrispondenti nelle CSCs (Fig. 4).

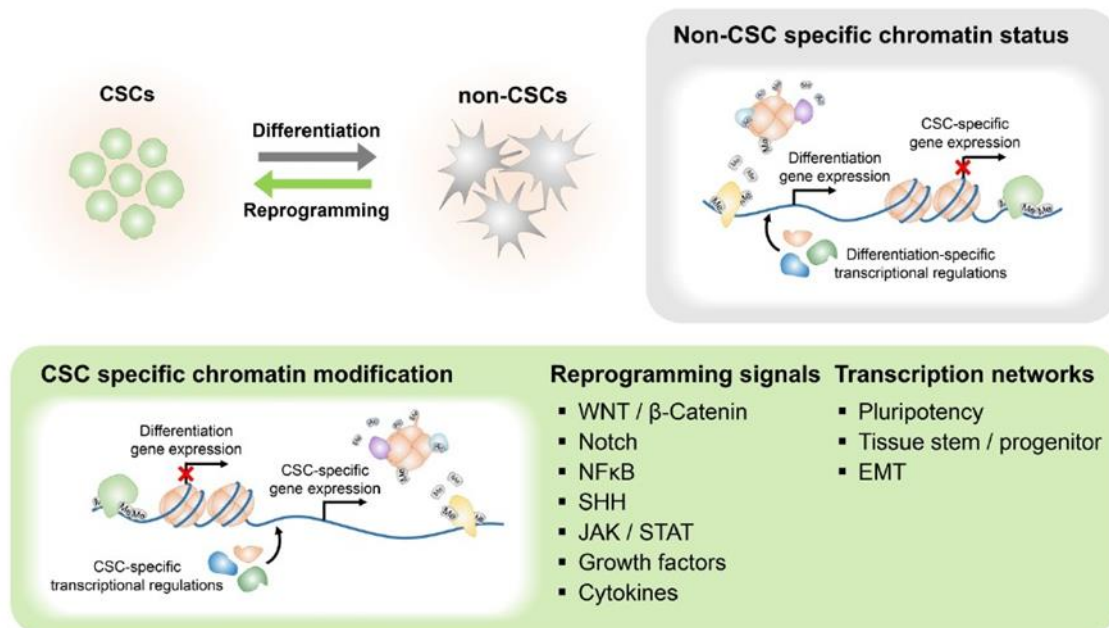


Figura 4. Vie di segnalazione principali e modifiche epigenetiche che regolano la riprogrammazione e la differenziazione delle CSC. *Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting*, Kiyoung Eun, 2017²⁵³

FATTORI DEL MICROAMBIENTE

La plasticità neoplastica è più influenzata dal suo microambiente piuttosto che dalle mutazioni durante il processo di riprogrammazione.

Le cellule staminali, nell'omeostasi dei tessuti normali, sono sottoposte a regolazione da parte di diversi segnali provenienti da microambienti specializzati che prendono il nome di "nicchie di cellule staminali",²⁵⁴ le quali sono analogamente necessarie alle CSCs per mantenere le loro proprietà.

Queste nicchie sono costituite da cellule endoteliali, cellule immunitarie, fibroblasti, ECM e i loro fattori secreti, come fattori di crescita o citochine.²³⁷

Le più soggette a studi sono quelle perivascolari e ipossiche, ma ci sono anche altri microambienti composti da varie cellule stromali.²³⁷

Le nicchie o i singoli microambienti delle CSCs sono importanti non solo per il mantenimento delle stesse, ma anche per la loro riprogrammazione.

Nicchia perivascolare

Per nicchia perivascolare si intende il microambiente intorno ai vasi sanguigni ed è cruciale per il mantenimento di popolazioni di MSCs e di CSCs nel tessuto tumorale attraverso interazioni dirette cellula-cellula o fattori solubili secreti.²⁵⁵

Nel 2007, è stato suggerito che esse contribuiscono al mantenimento del pool di CSCs che si auto-rinnovano nel glioma,²⁵⁶ dove recentemente si è osservato che le cellule endoteliali migliorano le loro proprietà di staminalità mediante l'attivazione del segnale Notch e la via di segnalazione dell'ossido nitrico (NO).²⁵⁷

In ugual modo, l'incremento dell'ID4 (inibitore della differenziazione 4) da parte del PDGF (fattore di crescita di derivazione piastrinica) e la segnalazione di NO promuovono l'attività di Jagged1-Notch, con conseguente auto-rinnovamento e tumorigenesi.²⁵⁸

Le cellule endoteliali SHH-positive incrementano, in quelle del glioma, vari fattori di staminalità, come SOX2, OLIG2 e BMI1, generando cellule di glioma CD133+ CSC-like.²⁴²

Oltre ai tumori cerebrali, sono stati identificati meccanismi di riprogrammazione anche di altre tipologie neoplastiche nella nicchia vascolare, dove ad esempio il VEGF (fattore di crescita dell'endotelio vascolare) promuove le proprietà di staminalità del cancro nel carcinoma cutaneo a cellule squamose²⁵⁹ oppure, in quello della testa e del collo, l'EGF (fattore di crescita epidermico) secreto dalle cellule endoteliali induce l'EMT delle cellule tumorali e le porta ad acquisire caratteristiche di staminalità.²⁶⁰

Ipossia:

L'ossigeno è un fattore essenziale per il metabolismo cellulare e la condizione fisiologica in cui è carente viene denominata ipossia, causa di grave danni.

Alcune cellule presentano meccanismi di risposta e di adattamento a questo fenomeno che sono mediati principalmente dalle proteine sensore dell'ossigeno, chiamati fattori inducibili dell'ipossia (HIF).

Questa situazione ha anche un effetto benefico sullo sviluppo embrionale e nel mantenimento delle funzioni delle cellule staminali,²⁶¹ ma il cancro utilizza questi meccanismi legati alle cellule staminali per mantenere o generare CSCs in ipossia.

Nei neuroblastomi HIF1 α e HIF2 α , stabilizzati in tale condizione, cambiano i pattern di espressione genica inducendo la de-differenziazione in cellule progenitrici simpatiche simili alla cresta neurale, esprimenti Notch-1 e c-Kit e, inoltre, anche l'incremento di ID2 da parte di HIF1 svolge un ruolo nel de-differenziamento.²⁶²

Questo fenomeno insieme all'HIF induce la demetilazione m6A mediata da ALKBH5 dell'mRNA di Nanog e la sua stabilizzazione nel carcinoma mammario.²⁶³

L'ipossia, causando un impoverimento dei nutrienti e dell'ossigeno, è una condizione sfavorevole per la crescita cellulare e per molti processi biosintetici anche nelle cellule tumorali, per cui sia un adattamento sia un'evasione da questa può rappresentare una possibile strategia di sopravvivenza.

L'EMT è infatti il fenomeno più rilevante con l'invasività cellulare e la riprogrammazione del cancro in ipossia: HIF1 α regola TF trascrizionalmente noti correlati all'EMT, come ZEB1 e Twist.^{264,265}

In aggiunta, alcuni studi hanno osservato che le vie di segnalazione della staminalità coinvolgenti Notch, WNT/ β -Catenina, Hedgehog e NF κ B sono potenzialmente associati all'ipossia e all'EMT.²⁶⁶

Nel carcinoma mammario, tale condizione induce la segnalazione di Jagged2-Notch, che stimola i programmi di EMT, provocando metastasi e l'acquisizione di proprietà di cellule staminali.²⁶⁷

Altre cellule stromali

Esistono numerose tipologie di cellule stromali all'interno dei tessuti tumorali (cellule immunitarie, stromali mesenchimali, fibroblasti), che possono interagire e promuovere la plasticità delle CSCs.

La neoplasia modula le cellule immunitarie specialmente attraverso la secrezione di varie citochine per favorire la progressione del tumore piuttosto che attaccarlo.

I fattori associati all'infiammazione hanno la capacità di attivare la rete di riprogrammazione che porta alla generazione di CSCs.

Il reclutamento di monociti e macrofagi nel tessuto neoplastico porta all'invasione e alle metastasi, creando, mediante il potente stimolare dell'EMT TGF- β , un ambiente immunosoppressivo.

Inoltre l'EMT viene indotto sia tramite l'attivazione di NF κ B e STAT3, mediante citochine infiammatorie come IL-6 e STAT3,²⁶⁸ sia di TNF α .^{269,270}

Questi microambienti immuno-associati si generano nei tessuti tumorali, partecipando alla loro plasticità: ad esempio i fibroblasti, chiamati fibroblasti associati al cancro (CAF), promuovono la progressione del tumore e hanno un ruolo nella de-differenziazione.

Altre considerazioni sono inerenti ai fattori secreti dai miofibroblasti, come il HGF che aumenta l'attività del segnale WNT e le proprietà di staminalità delle CSCs LGR5-positivo nei tumori colon-rettali,²⁷¹ oppure ancora considerando una cellula stellata, simile ai miofibroblasti nel pancreas, promuovente il fenotipo CSCs attraverso Nodal/Activin.²⁷²

Queste valutazioni mostrano che le citochine o i fattori di crescita di varie cellule stromali attivano le proprietà delle cellule tumorali e inducono metastasi.

Essendo che la maggior parte delle vie di segnalazione mediate dalle citochine può essere associata a risposte infiammatorie, le risposte indotte dalle terapie possono causare un microambiente di flogosi che favorisce i tumori maligni: ad esempio CAF e IL-17 aumentano le attività biologiche delle cellule staminali del cancro colon-rettale dopo la chemioterapia, con conseguente chemioresistenza e recidiva.²⁷³

MODIFICAZIONI EPIGENETICHE

La determinazione finale di una specifica tipologia cellulare dipende dallo stato epigenetico dei geni dei fattori trascrizionali tipici di quel tipo cellulare.

Durante la generazione delle iPSC, sono fondamentali l'espressione di TFs tipici delle cellule staminali embrionali (ESCs) e la presenza di modulatori epigenetici che guidano meccanismi specializzati aventi un ruolo fondamentale nel reset della loro identità durante il processo di riprogrammazione.^{274,275}

Tali TFs della staminalità e le modifiche epigenetiche sono considerati elementi critici anche per la riprogrammazione delle cellule tumorali in CSCs: sono difatti stati riportati studi inerenti alla la rilevanza di vari modificatori epigenetici nei tumori.

Per esempio, le cellule neoplastiche reprimono i geni legati al differenziamento o i geni soppressori del tumore attraverso il silenziamento epigenetico delle proteine del gruppo Polycomb, che agiscono nella differenziazione e nello sviluppo cellulare attraverso la repressione trascrizionale.^{276,277}

Lo stato di metilazione di ogni tipo di cancro varia, ma l'insieme dei geni ipermetilati di un determinato tipo di tumore è in comune con l'espressione delle CSE.²⁷⁸

Ad esempio i fattori chiave del complesso repressivo di polycomb 2 (PRC2), quali l'enhancer of zeste omologo 2 (EZH2) e il soppressore di zeste omologo 12 (SUZ12), sono sovraespressi nei tumori dell'ovaio, della mammella, della prostata e del colon, risultando cruciali per il mantenimento della loro popolazione di CSCs.²⁷⁹⁻²⁸²

L'espressione ectopica di SUZ12 in cellule di cancro al seno differenziato consegue alla formazione di CSCs²⁸⁰ e nelle cellule staminali leucemiche il BMI1, una subunità chiave del complesso PRC1, è regolata dal controllo del modello di metilazione del suo promotore da parte del SALL4, fattore di trascrizione embrionale.

Altro esempio ancora si trova nel glioblastoma, dove BMI1 e EZH2 sono altamente espressi nelle cellule iniziali del tumore.

Le DNA metiltransferasi (DNMT), quali la DNMT1 e la DNMT3 (essenziali per la metilazione ex novo delle isole CpG) sono fondamentali per il mantenimento dei modelli di metilazione esistenti e sono potenziali fattori di riprogrammazione delle CSCs.

Le due metiltransferasi citate svolgono una funzione cruciale nella regolazione della malignità di queste cellule della mammella e di varie cellule staminali leucemiche, rispettivamente.^{283,284}

La mixed-lineage leukemia 1 (MLL1), altro enzima istone metiltransferasi, è necessaria per le proprietà di auto-rinnovamento indotte dall'ipossia,²⁷⁵ e la JARID1B, una demetilasi degli istoni, partecipa nella dinamica della popolazione delle CSCs nei melanomi.²⁸⁵

In conclusione, un'epigenetica aberrante induce o sopprime la trascrizione di fattori di staminalità o di differenziazione, con conseguente attivazione di varie vie di segnalazione della staminalità nelle cellule neoplastiche differenziate.

Per di più al fine di spiegare la plasticità variabile del cancro, lo stato della cromatina può anche essere strettamente associato con i microambienti circostanti, piuttosto che con un'unica mutazione genetica: ad esempio i tumori al seno differenziati acquisiscono caratteristiche CSCs grazie alla segnalazione di ZEB1, incrementate dalla segnalazione di TGF β .²⁸⁶

Le dinamiche della cromatina, in situazioni fisiologiche e con fattori ambientali corretti, sono regolate nel complesso da programmi cellulari regolari controllati da riconoscitori di stimoli, mediatori di segnale e TFs.

CAPITOLO 4

UTILIZZO DELLE MSCs NELLA TERAPIA TUMORALE

Negli ultimi anni c'è stato un aumento degli studi clinici che utilizzano le cellule mesenchimali staminali per il trattamento dei tumori.²⁸⁷

In questi contesti le MSCs sono utilizzate come strumento di veicolazione genica per terapie mirate;²⁸⁸⁻²⁹⁰ ad esempio sono state manipolate col fine di trasportare interleuchine per ottimizzare la sorveglianza immunitaria antitumorale o come agenti di interferoni (IFN- α e INF- β)¹⁴² oppure ancora come vettori di virus oncolitici.^{291,292}

Le MSCs sono anche state sottoposte a test come portatrici di agenti anti-angiogenici, proteine pro-apoptotiche (ad esempio TRAIL)²⁹³ e antagonisti dei fattori di crescita.

In aggiunta è stato osservato che a seguito di esposizione a dosi elevate di farmaci chemioterapici, come la gemcitabina, riescono ad accumulare e distribuire l'agente anti-neoplastico senza subire modificazioni genetiche, contribuendo a ridurre la crescita tumorale.^{294,295}

Grazie alla loro capacità di migrare preferenzialmente verso siti tumorali (neoplasie primarie e metastatiche), all'elevata biodisponibilità, alla natura non immunogenica e alla relativa facilità di manipolazione in vitro, queste cellule sembrano essere interessanti soggetti per delle nuove terapie cellulari.

Tuttavia, la loro potenziale attività pro-tumorale, soprattutto in caso di sovversione dall'ECM, solleva dubbi sulla loro sicurezza.

INIBIZIONE DEGLI EFFETTI PRO TUMORALI DELLE MSCs

Il blocco diretto della funzione immunosoppressiva delle MSCs e la riprogrammazione per rendere le loro proprietà immunostimolanti dominanti sulle opposte, sono due metodiche che potrebbero essere utilizzate per indirizzare le staminali nella TME e contrastare i propri effetti immunosoppressivi.²⁰⁷

L'attività delle MSCs può essere variata in differenti modi: con l'utilizzo di farmaci inibenti una o diverse molecole immunosoppressive quali IDO, TGF- β ; con l'applicazione di anticorpi inibitori (ad es. anticorpi anti-PDGF, anti-EGFR) che bloccano l'effetto dei fattori di crescita coinvolti nel crosstalk MSC-cellule tumorali²⁹⁶⁻²⁹⁸ e stimolano la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC); mediante sia inibitori delle sheddasi/ADAMs (abbreviazione di disintegrina e metalloproteinasi), una famiglia di metalloendopeptidasi transmembrana a singolo passaggio, sia inibitori delle tirosin-chinasi.

Tra questi approcci, alcuni trovano il loro bersaglio sia nelle MSCs sia nelle cellule tumorali: ad esempio gli inibitori della HMG-CoA reduttasi (statine) diminuiscono il mevalonato, il quale prodotto metabolico è fondamentale per il metabolismo di entrambe ed è anche necessario per sviluppare una risposta immunitaria e per uccidere le cellule neoplastiche.

Il PD-L1 (ligando di morte programmata) è una proteina espressa sulla superficie del tumore e regola la risposta immunitaria: legandosi a PD-1 espresso sui linfociti del nostro sistema immunitario, spegne la capacità di reagire contro il tumore.

La sua espressione nelle MSCs è soggetta ad up-regulation dell'INF- γ ²⁹⁹ e PD-L1/PD1 è coinvolto nella regolazione della proliferazione di queste cellule, oltre che dei linfociti B e T.^{300,301}

Le proteine ADAMs possono essere rilasciate negli esosomi e microvescicole e hanno la capacità di liberare i ligandi delle MSCs per le cellule NK diminuendo il riconoscimento delle cellule tumorali da parte di queste.

La riprogrammazione delle cellule mesenchimali staminali da un fenotipo immunosoppressivo a uno immunostimolante può essere un ulteriore approccio promettente.

TRATTAMENTI DELLE FORME TUMORALI MEDIANTE

MSCs

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono vettori promettenti per la somministrazione di agenti antitumorali sfruttando il loro tropismo verso il microambiente neoplastico. La migrazione verso il tumore è determinata da segnali infiammatori simili a quelli di una ferita cronica che non guarisce.³⁰² È stato dimostrato che le MSCs sono attivamente attratte verso il carcinoma epatico,³⁰³ il carcinoma mammario,³⁰⁴ il glioma³⁰⁵ e nicchie pre-metastatiche.³⁰⁶

Queste cellule hanno la capacità di migrare in siti flogistici e traumatici conseguentemente sia ad un gradiente di chemioattrattori presenti nella matrice extracellulare (ECM) e nel sangue periferico,³⁰⁷ sia a fattori locali quali l'ipossia, l'ambiente delle citochine e i ligandi dei recettori Toll-like; una volta che questi segnali giungono alle cellule, promuovono l'espressione da parte delle MSCs di fattori di crescita che accelerano la rigenerazione tissutale.³⁰⁸

In seguito all'accumulo nei siti di formazione e crescita della neoplasia, le staminali possono differenziarsi in periciti o in TAFs (fibroblasti associati al tumore), andando così a dare origine ad un microambiente di supporto alla crescita e secernendo fattori trofici quali il VEGF (fattore di crescita dell'endotelio vasale), IL-8 (l'interleuchina 8), il TGF- β (fattore di crescita trasformante b), l'EGF (fattore di crescita epidermico) e il PDGF (fattore di crescita di derivazione piastrinica).³⁰⁹

Ad esempio, si è dimostrato che le MSCs sono in grado di stimolare la crescita tumorale e la vascolarizzazione all'interno di un modello di xenotrapianto di cancro del colon-retto in vivo e riescono anche ad indurre l'attivazione di Akt ed ERK nelle cellule endoteliali, causandone così l'aumento del reclutamento e il potenziale angiogenico.³¹⁰

In esperimenti di co-coltura in vitro, queste cellule hanno stimolato l'invasione e la proliferazione delle cellule mammarie tumorali.³⁰²

Le MSCs possono anche sopprimere, oltre alla progressione del tumore, la crescita mediante l'arresto del ciclo cellulare e l'inibizione della proliferazione, con il blocco della via PI3K/AKT e dell'espressione dei geni soppressori del tumore.³¹¹

Le proprietà antitumorali sono descritte in esperimenti sia in vitro sia in vivo di vari modelli di tumore; ad esempio, le MSCs iniettate in un modello in vivo di sarcoma di Kaposi ne hanno soppresso la crescita tumorale³¹² e risultati analoghi sono stati riportati per l'epatoma,³¹³ per il cancro del pancreas,^{314,315} il cancro alla prostata³¹⁶ e il melanoma.³¹⁷

Le differenze nell'attività antitumorale potrebbero essere dovute al loro diverso stato di attivazione, che verrà discusso in un ulteriore paragrafo.³¹⁸

Ad ogni modo è osservabile con certezza che queste cellule posseggono un maggiore tropismo verso i tumori che le rende vettori ideali per una terapia antitumorale mirata.²⁸⁸

MSCs GENETICAMENTE INGEGNERIZZATE CON ATTIVITA' ANTI-TUMORALE

In alcuni studi pionieristici sul rapporto tra MSCs e tumori, le cellule sono state geneticamente modificate con interferone β (IFN- β) per poi essere iniettate in modelli di xenotrapianto di topi con melanoma umano, dove si osservava una diminuzione della crescita tumorale e un aumento di circa 2 volte della sopravvivenza rispetto ai controlli.³¹⁹

In aggiunta in un modello murino di xenotrapianto di melanoma, è stato dimostrato che il carico supplementare di MSCs canine modificate con IFN- β e basse quantità di cisplatino, portavano ad un incremento significativo dell'efficacia della terapia antitumorale.³²⁰

Attualmente, oltre all'IFN- β , esistono diverse altre citochine con attività anti-tumorale e geni onco-soppressori che si utilizzano per la modificazione genetica delle MSCs (Tabella 2): una delle più citochine pro-apoptotiche più promettenti a livello terapeutico è il TNF- α (fattore di necrosi tumorale) e il TRAIL (ligando di induzione dell'apoptosi), che induce selettivamente la morte programmata nelle cellule neoplastiche.

L'effetto antitumorale di staminali modificate con TRAIL è stato osservato in differenti tipologie neoplastiche dove in nessuna è risultato tossico per cellule e per tessuti sani.^{321,322}

TABLE 1 | The usage of genetically engineered Mesenchymal stem cells for target delivery of therapeutic agents with anti-tumor activity.

Agent	Mechanism of action	Model	Reference
IFN- α	Immunostimulation, apoptosis induction, angiogenesis suppression	Immunocompetent mouse model of metastatic melanoma	Ren et al., 2008a
IFN- β	Increased activity of NK cells, inhibition of Stat3 signaling	Mouse 4T1 breast tumor model Mouse prostate cancer lung metastasis model PC-3 (prostate cancer) xenograft model PANC-1 (pancreatic carcinoma) xenograft model	Ling et al., 2010 Ren et al., 2008b Wang et al., 2012 Kidd et al., 2010
IFN- γ	Immunostimulation, apoptosis induction	<i>In vitro</i> human leukemia cell line K562	Li et al., 2006
TRAIL	Caspase activation, apoptosis induction	Orthotopic model of Ewing sarcoma Subcutaneous model of lung cancer Xenograft model of human malignant mesothelioma Colo205 (colon cancer) xenograft tumor model Xenograft model of human myeloma Xenograft model of human tongue squamous cell carcinoma (TSCC) Eca-109 (esophageal cancer) xenograft model Xenograft model of human glioma	Guiho et al., 2016 Mohr et al., 2008; Yan et al., 2016 Sage et al., 2014; Lathrop et al., 2015 Marini et al., 2017 Cafforio et al., 2017 Xia et al., 2015 Li et al., 2014 Kim et al., 2010; Choi et al., 2011; Wang et al., 2017
IL-2	Immunostimulation	Rat glioma model	Nakamura et al., 2004
IL-12	Immune system cell activation	Liver cancer H22 and MethA ascites models Mouse model bearing subcutaneous SKOV3 (ovarian carcinoma) tumor explants Xenograft model of human glioma	Han et al., 2014 Zhao et al., 2011 Hong et al., 2009; Ryu et al., 2011
IL-21	Immunostimulation	Mouse model of B-cell lymphoma A2780 (ovarian cancer) xenograft model	Kim et al., 2015 Hu et al., 2011
PTEN	Induction of G(1)-phase cell cycle arrest	<i>In vitro</i> glioma cell line	Yang Z.S. et al., 2014; Guo et al., 2016
CX3CL1	Cytotoxic T cells and NK cells activation	Mice bearing lung metastases of C26 (colon carcinoma) and B16F10 (skin melanoma) cells	Xin et al., 2007
HSV-TK/GCV	Drug precursors transformation	9L (glioma) xenograft model <i>In vitro</i> glioma cell lines B-MG-BA, 42-MG-BA and U-118 MG	Uchibori et al., 2009 Matuskova et al., 2010
CD/5-FC	Drug precursors transformation	Subcutaneous model of melanoma or colon cancer Cal72 (osteosarcoma) xenograft model	Kucerova et al., 2007, 2008 NguyenThai et al., 2015
NK4	Apoptosis induction, angiogenesis and lymphangiogenesis suppression	C-26 lung metastasis model Nude mice bearing gastric cancer xenografts MHCC-97H (liver carcinoma) xenograft model	Kanohira et al., 2007 Zhu et al., 2014 Cai et al., 2017
Oncolytic viruses	Tumor destruction by virus replication	Orthotopic breast and lung tumors Mouse glioblastoma multiforme models A375N (melanoma) tumor xenografts	Hakkarainen et al., 2007 Duebgen et al., 2014 Bolontrade et al., 2012
PEDF	Inhibiting tumor angiogenesis, inducing apoptosis, and restoring the VEGF-A/sFLT-1 ratio	Lewis lung carcinoma (LLC) xenograft model Mice bearing U87 gliomas CT26 CRPC model	Chen et al., 2012 Su et al., 2013 Yang et al., 2016
Apoptin	Tumor destruction, caspase 3 activation	HepG2 (hepatocellular carcinoma) tumor xenografts Lung carcinoma xenograft model	Zhang et al., 2016 Du et al., 2015
HNF4- α	Wnt/ β -catenin pathway inhibition	SK-Hep-1 (hepatocellular carcinoma) tumor xenografts	Wu et al., 2016
miR-124	Increase the differentiation of glioma stem cells by targeting SCP-1 or CDK6	Glioma tumor cells in a spheroid cell culture system <i>In vitro</i> human glioblastoma multiforme cell line	Lee et al., 2013 Sharif et al., 2017
miR-145	Sox2 and Oct4 expression inhibition	Glioma tumor cells in a spheroid cell culture system	Lee et al., 2013

Tabella 2. Utilizzo di cellule staminali mesenchimali geneticamente modificate per la somministrazione mirata di agenti terapeutici con attività antitumorale. Application of Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Agent Delivery in Anti-tumor Treatment, Daria S. Chulpanova, 2018. ²⁸⁸

È stato notato che le MSCs ricombinanti attivate con TNF- α in combinazione con l'esposizione a radiazioni, hanno la capacità di aumentare significativamente il livello di espressione di TRAIL endogeno,³²³ che può essere osservato anche in quelle modificate mediante IFN- γ ³¹⁵.

E' stato suggerito che le staminali modificate col TRAIL potrebbero essere usate in combinazione con agenti chemioterapici come il cisplatino³²⁴ col fine di aumentarne il potenziale terapeutico.

Ciononostante, alcune neoplasie posseggono meccanismi di resistenza a TRAIL tramite la sovraespressione di XIAP (X-linked inhibitory of apoptosis protein), che inibisce l'attivazione delle caspasi 3 e 9.

Le proprietà anti-apoptotiche della XIAP sono regolate dallo Smac (il secondo attivatore delle caspasi derivato dai mitocondri) che ha il ruolo di impedire l'interazione fisica tra XIAP e le caspasi, bloccando così l'inibizione della apoptosi.³²⁵

In uno studio³²⁶ sono state utilizzate le cellule staminali mesenchimali per la distribuzione e l'espressione simultanea di nuove forme di Smac e TRAIL, penetrabili dalle cellule.

L'efficacia di tale metodo è stata dimostrata nella linea cellulare di cancro al seno MCF-7 resistente a TRAIL.

Sono state considerate come agenti anti-tumorali anche le interleuchine per il loro essere regolatrici di infiammazione e di risposte immunitarie: ad esempio, le MSCs modificate con IL-12 sono in grado di diminuire le metastasi e di indurre l'apoptosi delle cellule tumorali in topi con melanoma, cancro al polmone ed epatoma del 75%, 83% e 91% rispettivamente.

È stata riportata anche l'attivazione di cellule immunitarie quali linfociti T citotossici e cellule natural killer.³²⁷

Uno studio³²⁸ ha dimostrato che l'iniezione di staminali modificate derivate dal liquido amniotico ed esprimenti IL-2, ha causato l'induzione dell'apoptosi nelle cellule di cancro ovarico in un modello in vivo di murino.

Un'altra ricerca³²⁹ ha portato che le MSCs esprimenti uno degli oncosoppressori principali, il PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), sono capaci di migrare verso le cellule tumorali di glioblastoma cerebrale (DBTRG) in vitro.

L'attività antitumorale delle staminali modificate in questa metodica è stata descritta anche in un ulteriore studio, in co-coltura con cellule di glioma U251.³³⁰

La somministrazione mediata da MSCs e le proprietà antitumorali sono state descritte anche per altre proteine quali IFN- α , IFN- γ , CX3CL1, apoptina, PEDF e ncRNA (miR-124 e miR-145).

La modificazione delle MSCs per la co-espressione di diverse proteine terapeutiche può aumentare il loro potenziale antitumorale.

È stato dimostrato che il TRAIL e la timidina chinasi del virus herpes simplex chinasi (HSV-TK) modificati in presenza di ganciclovir (GCV) sono stati in grado di ridurre significativamente la crescita del tumore e di aumentare la sopravvivenza di topi con glioblastoma multiforme altamente maligno (GBM).³³¹

L'effetto della somministrazione diretta della maggioranza di questi agenti viene spesso limitato dalla loro breve emivita nell'organismo e dalla marcata tossicità nei confronti delle cellule normali non cancerose.

L'uso delle MSCs per la somministrazione delle proteine terapeutiche sopra citata, aiuta a minimizzare i problemi precedentemente riportati grazie alla capacità di queste cellule di migrare selettivamente verso i siti tumorali e di esercitare effetti terapeutici a livello locale, aumentando così significativamente la concentrazione dell'agente nella neoplasia e riducendone la tossicità sistemica.

Un altro approccio promettente è la veicolazione di virus oncolitici mediante le cellule staminali mesenchimali. Per esempio, alcuni ricercatori³³² le hanno utilizzate per trasportare l'herpes simplex (oHSV), approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento del melanoma, in modelli di metastasi di tale tumore cerebrale umano in topi immunodeficienti e immunocompetenti.

Si è osservato che le MSC-oHSV introdotte erano capaci di dirigersi verso il sito di formazione neoplastico, prolungando notevolmente la sopravvivenza dei topi.

Nel modello immunocompetente, una combinazione di MSCs-oHSV e blocco di PD-L1 incrementa la produzione di IFN- γ causando la produzione di linfociti T CD8+ infiltranti il tumore e determinando un incremento significativo della sopravvivenza mediana degli animali trattati.³³²

MSCs VEICOLANTI FARMACI ANTI-NEOPLASTICI

La relativa resistenza delle cellule staminali mesenchimali ai farmaci chemioterapici citostatici e citotossici unita alla capacità di migrazione, permettono di cercare ed individuare nuovi metodi per utilizzarle nella somministrazione mirata di agenti terapeutici direttamente ai siti tumorali.

Uno studio³³³ ha dimostrato che le cellule stromali SR4987 BDF/1 provenienti dal midollo osseo³²⁵ di topo possono essere un serbatoio di doxorubicina (DOX), la quale può essere conseguentemente rilasciata sia sotto forma di metaboliti, sia nella sua forma originale.

È stato inoltre evidenziato che le MSCs possono assorbire e rilasciare efficacemente paclitaxel (PTX) in forma attiva,³³⁴ DOX, e gemcitabina (GCB), che posseggono un effetto inibitorio in vitro sul carcinoma a cellule squamose della lingua (SCC154).³³⁵

Un'altra ricerca³³⁶ ha riscontrato che la concentrazione massima di PTX non influenzante la vitalità delle MSCs è di 10 000 ng/mL, che è però già sufficiente a ridurre la vitalità di alcuni tipi di cellule tumorali, come quelle leucemiche umane.

Le indagini in vivo dimostrano che le MSCs caricate con PTX (MSC-PTX) dimostrano una forte attività antitumorale, inibendo la crescita delle cellule tumorali e la vascolarizzazione della neoplasia in un modello murino di xenotrapianto MOLT-4 (leucemia).³³⁶

L'attività anti-neoplastica delle staminali è studiata su differenti tipologie cellulari tumorali: ad esempio, un gruppo di ricerca³³⁷ ha dimostrato che le MSC-PTX sopprimono la proliferazione delle cellule di mieloma umano RPMI-8226 in un sistema di coltura dinamica 3D in vitro.

La caratteristica antitumorale di queste è stata ulteriormente confermata in vitro in relazione alle cellule di carcinoma pancreatico.³³⁸

Un altro studio³³⁹ ha mostrato che il cisplatino (CDDP) non ha ottenuto nessun effetto significativo sulla morfologia cellulare, sull'adesione o sull'induzione dell'apoptosi nelle MSCs e che non ha nessuna influenza sull'immunofenotipo o sul potenziale di differenziazione delle staminali.

Pertanto, le MSCs sono considerate vettori promettenti per la somministrazione di CDDP ai siti tumorali.

Oltre ai farmaci chimici in forma solubile, le staminali sono in grado di assorbire e trasportare nanomateriali contenenti agenti chemioterapici, ad esempio cellule caricate con nanoparticelle di silice contenenti DOX hanno portato ad un incremento significativo dell'apoptosi delle cellule di glioma U251 in vivo.³⁴⁰

In un ulteriore studio³⁴¹ sono state utilizzate MSCs provenienti da due fonti differenti (tessuto adiposo di cane e midollo osseo) col fine di studiare l'attività antitumorale delle staminali e del PTX su cellule di glioma umano (T98G e U87MG).

MICROVESCICOLE DERIVATE DA MSCs: DEFINIZIONE ED APPLICAZIONI

Le vescicole extracellulari sono strutture racchiuse da una membrana a doppio strato fosfolipidico di dimensioni nanometriche, secrete sia in condizioni fisiologiche che patologiche, contenenti proteine funzionali biologicamente attive e acidi nucleici (tra cui mRNA e microRNA),³⁴² lipidi, metaboliti, fattori di crescita e citochine, che agiscono come trasportatori versatili di questi contenuti tra cellule.³⁴³

Le EVs possono contribuire al decorso di differenti malattie, compresi tumori.³⁴⁴

Queste particelle sono in grado di agire come mediatori paracrini trasferendo biomolecole tra cellule tumorali, cellule stromali, fibroblasti, cellule endoteliali e cellule immunitarie, permettendo così di facilitare la comunicazione in tutto il microambiente tumorale.

Le vescicole extracellulari (EVs) comprendono sia microvescicole (MVs) sia esosomi e vengono rilasciate da un gran numero di cellule, svolgendo un ruolo cardine nella comunicazione intercellulare.

Pertanto si ritiene che le microvescicole siano coinvolte nella patogenesi del cancro, nella sua progressione, nelle metastasi e nell'immunomodulazione.

Nonostante il notevole interesse che le MVs stanno ricevendo come agente terapeutico in grado di sostituire le terapie cellulari con MSCs, è stato osservato che le MVs derivate da MSCs possono promuovere la progressione di differenti tipologie tumorali: ad esempio sono risultate capaci di facilitare la migrazione delle cellule di cancro al seno MCF7, tramite attivazione della via di segnalazione Wnt;³⁴⁵ oppure ancora di promuovere la progressione delle cellule di carcinoma nasofaringeo³⁴⁶ e anche di aumentare la proliferazione e il potenziale metastatico delle cellule neoplastiche gastriche.³⁴⁷

Le MVs sono in grado inoltre di incrementare la resistenza delle cellule tumorali ai farmaci: riescono ad indurre la resistenza al 5-fluorouracile nelle cellule di tumore gastrico attivando il sistema CaM-Ks/Raf/MEK/ERK.

In uno studio recente³⁴⁸ è stato dimostrato che una possibile causa di aumento della resistenza alla chemioterapia risiede nei micro-RNA inclusi nelle microvescicole, come il miR-222/223, che favoriscono la resistenza delle cellule di tumore mammario nel midollo osseo.

In realtà però si sono ottenuti risultati contrastanti da varie ricerche: in una di queste³⁴⁹ è stato osservato che le microvescicole isolate dal midollo osseo e dal sangue del cordone ombelicale hanno causato la soppressione della divisione inducendo l'apoptosi nelle cellule di glioblastoma; tuttavia, in questo stesso studio, le MSCs derivate dal tessuto adiposo hanno mostrato l'effetto opposto stimolando la proliferazione delle cellule tumorali.

Tali differenze potrebbero essere spiegate dallo stato di attivazione delle cellule parentali da cui hanno preso origine le MVs.

Una delle possibili metodiche per utilizzare le MVs in terapia è tramite il priming/caricamento di queste strutture con agenti terapeutici.

Altri ricercatori³³⁴ hanno provato che l'attività antitumorale delle MSCs-PTX, cellule stromali caricate con l'agente chemioterapico paclitaxel, potrebbe essere dovuta al rilascio di un gran numero di microvescicole da parte delle cellule mesenchimali staminali: infatti queste ultime, caricate con PTX, mostrano strutture simili a vacuoli con un accumulo di MVs nello spazio extracellulare senza modificazioni significative nella morfologia cellulare.

La presenza di PTX nelle MVs è stata confermata mediante spettroscopia in trasformata di Fourier.

Il rilascio di PTX da MVs si è dimostrato capace di attività antitumorale su di un modello adenocarcinoma pancreatico umano CFPAC-1 in vitro.³³⁴

Questa scoperta è stata supportata dai recenti studi³⁵⁰ che hanno dato dimostrazione dell'attività antitumorale di MVs derivate da MSC-PTX e MSC-GCB su cellule di tumore pancreatico in vitro.

Alcuni ricercatori³⁵¹ hanno studiato l'attività anti-neoplastica di staminali derivate da MVs trasportanti TRAIL ricombinante (rTRAIL) sulla loro superficie.

La coltivazione di cellule di carcinoma mammario M231 in presenza di microvescicole ha causato l'induzione dell'apoptosi nelle cellule tumorali ma non nelle cellule epiteliali bronchiali umane normali (HBEC).

Si può quindi affermare che l'utilizzo di microvescicole derivate da cellule mesenchimali staminali con rTRAIL sulla superficie si è rivelato più efficace dell'uso di rTRAIL puro.³⁵¹

L'applicazione più comune delle EVs si fonda sulle loro proprietà di trasporto e consegna di materiale funzionale a cellule mirate, rendendole adatte ad essere utilizzate come veicoli di farmaci; è stato osservato che le MVs possono ospitare biomolecole endogene antitumorali che possono essere sfruttate come agenti terapeutici.

A differenza dei veicoli di trasporto farmacologico comunemente utilizzati quali i liposomi, le EVs bioingegnerizzate sono sfruttate per la loro capacità di targeting, per la bassa immunogenicità, per l'elevata flessibilità di modifica e per la permeabilità alla barriera biologica,³⁵² il tutto grazie alla loro caratteristica di essere fattori cellulari endogeni.

Le microvescicole usate attualmente negli approcci terapeutici derivano soprattutto dalle MSCs, che le producono in elevate quantità. Queste MVs possono migrare preferenzialmente verso i tumori ed essere incorporate nello stroma neoplastico,³⁵³⁻³⁵⁶ dove hanno la capacità di regolare il destino delle cellule tumorali in maniera paracrina.

Le EVs derivate dalle MSCs, essendo i principali contributori tra questi effettori paracrini,⁸ posseggono un significativo potenziale bioingegneristico come piattaforma di somministrazione guidata di farmaci antitumorali grazie al loro forte tropismo migratorio verso i siti neoplastici.³⁵⁷⁻³⁵⁹

La figura 5 sintetizza le fasi chiave del processo di applicazione terapeutica delle EVs derivate da MSCs.

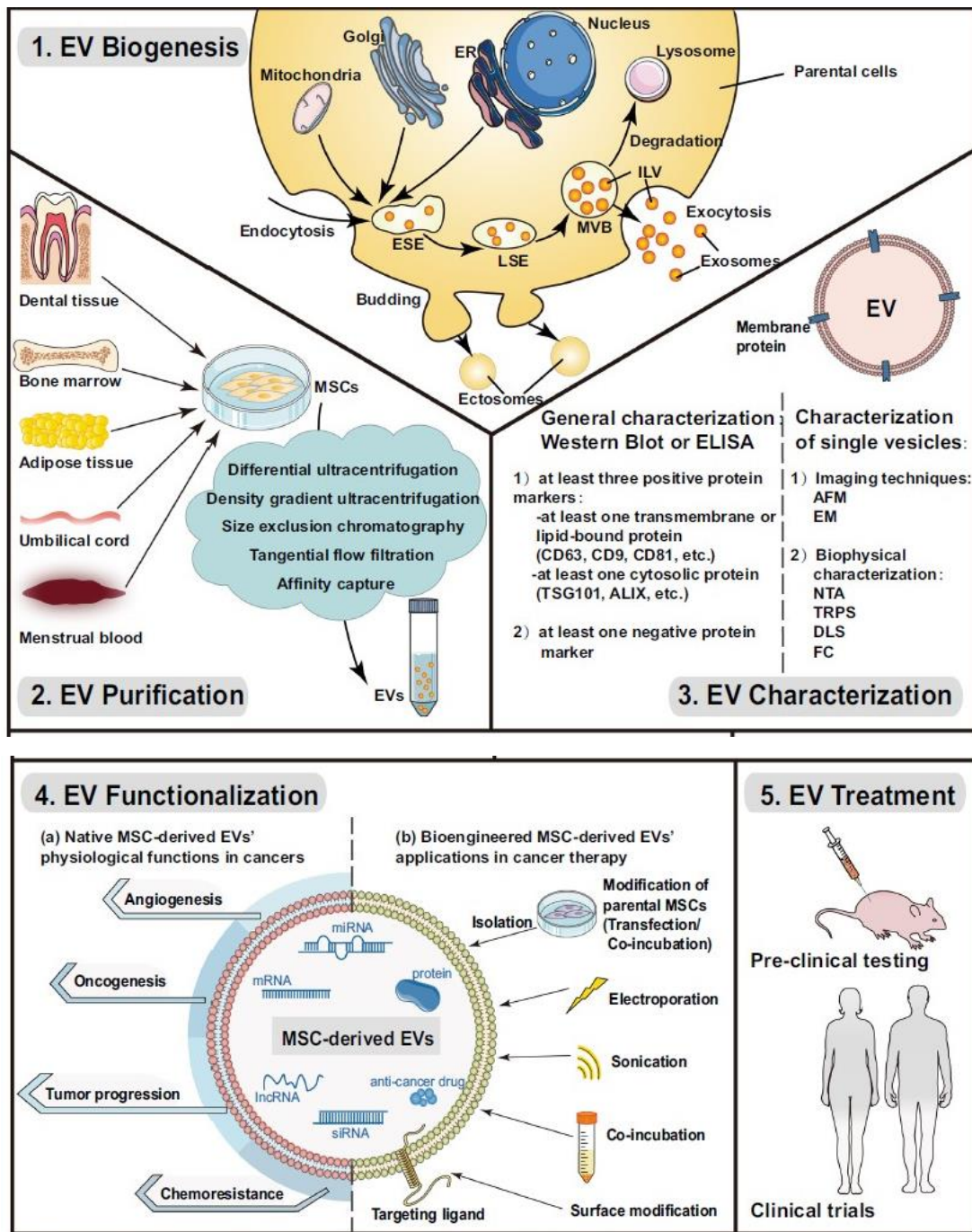


Figura 5. Fasi chiave del processo di applicazione terapeutica delle EV derivate da MSC. AFM microscopia a forza atomica, DLS dispersione dinamica della luce, EM microscopia elettronica, ER reticolo endoplasmatico, ESE endosoma di selezione precoce, FC citometria a flusso, ILV vescicola intraluminale, LSE endosoma di selezione tardiva, MVB corpo multivesicolare, NTA analisi di tracciamento delle nanoparticelle, TRPS rilevamento a impulsi con resistenza sintonizzabile. Therapeutic roles of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in cancer, Zhijie Weng, 2021³⁶⁰

CARATTERISTICHE BIOLOGICHE DELLE VESCICOLE EXTRACELLULARI

Queste particelle sono classificate in due principali classi: ectosomi ed esosomi.

I primi sono vescicole di 50-1000 nm di diametro rilasciate attraverso gemmazione della membrana plasmatica e comprendono microvescicole, microparticelle e vescicole di grandi dimensioni.

Gli esosomi hanno un diametro minore, di circa 40-160 nm, sono di origine endosomiale. Il processo di formazione è piuttosto complesso e passa attraverso diverse fasi che comportano la formazione di vescicole intraluminali (ILV) in cui sono caricate proteine, lipidi ed acidi nucleici, raccolti all'interno di strutture denominate "multi vesicular bodies" (MVB). Quest'ultimi sono trasportati alla membrana cellulare dove, per esocitosi, le ILV sono secrete formando gli esosomi.

Le diverse modalità di origine tra ectosomi e esosomi giustificano la differente composizione interna e anche la presenza di proteine e lipidi differenti nel doppio strato lipidico che le delimita. Queste differenze permettono di differenziare i diversi tipi di EVs e determinano svariate azioni biologiche delle stesse.³⁶¹

Purificazione

Per la purificazione delle EVs si utilizzano differenti tecnologie quali l'ultracentrifugazione differenziale, l'ultracentrifugazione a gradiente di densità, la cromatografia ad esclusione dimensionale, la filtrazione a flusso tangenziale e la cromatografia per affinità.³⁶²

L'approccio più spesso adottato grazie al protocollo semplice e alla resa relativamente elevata³⁶³ è l'ultracentrifugazione differenziale, dove se si variano in maniera controllata le condizioni di centrifugazione, ossia la velocità di centrifugazione e/o il tempo, si ottiene la separazione delle particelle dotate di velocità di sedimentazione diverse, permettendo di rimuovere i componenti indesiderati durante ogni ciclo.

Tuttavia, esso non è in grado di separare facilmente particelle con intervalli dimensionali e di densità sovrapposti, come gli esosomi e le microvescicole.

L'ultracentrifugazione a gradiente di densità, la cromatografia a esclusione dimensionale e la filtrazione mostrano problemi simili, poiché dipendono dalla densità o dalle dimensioni delle particelle per la separazione.

La Società internazionale per le vescicole extracellulari (ISEV) ha proposto una guida dettagliata per questi metodi di isolamento³⁶⁴ ma è assai complesso raggiungere la preparazione in purezza assoluta che consiste nell'isolare completamente le EVs tra di loro e da altri prodotti biologici.

In sostanza, ogni metodo presenta vantaggi e svantaggi che combinati insieme permetterebbero di ottenere il massimo arricchimento dei preparati di EVs.

Caratterizzazione

Caratterizzare meticolosamente le EVs secondo criteri minimi dell'ISEV è necessario per la convalida del metodo di isolamento.

Una caratterizzazione completa delle EVs comprende quella generale, per caratterizzare la popolazione nel suo complesso, ed eventualmente quella di vescicole singole.

La prima solitamente si focalizza su determinati marcatori proteici mediante Western Blot o ELISA, l'ISEV suggerisce di utilizzare almeno tre marcatori proteici EV positivi e uno negativo.

I primi dovrebbero includere almeno una proteina transmembrana (ad esempio, CD63, CD9, CD81) e una proteina citosolica (ad esempio, TSG101, ALIX).

Il procedimento della singola vescicola invece necessita di tecniche di imaging e di caratterizzazione biofisica.

Nelle prime rientrano la microscopia a forza atomica (AFM) e la microscopia elettronica (EM) tra cui sia quella a trasmissione (TEM) sia quella a scansione (SEM), e queste sono le uniche tecniche di imaging in grado di catturare immagini ad alta risoluzione della morfologia delle EVs.

La caratterizzazione biofisica include l'analisi di tracciamento delle nanoparticelle (NTA), il rilevamento di impulsi di resistenza sintonizzabile (TRPS), la dispersione dinamica della luce (DLS) e la citometria a flusso (FC).³⁶⁴

Nonostante le diverse tecniche utilizzate, una procedura univoca per la caratterizzazione dettagliata delle sottopopolazioni di EVs e della composizione molecolare di ciascun tipo di microvescicola non è ancora disponibile.³⁶⁵

FUNZIONI FISILOGICHE DELLE EVS DERIVATE DALLE MSCS NEI TUMORI

Partecipazione all'angiogenesi tumorale

E' stato osservato¹⁶⁴ che gli esosomi derivati da cellule staminali mesenchimali del midollo osseo umano (hBMSCs) favoriscono la crescita tumorale in modelli murini di xenotrapianto nel tumore gastrico e del colon, ma non ottengono risultati simili sulle cellule neoplastiche in vitro.

L'attivazione della via di segnalazione molecolare coinvolta in questo processo è simile sia in vivo e in vitro, con un aumento dei livelli di mRNA di VEGF e CXCR4, coincidente con l'incremento della densità vascolare osservata nei tessuti tumorali in vivo.

E' stato dimostrato che gli esosomi derivati da hBMSCs sono in grado di aumentare l'espressione di VEGF e CXCR4 nelle cellule tumorali mediante l'attivazione delle vie ERK1/2 e p38 MAPK, causando un incremento dell'angiogenesi e promuovendo così la crescita neoplastica in vivo.

Tuttavia, sono stati scoperti³⁶⁶ effetti opposti nelle cellule di tumore mammario: gli esosomi derivati da hBMSCs potrebbero inibire l'angiogenesi e la progressione del tumore sia in vivo sia in vitro mediante trasferimento alle cellule tumorali di miR-16, un micro-RNA capace di ridurre l'espressione di VEGF.

Un ulteriore studio³⁶⁷ ha messo in luce che miR-100 arricchito negli esosomi derivati da hBMSCs, può diminuire l'angiogenesi in vitro attraverso la down-regulation del VEGF nelle medesime cellule tumorali.

Inibizione della proliferazione e promozione dell'apoptosi

Nei primi studi effettuati sono state utilizzate differenti linee cellulari tumorali e modelli murini di xenotrapianto, col fine di verificare i ruoli modulatori delle microvescicole derivate dalle MSCs nel ciclo cellulare neoplastico, nella proliferazione e nella apoptosi.

Son state segnalate EVs provenienti da hBMSCs come attivatori dei regolatori negativi del ciclo causando così sia morte cellulare programmata o apoptosi, sia inibizione della proliferazione tumorale nelle cellule di carcinoma epatocellulare, ovarico e sarcoma di Kaposi.³⁶⁸

In maniera analoga, nel carcinoma vescicale sono stati rilevati gli effetti anti-proliferativi e pro-apoptotici delle EVs derivate da MSCs del cordone ombelicale umano (hUCMSCs), i quali sono stati correlati alla fosforilazione della proteina AKT-chinasi e all'aumento del clivaggio della Caspasi 3.³⁶⁹

In una ricerca³⁷⁰ è stato osservato che l'incorporazione di cellule mesenchimali adipose umane (hAMSC) ha permesso sia di attenuare la proliferazione delle cellule di cancro ovarico, sia di indurre l'apoptosi.

Nello stesso lavoro son state trattate le cellule di carcinoma ovarico con esosomi trattati con proteasi o con esosomi digeriti con RNasi con lo scopo di verificare se la proteina esosomiale o l'RNA fossero responsabili degli effetti osservati ed è risultato che vi sono state differenze significative tra gli esosomi digeriti con proteasi e quelli freschi, mentre quelli digeriti con RNasi non hanno ottenuto alcun effetto di inibizione della proliferazione nelle cellule di cancro ovarico.

Gli autori sono giunti alla conclusione che i miRNA correlati a oncogeni negli esosomi derivati dalle hAMSC son responsabili delle attività antitumorali osservate e causano un aumento dell'apoptosi mediata dai mitocondri nelle cellule cancerose osservate attraverso l'up-regulation di molecole pro-apoptotiche e la down-regulation di quelle anti-apoptotiche.

Vi sono stati differenti ricerche su questi ultimi due fenomeni; ad esempio l'up-regulation del miRNA-145 negli esosomi derivati dalle hAMSC si è dimostrato svolgere un ruolo soppressivo nella progressione del cancro prostatico e ha indotto l'apoptosi attraverso la via della Caspasi-3/7.³⁷¹

Un altro esempio è il miRNA let-7i, che potrebbe essere trasferito da EVs derivate da hBMSC in cellule di cancro polmonare per interrompere la proliferazione delle cellule tumorali sfruttando la via KDM3A/DCLK1/FXYD3.³⁷²

Tuttavia, sono ancora necessarie ulteriori indagini approfondite per determinare quale sia il meccanismo alla base delle azioni biologiche dei miRNA esosomiali o di altri “cargoes” sconosciuti nella progressione del cancro.

Le tecnologie per il caricamento dei farmaci e la produzione di EV terapeutiche

Le microvescicole bioingegnerizzate presentano un potenziale terapeutico molto interessante come veicoli di molecole anti-tumorali, data la loro capacità di trasportare i carichi desiderati, incapsulando agenti terapeutici, proteine, farmaci e acidi nucleici, e di conferire una maggiore specificità nel bersaglio.³⁶⁰

Due sono le strategie principali applicate col fine di massimizzare l'efficacia terapeutica delle EVs: l'ingegnerizzazione del carico e l'ingegnerizzazione della superficie.

Il processo di caricamento delle EVs con specifiche molecole è solitamente ottenibile mediante due diverse possibilità operative: pre-caricamento (ottenuto prima dell'isolamento delle EVs) e post-caricamento (dopo l'isolamento delle EVs).

Pre-caricamento delle EVs

Tramite manipolazione genetica delle cellule parentali, i carichi terapeutici possono essere impacchettati per via endogena nelle EVs durante il processo di biogenesi cellulare, quindi prima del loro isolamento.³⁷³

Mediante la trasfezione cellulare, le cellule parentali possono sovra-esprimere miRNA, siRNA, proteine e peptidi terapeutici che sono successivamente incapsulati nelle microvescicole.

Un ulteriore metodo consiste nell'incubare direttamente i farmaci con le cellule, consentendo la produzione di EVs contenente tali molecole.

Le strategie di pre-caricamento permettono la produzione di microvescicole racchiuse con i componenti attivi desiderati in modo relativamente semplice e stabile, mantenendo la loro integrità di membrana.

Tuttavia, richiedendo molto tempo e avendo una bassa efficienza, il potenziale di carico è limitato.³⁶⁰

Caricamento delle EVs post-isolamento

Questo processo si verifica dopo l'isolamento delle microvescicole, dove i carichi esogeni vengono incapsulati tramite caricamento passivo o attivo.

Nel primo caso si tratta di farmaci idrofobici che possono venire combinati con la membrana a doppio strato lipidico delle EVs a seguito della co-incubazione diretta; questa strategia dipende dal gradiente di concentrazione delle molecole e dalla loro natura idrofobica, e solitamente conducono a una bassa capacità di carico.³⁷⁴

Il caricamento attivo è inerente ai farmaci idrofili e ha il fine di permeabilizzare temporaneamente la membrana lipidica idrofobica, fisicamente o chimicamente, permettendo la loro diffusione nelle microvescicole.

I metodi fisici quali l'elettroporazione, la sonicazione, i cicli di congelamento e scongelamento, l'estrusione comportano solitamente una transitoria rottura della membrana delle EVs da parte di forze esterne;³⁵² tra tutti quello più utilizzato è l'elettroporazione, soprattutto per l'incapsulamento dell'RNA.

Gli approcci chimici fanno uso di reagenti per la trasfezione o permeabilizzanti, per facilitare l'ingresso dei carichi nelle EVs senza però comportarvi nessuna rottura.³⁷⁵

E' fondamentale agire con elevata cautela per evitare l'aggregazione delle microvescicole, il danneggiamento della loro membrana o l'induzione di immunogenicità durante le procedure di post-caricamento.³⁷⁶⁻³⁸²

Ingegneria di superficie delle EVs

Le microvescicole presentano numerose molecole di superficie mostrando selettività per specifiche cellule riceventi.

L'alterazione della loro superficie, specialmente della composizione proteica, può alterarne la biodistribuzione e il tropismo.

L'ingegneria di superficie ha come scopo di dotare le EVs di un'ulteriore specificità di targeting, incrementandone in tal modo la concentrazione locale nei siti desiderati e riducendo la tossicità sistemica.

Le tecnologie di ingegneria di superficie sono classificate in tre categorie: ingegneria genetica, modificazione chimica e ingegneria di membrana.

Ingegneria genetica

Le EVs hanno proteine transmembrana native che possono essere modificate con ligandi di targeting esogeni. Con il termine ligando di targeting si intende un ligando che può veicolare la EV su bersagli cellulari specifici, grazie al riconoscimento di proteine recettoriali specifiche per il ligando. I sistemi descritti in letteratura sono diversi.

Molti si basano sulla proteina di membrana esosomiale associata ai lisosomi 2 (Lamp2b), modificata in vari modi per poter interagire con diversi ligandi e target cellulari.

Questi sistemi mostrano in vitro prestazioni interessanti in quanto a selettività verso i tessuti bersaglio, ma tuttavia possono causare attivazione immunitaria e perdite funzionali delle proteine dell'ospite, rendendo estremamente complesso il loro utilizzo in vivo.³⁸³

Modificazione chimica

A seguito dell'isolamento delle EVs, i ligandi di targeting hanno anche la possibilità di essere fissati alla loro superficie basandosi su reazioni di bioconiugazione o di assemblaggio di lipidi.

I gruppi amminici delle proteine di membrana delle EVs, ad esempio, possono essere convertiti in gruppi alchilici reagendo con ligandi marcati con azide.³⁸⁴

Inoltre, i lipidi o le molecole anfipatiche si possono inserire nel doppio strato fosfolipidico delle microvescicole mediante autoassemblaggio lipidico, per poi legare i ligandi di targeting alla superficie di queste, sviluppando così un'altra strategia chimica.³⁷⁴

Ad esempio il polietilenglicole innestato con 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE-PEG) è stato utilizzato per ancorare ligandi di targeting sulle membrane con lo scopo di veicolare farmaci tumore-specifici;³⁸⁵ purtroppo tale tecnica può anche provocare una maggiore tossicità delle EVs.

Ingegneria della membrana ibrida

Il doppio strato fosfolipidico della membrana delle EVs ha la capacità di fondersi spontaneamente con altre strutture di membrana, come i liposomi sintetici: per esempio in uno studio³⁸⁶ è stato introdotto un sistema ibrido denominato "EXOPLEXs" per la fusione diretta della membrana tra i due elementi sopracitati, col fine di veicolare in modo efficiente grandi molecole senza la compromissione di alcuna struttura.

Questa strategia ha anche permesso la modifica della superficie mediante la fusione con liposomi incorporanti più ligandi.

Per di più, l'ibridazione delle EVs con i liposomi può essere indotta dal glicole polietilenico (PEG) durante i cicli di congelamento e scongelamento per evitare l'attivazione del sistema immunitario,^{382,387} questo perché il PEG ha la capacità di celare il sistema ibrido formando uno strato di idratazione.³⁸⁸

Le EVs ingegnerizzate con queste tecniche sono, secondo gli autori, dotate di una minore immunogenicità, migliore stabilità e tempi di circolazione più protratti.

APPLICAZIONI DELLE EVS BIOINGEGNERIZZATE DERIVATE DA MSCs

Le microvescicole bioingegnerizzate derivate da MSCs possiedono dei vantaggi come veicoli di consegna di molecole terapeutiche nella terapia del cancro dovuti al loro forte tropismo tumorale, alla immunogenicità, all'alta tolleranza e alle caratteristiche insite in nanoparticelle facilmente diffusibili nell'organismo.³⁶¹

Diversi carichi antitumorali possono essere introdotti in queste cellule quali miRNA, anti-miRNA, siRNA, mRNA, farmaci e proteine attraverso la modifica delle cellule parentali o direttamente delle EVs.

Vescicole extracellulari come veicolo di acidi nucleici

Le MSCs trasfettate possono rilasciare EVs incapsulate con miRNA specifici che, dopo internalizzazione, possono trasportare l'acido nucleico nelle cellule neoplastiche per regolare lo sviluppo del tumore.

Uno studio³⁸⁹ ha dimostrato che le microvescicole derivate da hBMSC e caricate con miR-379 sono state capaci di sopprimere il cancro al seno mediante la regolazione della ciclo-ossigenasi 2 (COX-2).

Analogamente i miR-146b,³⁹⁰ miR-124a³⁹¹ e miR-34a³⁹² sono stati introdotti nelle cellule di glioma da EVs trasfettate (sempre derivate da hBMSC) e ne hanno abrogato la crescita mediante riduzione della proteina EGFR e NF- κ B, silenziando FOXA2 (Forkhead box A2 oppure fattore nucleare 3- β degli epatociti) e down-regolando MYCN (proteina del proto-oncogene N-myc o proteina di base dell'elica-ansa-elica 37).

Altri miRNA sono stati impacchettati similmente nelle EVs e hanno svolto la funzione di agenti antitumorali attraverso la modulazione post-trascrizionale dell'espressione genica neoplastica tumorale in diversi tipi di cancro.³⁹²⁻⁴⁰¹

Basandosi sulla presentazione di effetti pro-tumorali da parte di alcuni miRNA, gli oligonucleotidi inibitori complementari a questi possono essere caricati all'interno delle EVs e trasportati nelle cellule tumorali per invertire i risultati.

Ad esempio, in uno studio⁴⁰² esosomi isolati da BMSCs di topo sono stati caricati con acido nucleico anti-miR-142-3p mediante elettroporazione, il quale successivamente è stato veicolato alle cellule di cancro al seno mostrando effetti antitumorali tramite la down-regulation dei miR-142-3p e miR-150 e miR-150, e conseguentemente aumentando gli anti-oncogeni (APC e P2X7R).

Con la stessa metodica possono essere caricati anche i piccoli RNA interferenti (siRNA): ad esempio in uno studio rappresentativo sono stati generati esosomi derivati da hBMSCs utilizzando un sistema di coltura basato su bioreattore per poi essere elettroporati con un siRNA mirato all'oncogene KRASG12D.⁴⁰³

Recentemente, un gruppo di ricerca⁴⁰⁴ ha riportato un nuovo biosistema di veicolazione, l'EXO-OXA, dove gli esosomi derivati da BMSC sono stati caricati con galectina-9 siRNA mediante elettroporazione e con il prodotto di oxaliplatino (OXA) tramite modifica della superficie.

Dopo l'internalizzazione da parte delle cellule neoplastiche pancreatiche, il siRNA della galectina-9 ha bloccato l'asse galectina-9/dectina-1 per migliorare l'immunoterapia, mentre l'OXA ha indotto la morte immunogenica delle cellule tumorali e ciò ha portato alla soppressione della crescita tumorale.

Inoltre, il carico di mRNA degli esosomi è stato studiato tramite manipolazione genetica delle MSCs parentali ed è stato dimostrato che quelli derivati da diverse cellule mesenchimali staminali trasdotte tramite infezione da retrovirus con il gene yCD::UPRT erano in grado di trasportare l'mRNA del gene suicida.⁴⁰⁴

La morte cellulare indotta si è verificata in presenza del profarmaco 5-FC che si converte in 5-FU a seguito dell'internalizzazione dell'esosoma del gene suicida da parte delle cellule tumorali.⁴⁰⁴

Vescicole extracellulari come veicolo di farmaci

I farmaci anti-tumorali possono essere incorporati nelle EVs derivate da MSCs mediante tecniche di pre-caricamento o di post-caricamento.

Per quanto riguarda il pre-caricamento, alcuni studiosi³³⁴ hanno dimostrato che le BMSCs di topo hanno impacchettato il paclitaxel (PTX) in seguito all'esposizione ad un suo dosaggio molto elevato in vitro per 24 ore e lo hanno trasferito in cellule tumorali attraverso i loro esosomi, causando così la soppressione della crescita tumorale in adenocarcinoma pancreatico.

Anche altri ricercatori⁴⁰⁵ hanno riportato un approccio simile isolando efficacemente esosomi caricati con PTX da hUCMSCs incubate con questa molecola per 24 ore.

Questi hanno mostrato effetti inibitori della crescita tumorale e delle metastasi nel cancro al seno, al polmone e alle ovaie.

Analogamente, cellule staminali mesenchimali della papilla gengivale umana (hGinPa-MSCs) sono state innescate con un'alta concentrazione di PTX, il quale è stato rilasciato e incorporato in cellule tumorali attraverso le EVs per il trattamento dei carcinomi pancreatico e squamoso umani.⁴⁰⁶

In un'altra strategia di caricamento del farmaco chiamata “post-caricamento”, il medicinale viene impacchettato direttamente nelle microvescicole dopo averle isolate.

Ad esempio, alcuni studiosi⁴⁰⁷ hanno utilizzato esosomi derivati da BMSCs di topo per trasportare il farmaco antitumorale doxorubicina (DOX) introdotto mediante elettroporazione, come piattaforma versatile per il trattamento del cancro coloretale.

Vescicole extracellulari come veicolo di proteine

Ad oggi sono stati condotti solo pochi studi relativi a MSCs caricate con proteine specifiche per la terapia antitumorale. Tra gli studi descritti, è rappresentativo il lavoro relativo al fattore di necrosi tumorale (TRAIL),³⁵¹ che è una promettente proteina antitumorale avente la capacità di indurre selettivamente l'apoptosi delle cellule.

È stato dimostrato che le EVs derivate da MSCs trasdotte da TRAIL possono esprimere questa proteina sulla membrana e quindi il trasferimento di questo fattore alle cellule tumorali può indurre apoptosi e abolire la resistenza ad esso nel cancro del polmone, nel mesotelioma pleurico maligno, nel carcinoma renale, nell'adenocarcinoma mammario e nel neuroblastoma.

L'UTILIZZO DI MSCs MODIFICATE GENETICAMENTE COME AGENTI ANTI-TUMORALI⁴⁰⁸

Un altro approccio alla terapia anti-tumorale basato sulle MSCs è la preparazione di cellule in grado di produrre, dopo modificazione genetica, proteine specifiche ad attività antitumorale. Secondo questo tipo di approccio, le MSCs, in grado di fare homing a livello dei tumori, verrebbero utilizzate come veicoli cellulari di molecole bioattive all'interno del parenchima e dello stroma dei tumori.^{409,410}

Inoltre, mantengono caratteristiche immunologiche rilevanti per il trattamento dei disturbi legati al sistema immunitario⁴¹¹ e per il loro utilizzo come veicoli cellulari nel trasporto di molecole bioattive all'interno del parenchima e dello stroma tumorali.⁴¹²

Un esempio di questo approccio è stata la generazione di una linea di MSCs in grado di esprimere un gene modificato denominato iCasp9.⁴¹³

Con questo approccio l'innescò del suicidio è indipendente dalla fase del ciclo cellulare, così da non interferire con alcun programma farmacologico⁴¹³ ed inoltre differenti studi hanno dimostrato l'elevata efficacia e specificità di iCasp9.⁴¹⁴⁻⁴¹⁶

Il gene suicida denominato “iCasp9”, basato sulla sequenza della Caspasi-9 umana codifica per una proteina modificata che presenta un'elevata affinità con una piccola molecola sintetica e bioinerte (B/B Homidimerizer, AP20187). In presenza del ligando, si ha dimerizzazione ed attivazione della iCasp9, con conseguente morte cellulare.⁴¹³

Questo approccio si è rivelato in grado di causare morte cellulare su diversi modelli di tumore in vitro.

TERAPIA ONCOLITICA CON VIRUS

La viroterapia oncolitica, seppure considerata ancora ad oggi un approccio sperimentale, rappresenta una delle innovazioni potenzialmente più significative nell'immunoterapia del cancro. Recentemente, un trattamento specifico basato su di un virus oncolitico ha mostrato benefici clinici giungendo all'approvazione da parte dell'EMA (Agenzia Europea per i Medicinali) e della FDA (Food and Drug Administration). Il trattamento approvato con il nome di "Imlygic", per pazienti umani con melanoma metastatico,^{417,418} è basato su una forma del virus herpes simplex 1.

La ricerca con i virus oncolitici (OV) in campo medico veterinario non è ancora avanzata come quella in umano, ma negli ultimi anni sono stati pubblicati alcuni lavori scientifici focalizzati sulla messa a punto di terapie virali contro i tumori animali.^{419,420}

In particolare, recentemente, sono stati condotti alcuni studi^{419,421-425} sui cani che utilizzano come OV adenovirus,⁴²⁶ virus del morbillo,⁴²⁷ virus del cimurro,⁴²⁸ virus dell'herpes simplex,⁴²⁹ virus della malattia di Newcastle,⁴³⁰ reovirus⁴³¹ e il virus della vaccinia.^{432,433}

Sebbene ne siano stati sviluppati molti, gli adenovirus oncolitici (Ads) sono ancora i più comunemente utilizzati per la viroterapia oncolitica grazie alla loro efficacia di infezione, alla produzione di titoli elevati, alla sicurezza, alla facilità di modifica genetica ed alle caratteristiche di replicazione.⁴³⁴

L'efficacia di Ads è stata dimostrata in diversi modelli murini e in studi clinici veterinari e umani, dove son emersi pochissimi effetti avversi riconducibili a lievi sintomi simil-influenzali, che possono essere più gravi in seguito ad una somministrazione sistemica, e a reazioni locali nel sito di iniezione.⁴³⁵⁻⁴³⁹

I pazienti trattati erano affetti soprattutto da tumori solidi, come osteosarcomi, melanomi e carcinomi mammari o sarcomi dei tessuti molli.^{420,440}

La via di somministrazione può essere intra-tumorale o sistemica, in funzione del tipo e della localizzazione del tumore. La prima modalità può essere rischiosa soprattutto per i tumori inaccessibili, come in quelli cerebrali o polmonari, dove infatti la via sistemica è considerata più sicura.

Nel caso di somministrazione sistemica le particelle virali (vp) però possono essere trattenute dal fegato o bloccate da anticorpi neutralizzanti o altri componenti del sangue^{420,441,442} e la loro presenza nel torrente circolatorio periferico induce l'attivazione del sistema immunitario, causando una risposta antivirale.

Per evitare queste problematiche sono stati proposti diversi sistemi di somministrazione alternativi, tra cui "veicoli" come vettori cellulari, liposomi, nanoparticelle e particelle polimeriche con la capacità di trasportare il virus nel sito tumorale.⁴⁴³⁻⁴⁴⁵

I virus utilizzati nella terapia oncolitica sono modificati non solo per attenuarne od eliminarne completamente l'azione patogena potenziale, ma sono anche trattati mediante l'introduzione di transgeni specifici al fine di ottenere il cosiddetto "oncovirus armato", che può esercitare diverse funzioni biologiche specifiche anti-tumorali come il potenziamento del tropismo tumorale e la penetrazione all'interno delle cellule, promuovendo la morte cellulare e l'anti-angiogenesi ed infine modulando l'immunità antitumorale.⁴¹⁸⁻⁴²⁰

Le cellule staminali mesenchimali, possedendo un tropismo tumorale naturale, sono state utilizzate come vettori cellulari per veicolare gli OV,⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁶ come ad esempio un agente immunoterapico oncologico chiamato "Celyvir", che può essere somministrato per via endovenosa ed è basato su MSCs autologhe infettate con un adenovirus oncolitico.⁴²²

L'utilizzo di cellule mesenchimali staminali come veicolo permette di ridurre la risposta immunitaria antivirale ed aumentare l'effetto oncolitico del trattamento rispetto al trattamento effettuato con il solo virus senza vettore.⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁸

Come precedentemente indicato, gli OV presentano numerose problematiche che ne minano l'efficacia terapeutica nel caso di applicazione sistemica: infatti, una volta somministrati attraverso questa via, possono essere filtrati e trattenuti da alcuni tessuti, soprattutto quello epatico.

Inoltre il sistema immunitario può riconoscere le particelle virali nel flusso sanguigno, causandone così la loro eliminazione.

In aggiunta, gli Ovs devono superare l'anomala vascolarizzazione tumorale e l'elevata pressione del fluido interstiziale per riuscire ad evadere dal flusso sanguigno ed entrare nello spazio extracellulare.⁴⁴⁹

Il microambiente tumorale (TME) per di più possiede varie barriere che limitano la penetrazione e la diffusione virale, come la matrice extracellulare tumorale alterata (ECM) e ricca di proteine, acido ialuronico, proteoglicani e cellule stromali.⁴⁵⁰

Per superare queste difficoltà, sono state messe in atto differenti strategie come l'uso di vettori cellulari per la somministrazione sistemica di OV al tumore primario e alle metastasi.

La loro funzione è di proteggere l'oncovirus dal complemento o dagli anticorpi neutralizzanti e di ottenere la possibilità di eludere gli organi di filtraggio, attraversando la barriera endoteliale grazie alla loro capacità di dirigersi verso sedi diverse seguendo gradienti di chemochine o mediante proteine di adesione della superficie cellulare.

Per di più alcune tipologie cellulari posseggono la capacità di migrare in modo specifico verso i tumori, come le cellule immunitarie (linfociti T e macrofagi), cellule progenitrici, cellule tumorali, cellule staminali neurali e cellule staminali mesenchimali.^{451,452}

Andando ad analizzare le caratteristiche fondamentali che le cellule carrier devono avere per fungere da vettori efficienti, bisogna che si soddisfino quattro requisiti:

1. possedere un'infettività efficiente
2. consentire la replicazione e la produzione di OV
3. modulare la risposta immunitaria contro il virus
4. promuovere una risposta immunitaria antitumorale

Per quanto riguarda in modo specifico le MSCs, vi è la possibilità di combinare diverse tipologie virali con queste cellule, anche se devono essere presi in considerazione alcuni elementi per massimizzare i benefici della combinazione.

Innanzitutto, la tipologia di genoma virale poiché quelli a RNA si replicano più velocemente di quelli a DNA, permettendo alle cellule di raggiungere il tumore in tempi più brevi.

Come secondo fatto è la scelta di OV, che deve essere capace di infettare e replicarsi correttamente nelle MSCs, affinché sia garantita una distribuzione virale ottimale nel tumore.

La somministrazione attraverso le staminali è indicata specialmente per quei virus privi di tropismo tumorale, in quanto possono trarre beneficio dalla proprietà di homing, sia per quanto riguarda la distribuzione all'interno della formazione neoplastica, sia per evitare l'infezione di organi sani.

VIRUS UTILIZZABILI PER L'ONCOTERAPIA BASATA SU MSCS

Virus del mixoma (MYXV)

Il MYXV esprime la proteina verde fluorescente (GFP) come gene marker è stato combinato con cellule staminali mesenchimali umane derivate dal tessuto adiposo (ASCs) per il trattamento del tumore cerebrale maligno nei topi.⁴⁵³

Son state messe in luce la capacità delle ASCs di generare nuove particelle virali e le proprietà di "tumor-homing" delle cellule infette dopo la somministrazione intracranica: è stato osservato infatti un significativo aumento della sopravvivenza nei topi trattati con le MSCs caricate con OV rispetto ai topi trattati con le cellule senza caricamento.

Considerando le MSCs derivate dal midollo osseo (BM-MSCs), sono risultate permissive alla replicazione di MYXV e utilizzando un virus del mixoma armato di IL-15 per infettarle, dopo un trattamento endovenoso, si è osservata un'efficacia antitumorale superiore in un modello di melanoma polmonare immunocompetente, rispetto alla monoterapia con MYXV.⁴⁵³

Un indice di potenziale impedimento del riconoscimento virale da parte del sistema immunitario ad opera delle MSCs è la presenza di una più elevata percentuale di cellule natural killer circolanti solo in quegli animali trattati con il virus.

Infine, un aumento delle citochine pro-infiammatorie (IFN- γ e TNF α), della proteina 1 della morte cellulare programmata (PD-1) e del suo ligando (PD-L1) e dell'infiltrazione di cellule T effettrici è stato documentato solo nei tumori degli animali trattati con MSCs caricate con MYXV-IL-15, risultando essere una ipotetica risposta immunitaria antitumorale come conseguenza della terapia.

Virus dell'herpes simplex (HSV)

Due studi hanno dimostrato il potenziale antitumorale della combinazione di HSV e MSCs.

Nel primo⁴⁵⁴ sono state infettate le cellule staminali derivate da membrane fetali (FM-MSCs) con un HSV codificante per un anticorpo a catena singola avente come bersaglio il recettore del fattore di crescita epidermico umano 2 (HER-2) (R-LM249) e sono stati dimostrati l'infezione virale delle FM-MSCs, la produzione di progenie virale e la veicolazione virale al tumore.

L'efficacia antitumorale della somministrazione endovenosa è stata valutata in due differenti modelli murini: il primo era rappresentato da metastasi polmonari (utilizzando la linea cellulare SK-OV-3 HER-2 positiva), dove le MSCs infettate con R-LM249 hanno portato ad una inibizione significativa della comparsa di metastasi, a differenza di quelle non infette.

Risultati analoghi sono stati osservati in un modello di metastasi cerebrali (HER2+ MDA-MB-453 EGFP), in cui le MSCs trattate con R-LM249 son riuscite ad impedire lo sviluppo di metastasi cerebrali.

In un secondo studio, è stata effettuata la consegna MSC-mediata di HSV oncolitico alle metastasi cerebrali in un melanoma dopo una singola somministrazione intra-carotide, che ha causato una significativa remissione dei tumori metastatici e, di conseguenza, l'aumento della sopravvivenza dei topi, rispetto a quelli trattati con le sole MSCs.

Virus del morbillo (MV)

Cellule staminali mesenchimali di diversa origine sono state combinate con MV per il trattamento del cancro in modelli murini.

Due studi hanno valutato la somministrazione singola endovenosa di BM-MSCs caricate con MV nel carcinoma epatocellulare e nella leucemia linfoblastica.^{455,456}

E' stata riportata da entrambi sia la permissività delle BM-MSCs per la replicazione del virus nei tumori, sia un'efficacia terapeutica superiore a quella riscontrata con trattamento a base di MV senza cellule, in presenza di anticorpi neutralizzanti anti-MV preesistenti.

Anche le staminali provenienti da tessuto adiposo sono state combinate con il virus del morbillo. Altri ricercatori⁴⁵⁷ hanno testato il potenziale antineoplastico delle ASCs infettate da MV in un modello murino di xenotrapianto di cancro ovarico dopo una singola somministrazione intraperitoneale e si è osservato che l'uso di queste come vettori di virus ha incrementato sia il potenziale terapeutico rispetto al trattamento con la sola particella virale, sia la capacità di proteggere quest'ultimo dall'immunità antivirale preesistente.

Adenovirus (Ad)

Gli Adenovirus oncolitici (OAds) sono stati i virus più frequentemente applicati in combinazione con le MSCs per il trattamento del cancro.

Alcuni studi del 2007^{458,459} su modelli murini di cancro al polmone e alla mammella, hanno evidenziato la capacità delle MSCs caricate con OAd di raggiungere, dopo una singola somministrazione endovenosa, il tumore e di ridurre la crescita.

Si è valutata la combinazione di BM-MSCs con l'OAd delta-24/RGD: in un primo lavoro son stati utilizzati due diversi modelli murini di xenotrapianto di glioma (U87 e U215-V121), dove gli autori hanno rilevato il tropismo nei confronti del tumore cerebrale e l'attività antitumorale delle cellule infettate dopo una singola somministrazione intracarotide.⁴⁶⁰

Altri ricercatori⁴⁶¹ hanno descritto una sottopopolazione di BM-MSCs che sovra-esprimono le integrine $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 5$, con una maggiore capacità di migrazione tumorale.

Il caricamento di queste cellule con un OAd ha condotto ad un'efficacia terapeutica significativa rispetto alle MSCs non caricate e al virus come monoterapia in un modello di xenotrapianto di melanoma dopo una singola somministrazione retro-orbitale.

Inoltre è stato osservato che le condizioni di ipossia hanno favorito le proprietà tumorali delle cellule staminali inducendo così l'aumento dei recettori CXCR4 e CXCR1.⁴⁶²

Tuttavia, in un modello di xenotrapianto di cancro al colon, la combinazione di un OAd eliminato da E1B-55KD con BM-MSCs coltivate in tale ambiente non è stata in grado di controllare la crescita tumorale dopo una singola somministrazione intraperitoneale e ciò è stato attribuito possibilmente alla bassa potenza virale, nonostante non sia stato incluso nello studio un gruppo di controllo con il virus come monoterapia.

Col fine di valutare l'efficacia delle MSCs derivate dal cordone ombelicale (HU-MSCs) e delle BM-MSCs caricate con diversi OAds, son stati analizzati modelli murini di carcinoma epatocellulare.

Combinando un OAd che esprime IL-24 con HU-MSCs modificate esprimenti la proteina adenovirale E1A, i ricercatori⁴⁶³ hanno osservato un miglioramento nella replicazione e nella produzione virale, oltre ad un'efficiente migrazione delle HU-MSCs caricate verso la neoplasia dopo una singola somministrazione endovenosa.

Inoltre, aggiungendo un basso dosaggio di 5-fluorouracile si è ottenuta un'efficace inibizione della crescita tumorale.

Le HU-MSCs sono state anche unite con un OAd esprimente una sequenza bersaglio di microRNA-122 per evitare la replicazione virale nelle cellule epatiche sane.⁴⁶⁴

Un'efficacia antitumorale significativa è stata riportata dopo due somministrazioni endovenose utilizzando come modelli di tumore un epatocarcinoma ortotopico e uno sottocutaneo, nonostante non sia stato effettuato un confronto diretto con il solo virus.

Infine, le BM-MSCs son state testate in un epatocarcinoma ortotopico come portatori di cellule per un OAd codificante un recettore decoy WNT inhibiting (WNTi).

Successivamente all'ottimizzazione della dose di OAd per il caricamento in BM-MSCs, son state effettuate due somministrazioni endovenose di BM-MSCs caricate con OAd-WNTi che hanno mostrato una notevole efficacia terapeutica in vivo.⁴⁶⁵

Il confronto diretto con l'OAd-WNTi senza vettore cellulare ha messo in luce un'efficacia terapeutica 8.1 volte superiore per i virus protetti dalle cellule rispetto a quelli "nudi" e, inoltre, le cellule staminali hanno prolungato ottimamente il tempo di circolazione dell'OAd, prevenendo il danno epatico rispetto alla somministrazione diretta virale.

In uno studio seguente, il medesimo gruppo di ricerca ha utilizzato un modello dinamico in silicio di TME come rete di interazione e un modello matematico predittivo per l'identificazione dei due parametri in grado di migliorare il risultato: la molteplicità

dell'infezione utilizzata per infettare le MSCs e il numero di numero di OAd-MSCs somministrate.⁴⁶⁶

E' stata effettuata una combinazione tra Ad/RLX, un OAd che codifica per la relaxina (ormone peptidico con proprietà di degradazione del collagene della ECM) e BM-MSCs per il trattamento preclinico del cancro al pancreas.⁴⁶⁷

Topi portatori di xenotrapianti pancreatici AsPC-1 hanno ricevuto tre somministrazioni EV di Ad/RLX nudo, BM-MSCs caricate con Ad/RLX o BM-MSCs infettate con Ad/RLX precedentemente trattate con poli(etilenimina)-coniugato con poli(CBA-DAH) (PCDP), un polimero cationico in grado di incrementare l'infettività virale delle staminali.

Un'efficacia antitumorale significativa è stata rilevata solamente per l'ultimo gruppo, probabilmente a causa della maggiore infettività delle MSCs e della produzione virale dell'Ad/RLX trattato con PCDP.

In un altro studio,⁴⁶⁸ è stato usato un embrione di pulcino con xenotrapianto di cancro pancreatico come modello ed è stata dimostrata la capacità delle BM-MSCs infettate con OAd di invadere gli sferoidi tumorali, venendo a generare nuove particelle virali nella neoplasia.

Per di più, utilizzando un OAd chimerico (fibra 5/3) esprimente, come carico per le BM-MSCs, il ligando inducente l'apoptosi legato al TNF, è stata osservata una maggiore riduzione del tumore rispetto alla monoterapia virale.

Altra innovazione risiede nell'utilizzo delle cellule staminali mesenchimali isolate dal sangue mestruale (MenSCs) anche come vettori cellulari per l'OAd.

Uno studio⁴⁶⁹ ha applicato quanto sopra riportato in modelli murini di cancro del colon-retto: conseguentemente alla somministrazione endovenosa o intraperitoneale, è stata determinata la corretta migrazione tumorale delle MSCs e due somministrazioni EV di MenSCs infettate con Ad5/F11 hanno determinato una significativa efficacia antitumorale, anche se il trattamento virale da solo non è stato incluso nello studio come controllo.

Il promotore modificato E1a/delta24 e RGD fibra OAd chiamato "ICOVIR15", è stato utilizzato combinato con le MSCs per la terapia oncologica.

Un gruppo di ricercatori⁴⁷⁰ ha utilizzato BM-MSCs infettate con un ICOVIR15 ingegnerizzato affinché esprimesse un gene suicida inducibile della Caspasi 9 (ICOVIR15-Ad.iC91) per il trattamento preclinico del cancro al polmone.

Eseguita una singola somministrazione endovenosa, sono state rilevate le cellule mesenchimali staminali nei tessuti tumorali e si è notato un maggiore controllo del cancro negli animali trattati con ICOVIR15-A di C9-MSCs.

Come vettore cellulare alternativo di ICOVIR15 è stato utilizzato MenSCs: in un primo studio, sono state sottoposte a confronto le modifiche dei capsidi virali per selezionare le più efficienti in termini di infezione delle MSCs e di produzione di progenie virale.⁴⁷¹

Uno studio successivo ha illustrato il vantaggio di utilizzare MenSC allogeniche anziché autologhe, a causa dell'ambiente pro-infiammatorio più elevato generato nel momento di interazione tra le MenSC caricate con OAd e le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC):⁴²⁵

la correlazione tra questo ambiente, le cellule staminali, le cellule T e quelle natural killer, indica la potenziale capacità delle prime di favorire il riconoscimento immunitario del tumore.

Infatti il potenziale terapeutico delle OAdMenSCs è stato dimostrato in topi NSG portatori di tumore e riceventi iniezioni endovenose di PBMC umane allogeniche, dove monociti e cellule NK hanno contribuito all'efficacia.

Infine, il potenziale terapeutico delle OAd-MenSCs è stato ulteriormente implementato caricando le MenSCs con un ICOVIR15, ovvero un vettore oncolitico ingegnerizzato per esprimere il recettore EGF mirato a un T cell engager bispecifico (anticorpo reclutante cellule T citotossiche con lo scopo di uccidere cellule tumorali) denominato "cBiTE".

L'efficacia anti-neoplastica delle MenSCs ICOVIR15-cBiTE è risultata migliore e maggiore rispetto a entrambi i controlli in monoterapia.

Infine, due diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato il beneficio dell'utilizzo preclinico di MSCs caricate con OAd per il trattamento di tumori cerebrali dopo somministrazione locale o intra-tumorale.

In tempi più recenti, uno studio⁴⁷² ha impiegato ICOVIR17, un ICOVIR15 modificato per codificare per la ialuronidasi solubile PH20 mediatrice della degradazione dell'acido ialuronico della ECM, in combinazione con le ASCs, per trattare il glioblastoma (GBM) per via intra-tumorale.

In questo caso un'efficacia antitumorale significativa è stata osservata in topi portatori di tumori U87 intracranici o in xenotrapianti di GBM.

In sintesi, le cellule staminali mesenchimali di diversa origine hanno dimostrato di avere un elevato potenziale come vettori cellulari per RNA o DNA OV's possedendo diversi gradi di proprietà litica ed evidenziando, in questo modo, la versatilità di queste cellule nel combinarsi con virus oncolitici.

UTILIZZO DI VIROTERAPIA ONCOLITICA IN TUMORI SPONTANEI DI CANE

Gli esempi descritti in letteratura di terapie oncolitiche associate a MSCs in medicina veterinaria sono sostanzialmente limitati a pochi lavori, che rivestono quindi una notevole importanza in quanto potrebbero aprire la possibilità di applicare queste terapie anche negli animali domestici.

un primo esempio di terapia anti-tumorale su paziente canino ⁴⁷³

Un primo esempio di utilizzo di virus oncolitico trasportato da MSCs nel trattamento di un paziente canino è stato pubblicato da Delgado-Bonet et al. Il caso riportato è relativo ad un cane meticcio maschio castrato di 10 anni di 20,3 kg con una storia di due mesi di tosse lieve.

Dalla radiografia toracica si è osservata una massa di tessuto molle nella regione ventrale del lobo medio del polmone destro del paziente; l'aspirazione ecografica ha confermato la presenza di un tumore epiteliale maligno.

Successivamente è stata eseguita anche una tomografia toracica computerizzata per la caratterizzazione della massa polmonare, mostrando che era ben circoscritta con margini lisci nel lobo medio del polmone e che vi era un moderato ingrandimento del I linfonodo tracheobronchiale destro.

Sulla base della diagnosi, son state effettuate gli interventi chirurgici di lobectomia ed escissione linfonodale. Prima dell'intervento il paziente è stato trattato con MSCs caricate con un adenovirus oncolitico (dCelyvir).⁴⁷³

In un secondo momento, il trattamento con quest'ultimo è stato lavato due volte e risospeso in tampone salino, affinché fosse pronto per essere somministrato mediante un catetere endovenoso e un filtro cellulare anti-aggregato.

Il caso in oggetto è stato utilizzato come modello clinico per dimostrare la capacità di homing di MSCs, modificate con un adenovirus oncolitico canino e marcate con la proteina verde fluorescente GFP, per dimostrare la localizzazione intra-tumorale delle cellule. Il prodotto ottenuto, dCelyvir-GFP, è stato somministrato ad una dose di $0,5 \cdot 10^6$ cellule/kg di peso in 45 minuti e durante il trattamento, la temperatura, il polso e la frequenza respiratoria del paziente canino sono stati sottoposti a monitoraggio ogni 10 minuti.

La somministrazione è stata fatta 48 ore prima dell'asportazione della massa tumorale. Successivamente, analisi di tipo istologico, citofluorimetrico, e di microscopia a fluorescenza hanno permesso di dimostrare l'homing, anche se limitato, delle cellule all'interno della massa tumorale. La coltura cellulare di queste cellule ha permesso inoltre di verificarne in vitro la capacità replicativa. Questi risultati indicano che le MSCs inoculate sono state in grado di raggiungere il tessuto neoplastico

Inoltre, la presenza di dCelyvir-GFP è stata dimostrata nelle colture di cellule ottenute dalla biopsia polmonare e il supernatante rilasciato da queste è stato sottoposto a qPCR

per quantificare le particelle virali. La quantificazione ha mostrato un elevato numero di copie del genoma virale e queste particelle si sono rivelate infettive in vitro.

Tutti i risultati indicano che il dCelyvir è stato in grado di raggiungere il tumore rilasciando l'adenovirus oncolitico funzionale dopo somministrazione per via intravenosa. Il dato riportato, secondo gli autori, conferma la possibilità di utilizzare questa via di somministrazione su casi clinici reali. In sostanza, la capacità di homing delle MSCs potrebbe essere sfruttata per veicolare virus oncolitici all'interno di masse tumorali anche se non raggiungibili mediante somministrazione diretta.

Un secondo esempio di studio su paziente canino con OV ICOCAV17⁴⁷⁴

In uno altro studio clinico veterinario descritto da Cejaldo T. et al (2018) basato su dCelyvir ottenuto infettando MSCs di cane con il virus oncolitico ICOCAV17, sono stati trattati 27 pazienti affetti da diversi tipi di tumore solido (tra cui osteosarcoma, fibrosarcoma, tumori del sistema nervoso). Dopo infusione intravenosa del preparato cellulare non sono stati osservati effetti avversi significativi, in grado di incidere sulla qualità di vita dei pazienti. La quantità più elevata di DNA adenovirale nei campioni di sangue è stata rilevata 72 ore dopo la prima infusione.⁴⁷⁴

Gli autori riportano una risposta clinica nel 74% degli animali trattati, con 14,8% dei casi che hanno dimostrato una risposta completa. Questi dati, secondo i ricercatori, sostengono l'ipotesi dell'uso di MSCs caricate con virus oncolitici nel trattamento di forme tumorali solide nel cane.

Un terzo esempio di studio su paziente canino con dCelyvir⁴⁷⁵

Un recente lavoro di Cloquell et al. descrive un'ulteriore applicazione di terapia basata sull'uso di virus oncolitici veicolati da MSCs in tumori del cane, in particolare nei gliomi maligni. Non esiste ad oggi una terapia considerata gold standard per questo tipo di neoplasie nel cane.

Queste forme presentano somiglianze biologiche, genetiche, fenotipiche, immunologiche e cliniche con la forma corrispondente umana, rappresentando quindi un potenziale modello di terapia traslazionale.

Son stati selezionati 10 cani con gliomi rostrotentoriali ad alto grado al fine di esser sottoposti a viroterapia sistemica endovenosa settimanale con dCelyvir ($0,5 \times 10^6$ MSC/kg infettate con l'adenovirus oncolitico canino ICOCV17) per una durata di 8 settimane.

L'efficacia è stata determinata poi considerando lo stato clinico e le misure della risonanza magnetica in 7 cani totali su 10 arruolati.

I criteri di inclusione dei pazienti nello studio erano i seguenti:

- presenza di una singola massa rostrotentoriale intra-assiale;
- nessun trattamento precedente, se non qualche cura palliativa con anticonvulsivanti e/o prednisone;
- buone condizioni fisiche, senza evidenza ematologiche o biochimiche di disfunzione d'organo;
- un lieve aumento degli enzimi epatici;
- peso superiore a 4 kg;
- assenza di concomitanza con altre malattie neoplastiche o infiammatorie.

I pazienti che hanno sviluppato severe anomalie biochimiche o una progressione della patologia dopo il primo trattamento sono stati esclusi dallo studio. Due cani hanno avuto una risposta parziale (PR), ovvero riduzione delle dimensioni pari a 76% e 86% rispettivamente, mentre altri tre hanno mostrato una malattia stabile (SD).

Questi cinque pazienti sono stati selezionati per un secondo ciclo di dCelyvir (quattro dosi, ogni 2 settimane).

Sono stati rilevati sporadicamente effetti avversi di minore entità quali gonfiore degli arti e affaticamento, ma non sono risultati autolimitanti o con necessità di un trattamento antinfiammatorio a breve termine.

Non si sono verificate variazioni significative dell'emocromo completo e i parametri biochimici sono rimasti nel range ideale, durante terapia e follow-up.

L'uso di dCelyvir non ha evidenziato significativi cambiamenti patologici o segni clinici in nessun paziente a livello epatico.^{474,476}

Tutti i cani hanno mostrato un aumento delle IgG anti ICOCAV17 fino al raggiungimento di un plateau dopo la seconda dose di dCelyvir.^{474,477}

Si è messa in luce una correlazione tra gli anticorpi antivirali e le particelle di ICOCAV17, suggerendo che una concentrazione più bassa di immunoglobuline potrebbe causare la riduzione delle particelle virali neutralizzate, permettendo in tal modo una maggiore carica virale oncolitica.

Osservando il profilo delle citochine, si è notata l'assenza di una risposta infiammatoria diffusa che potrebbe esser indice di una risposta sistemica limitata, a differenza di altri vaccini iniettati per via intratecale.⁴⁷⁸

Infine i cani hanno presentato una tendenza alla riduzione dell'infiltrazione delle cellule B memoria e un aumento delle cellule B attivate e dei monociti/macrofagi.

Sette cani sono sopravvissuti più di 2 mesi dopo l'inizio della terapia, effettuando anche una seconda valutazione di risonanza magnetica.

Quattro cani sono morti naturalmente e sei sono stati sottoposti a eutanasia a causa del deterioramento clinico su richiesta del proprietario.

La mediana di sopravvivenza (MST) è stata pari a 128 giorni dall'esordio clinico, 123 giorni dalla diagnosi e 90 giorni dall'inizio della viroterapia.

Il ritrovamento di adenovirus all'interno dei tumori è la prova che le dMSCs sono efficaci come veicoli ICOCAV17.

Tale lavoro rappresenta un'ulteriore conferma della possibilità di sviluppare in futuro protocolli terapeutici sicuri ed efficaci per la terapia basata su virus oncolitici in tumori degli animali da affezione.

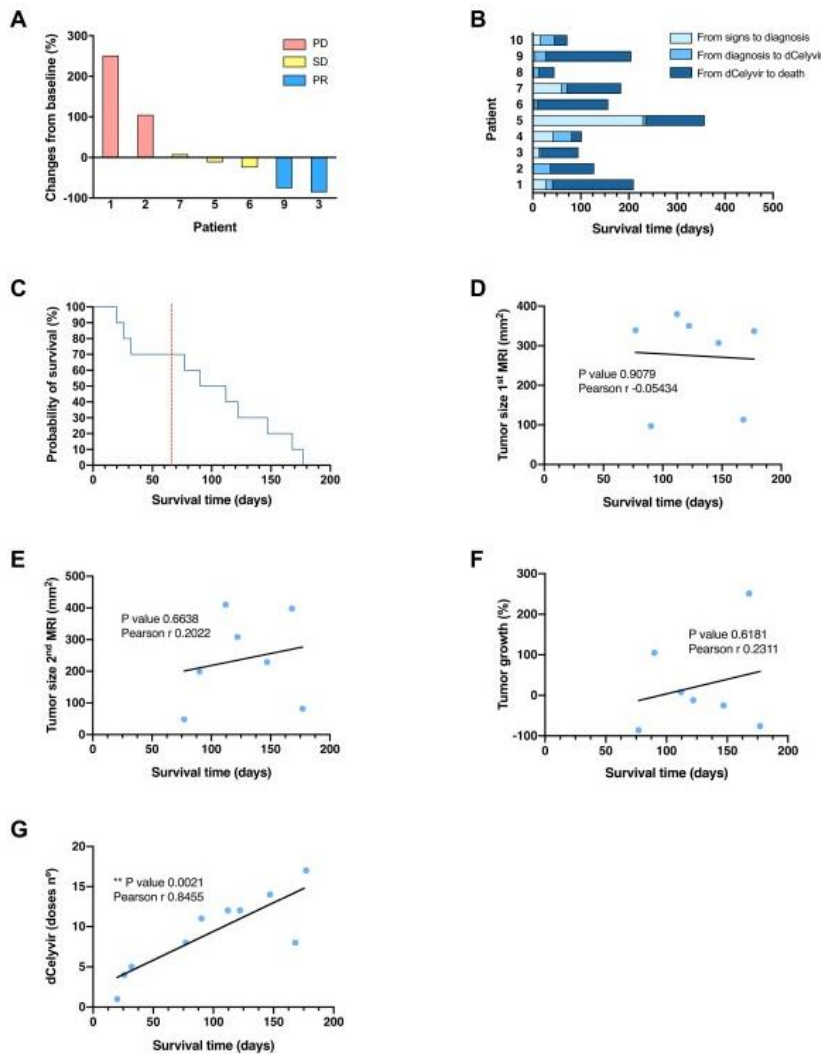


Figura 6. Crescita tumorale e tempo di sopravvivenza dei pazienti trattati con dCelyvir. (A) Grafico a cascata che mostra i cambiamenti nelle dimensioni del tumore. Per ogni paziente è mostrata la crescita del tumore dal basale (prima RM) a 2 mesi dopo l'inizio del trattamento con dCelyvir (seconda RM)

(B) Tempo di sopravvivenza. Grafico a barre che mostra il tempo di sopravvivenza totale per ciascun paziente. I giorni trascorsi dalla comparsa dei sintomi alla diagnosi all'inizio del trattamento con dCelyvir e dal trattamento alla morte sono indicati per ciascun paziente.

(C) Analisi di sopravvivenza. Curva di Kaplan-Meier che mostra la probabilità di sopravvivenza per i cani trattati con dCelyvir (linea blu) a partire dal giorno del trattamento fino alla morte. La linea rossa tratteggiata indica la MST secondo la letteratura e i casi storici trattati con chirurgia resettiva.

(D-G) Analisi di correlazione tra il tempo di sopravvivenza e le dimensioni del tumore alla prima RM (D), alla seconda RM (E), la crescita del tumore (F) e la dose di dCelyvir (G), calcolata con il coefficiente di correlazione di Pearson (r). Sono mostrati i valori individuali (punti blu) e le linee di regressione.

** $p < 0.005$. MST, tempo mediano di sopravvivenza; PD, malattia progressiva; PR, risposta parziale; SD, malattia stabile.

Systemic cellular viroimmunotherapy for canine high-grade gliomas, Cloquell A, Mateo I, Gambera S, et al., 2022⁴⁷⁵

IMMUNOTERAPIA

La chemioresistenza è una problematica di rilievo nel trattamento del cancro. La resistenza ai trattamenti farmacologici da parte delle cellule tumorali viene acquisita attraverso diversi meccanismi e vie di regolazione che interessano, ad esempio, il metabolismo, le vie di controllo della crescita e dell'apoptosi, l'assorbimento o l'efflusso del farmaco.⁴⁷⁹

Come precedentemente indicato, le MSCs associate al cancro (CA-MSCs)⁴⁸⁰ sono capaci di stimolare la crescita dei tumori, l'angiogenesi e promuovere la chemioresistenza: questo fenomeno si verifica mediante interazioni dirette delle CA-MSCs con le cellule tumorali⁴⁸¹ e/o il rilascio di vari fattori tra cui citochine, fattori di crescita, esosomi e lipidi.

Ad esempio, è stato dimostrato che CCL5, IL-6 e IL-8⁴⁸²⁻⁴⁸⁴ sono coinvolti nell'acquisizione della chemioresistenza: è stato infatti appurato che viene indotta dalla secrezione autocrina della seconda interleuchina da parte delle cellule tumorali, mentre la sua inibizione è in grado di ri-sensibilizzare quest'ultime al cisplatino e al paclitaxel.

Tali dati suggeriscono che l'IL-8, così come altri ligandi dei recettori delle chemochine 1 e 2 (CXCR1/2), potrebbero essere coinvolti nell'acquisizione della chemioresistenza attraverso il reclutamento di cellule staminali mesenchimali intorno al tumore.⁴⁸³

Le vie di segnalazione attivate dall'IL-8 (PI3K e fosfolipasi C) sono infatti stimulate attraverso l'interazione della citochina con il CXCR1/2 espresso da neutrofili, monociti, cellule endoteliali, astrociti, microglia e diversi tipi di cellule tumorali.^{485,486}

I monociti si differenziano in macrofagi una volta infiltrati nei tessuti e rappresentano una notevole componente del microambiente tumorale. I macrofagi poi sono particolarmente plastici e capaci di differenziarsi in stati funzionali specifici in risposta ai segnali stromali: gli M1 posseggono un'attività tumoricida mediante la secrezione di fattori citotossici, mentre i macrofagi M2 producono generalmente solo bassi livelli di specie reattive dell'azoto/ossigeno (ROS), mostrano basse quantità di presentazione dell'antigene e sopprimono l'immunità antitumorale.²³

Differenti studi hanno evidenziato il reclutamento dei secondi macrofagi sopracitati nei tumori solidi in risposta alla chemioterapia.⁴⁸⁷ questi associati al tumore (denominati "TAM") forniscono un microambiente immunosoppressivo,^{488,489} partecipano all'angiogenesi attraverso il rilascio di fattori di crescita endoteliali e proteggono le cellule tumorali dalla chemioterapia a base di paclitaxel in neoplasie solide,⁴⁹⁰ oppure dall'apoptosi indotta dal melfalan nel caso del mieloma multiplo.⁴⁹¹

Le CA-MSCs e le iCA-MSCs registrano CXCL1, CXCL2 e IL-8.

Diversi modelli in vitro hanno dimostrato che MSCs con fenotipo normale, possono essere trasformate in CA-MSCs, quando coltivate in presenza di cellule tumorali. Queste cellule sono denominate iCA-MSCs.

Le iCA-MSCs acquisiscono nuove funzioni come la capacità di secernere fattori in grado di indurre la chemioresistenza in popolazioni di cellule tumorali.⁴⁹² Le iCA-MSCs dimostrano una up-regulation di diversi geni pro-tumorali (ad es. IL-6), pro-metastatici (ad es. CCL5) e pro-angiogenetici (es. IL-8 e CCL5), indicando che la coltura di MSCs in un contesto neoplastico è in grado di cambiarle in un fenotipo pro-tumorale.

Sono stati analizzati i dati ottenuti dall'analisi dell'espressione genica per identificare i fattori secreti prodotti dalle CA-MSCs e responsabili dell'acquisizione della chemioresistenza da parte delle CTU.

Il focus è stato sui ligandi CXCR1/2, essendo queste chemochine coinvolte nella chemioresistenza al cisplatino e al taxano⁴⁸³ ed associate alla progressione dei tumori solidi.⁴⁹³

In particolare CXCL1, CXCL2 e IL-8 sono risultati essere ampiamente up-regolati nelle iCA-MSCs rispetto alle MSCs con fenotipo normale.

Inoltre, gli autori hanno valutato se il trattamento con carboplatino modificasse la natura delle chemochine secrete dalle iCA-MSCs: quella di CXCL1 è stata aumentata sia da parte delle MSCs che dalle iCA-MSCs, al contrario la produzione di CXCL2 e IL-8 è stata influenzata solo in minima parte.

Infine, i ricercatori hanno valutato i livelli dei tre ligandi CXCR1/2 nel siero di pazienti con adenocarcinoma ovarico raccolte al momento della diagnosi: la classificazione della recidiva è stata ottenuta in base alla durata dell'intervallo libero da platino, corrispondente all'arco temporale tra la data dell'ultima dose e quella della ricaduta.⁴⁹⁴

La somma delle concentrazioni di CXCL1, CXCL2 e IL-8 ha mostrato che i pazienti con tumore resistente avevano una maggiore concentrazione di queste chemochine.

I risultati hanno dimostrato che l'aumento dei livelli dei ligandi CXCR1/2 può essere un marcatore predittivo della risposta del tumore alla chemioterapia e quindi sembrano essere bersagli promettenti per comprendere i meccanismi con cui le MSCs inducono l'acquisizione della chemioresistenza nelle cellule tumorali.

Per verificare se i ligandi di CXCR1/2 potessero svolgere un ruolo nella chemioresistenza mediata dalle MSCs, uno studio ha determinato quest'ultima nei confronti del carboplatino in un modello di tumore ovarico in presenza od assenza di un inibitore di CXCR1/2.⁴⁹⁵

Gli autori concludono che l'inibitore di CXCR1/2 può invertire la chemioresistenza acquisita da parte delle cellule tumorali mediata dalle MSCs attraverso i ligandi CXCR1/2.

MSCs E SISTEMA IMMUNITARIO NEI TUMORI

Le MSCs potrebbero anche svolgere un ruolo nell'attività antitumorale del sistema immunitario.

In particolare l'attenzione della letteratura scientifica si è indirizzata allo studio dei rapporti tra CA-MSCs e popolazioni monocitarie e macrofagiche, il cui ruolo nei confronti dei tumori può variare a seconda del fenotipo acquisito.

In lavori recenti^{492,496-499} sulle funzioni biologiche delle iCA-MSCs, l'analisi trascrittomica ha rivelato che le iCA-MSCs esercitano up-regulation dei fattori coinvolti nell'attivazione delle cellule immunitarie, in particolare dei ligandi CXCR1/2, IL-6 e LIF, nonché di CCL5, CXCL3, CXCL5 e CXCL6.

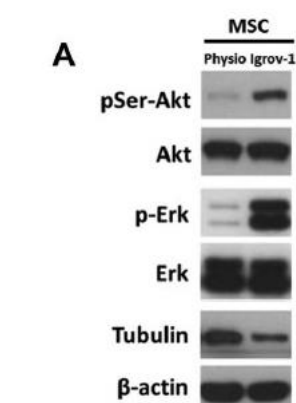


Figura 7. Tumor cells educate mesenchymal stromal cells to release chemoprotective and immunomodulatory factors, Augustin Le Naour, 2020⁴⁹²

Sono stati messi in coltura monociti derivanti da donatori sani in presenza di medium condizionato derivato da BM-MSCs normali, CA-MSCs o iCA-MSCs affinché si delineassero i fattori secreti dalle staminali coinvolti nella polarizzazione dei macrofagi.

I livelli di espressione dei geni M2-specifici sono aumentati nei monociti/macrofagi coltivati in presenza di CM derivato da iCA-MSCs e pertanto sono stati in grado di indurre la up-regulation di marcatori M2-specifici, suggerendo una conversione dei monociti naive in macrofagi M2, i quali sono generalmente pro-tumorali e non posseggono le proprietà tumoricide degli M1.

Gli stessi autori hanno dimostrato che l'attività antitumorale di monociti esposti ai medium condizionati derivati da CA-MSCs o iCA-MSCs nei confronti di tumori sperimentali ovarici (OTC) è fortemente diminuita rispetto a monociti non trattati od esposti a CM derivato da MSCs normali.

Nell'insieme questi dati indicano una effettiva capacità delle CA-MSCs di contribuire alla diminuzione della risposta del sistema immunitario nei confronti delle cellule tumorali.

L'inibizione di CXCR1/2 ripristina la funzione tumoricida di macrofagi

E' stato valutato l'impatto dell'inibizione della via di segnalazione mediata da CXCR1/2 sulla capacità dei macrofagi coltivati in CM di CA-MSCs di uccidere cellule tumorali ovariche (OTC). Le cellule sono state coltivate in presenza di monociti naïve sia in terreno di controllo che in CM di CA-MSCs o iCA-MSC (MSC/igrov-1 e MSC/skov-3) o in ascite, in presenza o in assenza di dell'inibitore CXCR1/2.

In condizioni di assenza degli inibitori CXCR 1/2 i monociti non sono stati in grado di uccidere in modo efficiente le cellule tumorali, mentre hanno avuto una maggiore capacità tumoricida quando sono stati coltivati nelle stesse condizioni in presenza dell'inibitore CXCR1/2, il cui effetto era particolarmente più marcato in quelli coltivati in CM da CA-MSCs rispetto ai monociti in ascite.

Avendo l'inibitore di CXCR1/2 ripristinato le proprietà antitumorali dei macrofagi in vitro, il gruppo di ricerca ha indagato se fosse possibile osservare un simile comportamento in vivo: i macrofagi M1 sono caratterizzati da alti livelli di produzione di ROS⁵⁰⁰ e dunque è stata misurata in topi a cui erano stati iniettati OTC con o senza MSCs e trattati o meno con una combinazione di carboplatino e reparixin.

Si è osservato che la presenza di staminali ha causato una riduzione produzione di ROS da parte dei macrofagi peritoneali, mentre nei topi iniettati con OTC e MSCs e trattati con reparixina, vi è stato un aumento, suggerendo una polarizzazione dei macrofagi verso un fenotipo M1.

Una parte dell'effetto tumoricida dei macrofagi peritoneali osservato nei topi sopracitati potrebbe essere dovuto a un incremento della fagocitosi.

Complessivamente, i risultati dimostrano che le CA-MSCs, grazie ai fattori rilasciati, sono in grado non solo di proteggere le cellule tumorali ovariche dal carboplatino, ma anche di stimolare la differenziazione dei monociti verso un fenotipo M2 pro-tumorale, favorendo la progressione neoplastica e l'acquisizione di chemioresistenza da parte delle cellule tumorali.

Nel processo svolge un ruolo importante CXCR1/2: nel momento in cui avviene l'inibizione della via di segnalazione CXCR1/2, i macrofagi attivati dalle CA-MSCs perdono il loro fenotipo M2 e presentano funzioni anti-neoplastiche e questo è in grado di contrastare l'effetto pro-tumorale del microambiente sensibilizzando le cellule tumorali al carboplatino e inducendo l'immunità antitumorale

CAPITOLO 5

LE PROBLEMATICHE ASSOCIATE ALLE TERAPIE ANTITUMORALI CON MSCs

Come è stato precedentemente descritto le MSCs possono interagire in modo complesso e dinamico con le cellule tumorali. La ricerca ha evidenziato come queste cellule possiedano sia attività pro-tumorigeniche, favorendo la crescita neoplastica, sia anti-tumorali, inibendone lo sviluppo.

E' stato anche descritto come la comunicazione tra MSCs e cellule tumorali sia bidirezionale: le staminali possono influenzare il fenotipo tumorale e le cellule neoplastiche possono modificare il fenotipo delle MSCs spingendo queste cellule a svolgere un'azione pro-tumorigenica.

Dal punto di vista terapeutico quindi le MSCs devono essere utilizzate tenendo conto dell'esistenza di queste potenzialità di problematiche. In questo paragrafo verranno descritti alcuni dei possibili rischi associati alla terapia antitumorale con MSCs o con prodotti da esse derivati, come le vescicole extracellulari.

TERAPIA CON ESOSOMI

FACILITAZIONE DELLA CRESCITA DEI TUMORI E DELLE METASTASI

Le EVs derivate dalle MSCs possono in alcune condizioni causare effetti proliferativi sulle cellule tumorali: ad esempio EVs derivate da hBMSCs hanno dimostrato di favorire la proliferazione, la migrazione e la tumorigenesi nel carcinoma nasofaringeo³⁴⁶ e nell'osteosarcoma,⁵⁰¹ mentre quelle derivate da hUCMSCs hanno avuto un effetto simile nel carcinoma renale,⁵⁰² nel carcinoma polmonare^{503,504} e nel carcinoma mammario.⁵⁰⁵

Anche gli miRNA contenuti nelle EVs possono contribuire a tali modulazioni: il miR-410 da microvescicole derivate da hUCMSCs favorisce la crescita dell'adenocarcinoma polmonare attraverso l'inibizione mirata di PTEN, coinvolto nella proliferazione e nell'apoptosi delle cellule tumorali.⁵⁰³

Anche un altro miRNA, il miR-130b-3p, è stato arricchito in EVs derivate da hUCMSCs e poi trasferito in cellule di cancro del polmone, svolgendo un ruolo oncogenico attraverso l'asse FOXO3/NFE2L2/TXNRD1.⁵⁰⁴

Analogamente, il miR-21-5p sovraespresso da microvescicole derivate da hBMSCs sottoposte a ipossia, ha esercitato effetti pro-proliferativi e pro-metastatici, abrogando

l'apoptosi e inducendo la polarizzazione dei macrofagi M2 nel carcinoma polmonare, con una bassa espressione proteica di diversi geni pro-apoptotici (ad esempio, PTEN, PDCD4 e RECK).⁵⁰⁶

Inoltre, la minor concentrazione di miR-15a negli esosomi derivati da hBMSCs provenienti da pazienti affetti da mieloma multiplo, è stata identificata come una possibile causa di attività pro-tumorali.⁵⁰⁷

Un gruppo di ricerca⁵⁰² ha riportato che le EVs derivate da hUCMSCs promuovono la crescita tumorale e metastasi nel carcinoma renale attraverso l'attivazione delle vie di segnalazione AKT e ERK1/2: l'effetto è dovuto alla sintesi del fattore di crescita degli epatociti (HGF), all'induzione della sintesi del fattore di crescita epatocitario (HGF) in presenza dell'mRNA di HGF umano trasferito dalle EVs.

Un altro studio⁵⁰¹ ha dimostrato che l'IncRNA PVT1 impacchettato in esosomi derivati da hBMSCs è in grado di regolare la proteina oncogenica ERG, limitandone la degradazione e l'ubiquitinazione.

Per quanto concerne le proteine esosomiali, è stata pubblicata una ricerca⁵⁰⁸ in cui si è riscontrato che l'ubiquitina-proteina E3 UBR2 è stata arricchita negli esosomi derivati da BMSCs di topo carenti di p53.

L'espressione di UBR2 è incrementata anche nelle cellule di cancro gastrico trattate con gli esosomi, dove aumentano la crescita del tumore e la metastasi attraverso il meccanismo Wnt/ β -catenina.

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che miRNA, lncRNA, mRNA e proteine esosomiali possono essere trasportati nelle cellule bersaglio e svolgere ruoli specifici nei confronti della biologia dei tumori.

In particolare, i collegamenti tra la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e la progressione tumorale sono di fondamentale rilievo: l'EMT è un processo in cui le cellule passano da un fenotipo epiteliale a uno mesenchimale, riducendo l'adesione cellula-cellula e aumentando la capacità migratoria.⁵⁰⁹

Diversi studi hanno dimostrato che gli effetti pro-metastatici delle EVs derivate da MSCs nelle cellule tumorali sono proprio legati all'induzione di questo evento.

Un gruppo di ricerca³⁴⁶ ha evidenziato come gli esosomi derivati da hBMSCs hanno causato il potenziamento dell'attivazione della cascata di segnalazione FGF19-FGFR4 ERK-dipendente, inducendo l'EMT delle cellule di carcinoma nasofaringeo, le quali sono state incubate con gli esosomi, portando a una maggiore crescita tumorale e metastasi.

Similmente, altri studiosi⁵¹⁰ hanno riferito che le EVs derivate dalle hUCMSCs hanno facilitato la progressione tumorale e metastasi nel cancro al seno attraverso l'induzione di EMT e l'up-regulation della via ERK.

DORMIENZA E INDUZIONE DELLA CHEMIORESISTENZA

Per dormienza tumorale (o quiescenza) si intende la capacità delle cellule neoplastiche di rimanere in quantità ridotte e non rilevabili nel sito metastatico dopo la resezione del tumore primario.

Questo fenomeno è associato a chemioresistenza, a prolungata malattia residua asintomatica e recidiva.⁵⁰⁵

Uno dei casi più rilevanti di dormienza tumorale è il cancro al seno, le cui cellule disseminate possono migrare nel midollo osseo e poi indurre una quiescenza prolungata all'interno della nicchia delle staminali mesenchimali, riducendo la proliferazione e l'invasione ed aumentando l'adesione cellulare.⁵¹¹

Per quanto riguarda la dormienza nel microambiente del midollo osseo, ci sono alcune prove che suggeriscono che le MSCs residenti svolgono un ruolo chiave.⁵¹²

Pertanto, i ricercatori si sono focalizzati sull'identificazione dei meccanismi molecolari e cellulari che determinano il coinvolgimento delle MSCs nel fenomeno della quiescenza tumorale: un gruppo di ricerca⁵¹³ ha dimostrato che gli esosomi secreti dalle hBMSCs hanno trasferito il miR-23b nelle cellule di cancro al seno metastatico, inducendo la dormienza mediante inibizione del suo oncogene bersaglio MARCKS.

Questo risultato è coerente con quello ottenuto da un diverso gruppo di ricerca,⁵¹⁴ secondo cui le cellule metastatiche di carcinoma mammario trattate con le hBMSCs sono state indotte a subire una transizione mesenchimale-epiteliale (MET) mantenendo uno stato di quiescenza, mostrato come inibizione della migrazione e promozione dell'adesione cellulare.

I due studi hanno dimostrato che questo stato delle cellule tumorali è ciclico e favorisce così la protezione dalla chemioterapia e lo sviluppo della chemioresistenza.

In maniera analoga, gli esosomi derivati dalle hUCMSCs possono rafforzare la quiescenza e proteggono le cellule tumorali dai trattamenti convenzionali trasferendo miRNA esosomiali nel cancro al seno metastatico.⁵¹⁵

Oltre a questa neoplasia, è stata potenziata anche la chemioresistenza del tumore gastrico da esosomi derivati da hUCMSCs:⁵¹⁶ in questa situazione le proteine esosomiali e anche gli miRNA esosomiali, hanno conferito resistenza ai farmaci attraverso l'attivazione della via CaM-Ks/Raf/MEK/ERK.

In conclusione, le EVs derivate da MSCs di diversa origine, e probabilmente preparate secondo procedure differenti, mostrano effetti diversi su tumori specifici.

Questi risultati sperimentali potrebbero essere associati all'eterogeneità delle cellule staminali, alla complessità del microambiente tumorale, alla diversità delle origini neoplastiche e alle varie condizioni sperimentali.

I meccanismi e i carichi multipli delle EVs potrebbero quindi essere coinvolti secondo svariate modalità nella modulazione della progressione tumorale.

Nella terapia rigenerativa basata sull'uso di MSCs sia wildtype sia modificate geneticamente, vi possono essere dei potenziali rischi di un certo rilievo, come il loro possibile danno agli organi normali (ad esempio in seguito a somministrazione per via sistemica di elevate quantità di cellule), la possibilità di una loro trasformazione maligna e la promozione della crescita di eventuali tumori presenti nel paziente.⁴¹⁴

In effetti, diversi modelli animali hanno sollevato problemi di sicurezza: ad esempio, è stata osservata la formazione spontanea di osteosarcomi in coltura in MSCs di derivazione murina, oppure ancora sono stati descritti ossificazione ectopica e focolai di calcificazione in modelli di infarto miocardico di topo e di ratto dopo l'iniezione locale di cellule staminali.⁵¹⁷

Il loro potenziale pro-aritmico è stato evidenziato anche in esperimenti di co-coltura con miociti ventricolari neonatali di ratto.⁵¹⁸

In aggiunta ancora è stata osservata un'ossificazione polmonare bilaterale diffusa a seguito di un trapianto di midollo osseo nel cane.⁵¹⁹

Una delle metodiche potenzialmente utilizzabili per fronteggiare queste eventualità è quella di incorporare un gene suicida nelle MSCs e i più usati sono l'Herpes Simplex Virus Timidina Chinasi e la Citosina Deaminasi.⁵²⁰ Tali approcci non possono essere utilizzabili nelle normali applicazioni terapeutiche con MSCs (patologie muscolo-scheletriche, patologie d'organo etc), ma potrebbero essere applicate nelle terapie tumorali.

Questi transgeni conferiscono la capacità di convertire un farmaco non tossico (ad esempio ganciclovir nel caso della timidina chinasi) in un composto citotossico attivo che uccide la cellula stessa e quelle vicine: questo "effetto bystander" è stato utilizzato per composti citotossici nei tumori con beneficio terapeutico, limitando difatti la probabile nocività fuori bersaglio.⁵²¹

Tuttavia, questi sistemi hanno mostrato di possedere una serie di svantaggi, quali la possibile immunogenicità con la conseguente eliminazione da parte del sistema immunitario⁵²² e l'elevata dipendenza dal ciclo cellulare dei farmaci attivati, limitante così la capacità di uccidere le cellule in divisione.⁵²³

Altri studi indicano la possibilità di una insorgenza di resistenza al farmaco da parte delle cellule bersaglio.⁵²⁴

PROBLEMATICHE RELATIVE ALLE TERAPIE ANTI-TUMORALI CON VIRUS ONCOLITICI ASSOCIATI A MSCs

Nei tumori solidi, l'oncovirus deve riuscire a bypassare una serie di ostacoli per giungere nel sito tumorale.

In primo luogo, le barriere fisiche rappresentano una grande difficoltà per la consegna, dato che i virus devono superare lo strato endoteliale per raggiungere le cellule bersaglio.⁵²⁵

Inoltre, le reti linfatiche anomale, l'iper-permeabilità vascolare interna ai tumori e la densa matrice extracellulare (ECM) determinano un'ipertensione interstiziale,⁵²⁶ che può compromettere l'infiltrazione virale.

Gli oncovirus possono anche indurre una forte risposta immunitaria innata grazie alle interazioni tra essi e le cellule presentanti l'antigene (APC), assieme all'immunità antivirale diffusa, agli anticorpi circolanti preesistenti e a fattori ematici come quelli di coagulazione FIX, FX e la proteina del complemento C4BP.

Di conseguenza, gli OV sono maggiormente soggetti alla possibilità di essere eliminati dal sistema immunitario dell'ospite e l'accertamento del raggiungimento del sito tumorale da parte di un numero sufficiente è arduo.^{526,527}

Un altro ostacolo critico è il numero eccessivo di barriere individuali nella TME immunosoppressiva dei tumori solidi: infatti le cellule neoplastiche possono sfuggire alla sorveglianza immunitaria, proliferare rapidamente e metastatizzare se associate alla disfunzione del TME.

I tumori solidi possono secernere chemochine e citochine come l'interleuchina (IL-10), il fattore di crescita trasformante b (TGF-b) e l'arginasi-1,⁵²⁸ che sono in grado di sopprimere la popolazione di cellule immunitarie e di reclutare cellule immunosoppressive, quali le cellule T-regolatrici, le cellule soppressive di derivazione mieloide, i macrofagi associati al tumore (TAM), i fibroblasti associati al tumore e i neutrofili.

Tutte queste possono fornire protezione alle neoplasie verso risposte immunitarie antitumorali funzionali⁵²⁹ e, di conseguenza, i segnali inibitori e i recettori di checkpoint immunitario, come PD-1, CTLA-4, TIM-3 e LAG-3, sono soggetti a up-regulation nelle TIL, contribuendo così a dare origine ad un ambiente tumorale immunosoppressivo.

Inoltre, anche l'organizzazione e la struttura anormale della vascolarizzazione tumorale possono compromettere l'apporto di sangue:⁵²⁵ l'ipossia localizzata e il microambiente a basso pH potrebbero causare inibizione dell'apoptosi delle cellule tumorali, promuovere l'angiogenesi, regolare i fattori di crescita del tumore e rendere queste cellule più resistenti ai metodi terapeutici standard, quali la radioterapia, i farmaci citotossici e l'immunoterapia.⁵³⁰⁻⁵³²

Pertanto, quando gli OV_s raggiungono il sito tumorale, è essenziale che mantengano le loro funzioni all'interno del microambiente tumorale immunosoppressivo, dato che questo svolge un ruolo cardine nella proliferazione e nella sopravvivenza delle cellule neoplastiche.

EFFETTI SISTEMICI DELLA TERAPIA ONCOVIRALE

Vi sono stati numerosi studi sui virus oncolitici, alcuni dei quali si sono soffermati sui risultati ottenuti verso le metastasi distanti nei pazienti con lesioni inoculate localmente, un fenomeno noto come "effetto abscopico".

Il raggio d'azione della trasfezione virale oncolitica è limitato a una distribuzione loco-regionale, come è stato dimostrato in molteplici modelli animali e umani dove, campionate lesioni metastatiche, si è mostrata l'assenza di DNA o RNA virale.

Tuttavia è stato osservato che, almeno in alcuni modelli, l'impatto degli OV_s si estende a loci privi di virus causando o una regressione o un ritardo nella crescita del tumore.⁵³³⁻⁵³⁶

Non è ancora delineato il meccanismo per cui questo fenomeno si verifichi e nemmeno se sia mediato direttamente da un prodotto virale non identificato e ancora non misurato, da una reazione antigenica incrociata o come conseguenza di un condizionamento/stimolazione immunitaria globale.

Nonostante sia stato documentato il reclutamento di linfociti infiltranti il tumore a siti metastatici distanti non iniettati dopo la somministrazione di oncovirus, le caratteristiche della risposta immunitaria differiscono da quelle nel sito primario: uno studio ha illustrato l'infiltrazione di cellule T CD8⁺ e CD 4⁺ in corrispondenza delle lesioni remote in modo dipendente dall'IFN I, anche se le cellule T regolatrici erano assenti, nonostante fossero state rilevate nel sito di inoculazione.⁵³⁴

POTENZIALI LIMITAZIONI

Nella somministrazione di oncovirus guidata dall'immagine si comprendono la pianificazione, l'indirizzamento, il controllo, il monitoraggio e la valutazione della risposta al trattamento delle lesioni.

La revisione delle immagini per la pianificazione è una fase fondamentale per la localizzazione delle lesioni neoplastiche, per la caratterizzazione e per l'attribuzione di priorità ai bersagli terapeutici: ad esempio, l'identificazione di una lesione di grandi dimensioni ma necrotiche non sarebbe preferibile rispetto a una più piccola ma con caratteristiche di metabolismo/proliferazione attivo.

La traiettoria proposta per l'ago può anche essere mappata tramite imaging per minimizzare l'attraversamento di strutture anatomiche indesiderate o ad alto rischio.

Inoltre, questa metodica consente l'accesso diretto a sedi corporee remote che non sarebbero necessariamente adatte a un'efficace distribuzione ematogena della terapia sistemica, come ad esempio i tumori maligni con bassi indici mitotici o scarsamente vascolarizzati.

Come per tutte le procedure, anche la terapia oncovirale guidata da immagini è associata a svantaggi. Tuttavia, i rischi complessivi sono piuttosto bassi e paragonabili alle procedure standard di cura.

Gli effetti negativi possono essere suddivisi tra quelli legati alla tecnica e quelli alla terapia.

Tra i primi, l'emorragia e la lesione involontaria di un organo sono i principali eventi avversi potenziali estremamente improbabili e sono identici a quelli accettati nelle normali procedure biottiche.

A differenza di altre terapie locoregionali, quella oncovirale diretta non richiede ulteriori precauzioni e non sono stati segnalati casi di ritorno della virulenza del virus.

Non sono state ancora segnalazioni di una reazione infiammatoria locale possibilmente deregolata, anche se potrebbe verificarsi.

Un rischio aggiuntivo specifico potrebbe essere la fuoriuscita di materiale attraverso il tratto dell'ago, anche se poco probabile dato il diametro interno da 18 gauge, inferiore a un millimetro.

Potrebbe verificarsi una reazione locale ma ci sono approcci per minimizzare questo rischio nel caso in cui diventi clinicamente significativo, quali includere il tracciato con sangue autologo, come si usa per alcune biopsie polmonari ed epatiche.

Inoltre, anche con l'inoculazione diretta possono esser presenti anticorpi neutralizzanti e le nicchie tumorali possono mostrare effetti immunosoppressivi, causando una attenuazione delle risposte terapeutiche.⁵³⁷

L'efficacia degli oncovirus poi, può essere limitata dalla nicchia tumorale se le cellule neoplastiche sono sospese in fase di crescita in risposta all'ipossia o all'acidosi o a causa di necrosi, calcificazione o alta pressione interstiziale nelle vicinanze.

Anche un oncovirus capace di indurre troppo rapidamente l'apoptosi può essere svantaggioso, in quanto potrebbe non produrre una quantità terapeuticamente efficace di nuove particelle virali.^{537,538}

Infine, come ultima possibilità di rischio vi è l'acquisizione di una resistenza oppure l'adattamento del tumore ai virus oncolitici o alla pressione immunitaria tumorale.

EFFETTI DISTALI DEL VIRUS ONCOLITICO INOCULATO LOCALMENTE

L'inoculazione guidata dalle immagini offre la prospettiva di una maggiore tollerabilità, in quanto il prodotto virale sarebbe localizzato in modo specifico nella sede desiderata.

Ad oggi gli studi effettuati hanno dimostrato la scarsità di prodotti virali disponibili in loci remoti rispetto al sito di inoculo, tuttavia sono state documentate risposte immunitarie sistemiche originate dal sito di iniezione.^{533,533-536}

Ciò aumenta la possibilità di effetti avversi, sebbene anche questo sia mitigato rispetto alla terapia sistemica, in quanto la reazione teoricamente sarebbe immuno-mediata ed il cross-priming dell'attivazione immunitaria sarebbe specifico per l'area dell'insulto (cioè il tumore inoculato).

CONCLUSIONI

La ricerca sulle cellule staminali mesenchimali (MSCs) è andata incontro ad un'evoluzione significativa, specialmente grazie all'avanzamento di conoscenze e tecnologie che permettono di sfruttare queste cellule per terapie sempre più complesse e dedicate a patologie specifiche.

Le MSCs sono dotate di proprietà biologiche che le rendono uniche. Mostrano le caratteristiche fondamentali delle cellule staminali (auto-rinnovamento e capacità multi-differenziativa), ma posseggono anche proprietà trofiche, anti-infiammatorie, immunomodulatorie, anti-apoptotiche e anti-microbiche.

Queste cellule hanno la capacità di modulare la proliferazione e l'attività di cellule immunitarie come linfociti T, cellule natural killer, linfociti B, monociti, macrofagi e cellule dendritiche.

Le MSCs ingegnerizzate – modificate cioè in modo specifico per veicolare agenti terapeutici - rappresentano un pilastro fondamentale nel panorama delle terapie avanzate, data la loro potenziale capacità di veicolare in sedi specifiche farmaci, proteine e acidi nucleici, anche attraverso l'uso di microvescicole. Nel complesso queste proprietà ampliano notevolmente il campo delle possibili applicazioni terapeutiche, rendendo le MSCs strumenti estremamente flessibili ed efficaci.

Questa versatilità è ulteriormente potenziata dalla proprietà di "homing" delle MSCs, che permette loro di migrare in funzione di gradienti chemiotattici per localizzarsi e integrarsi in specifici distretti anatomici. Questa capacità è cruciale, soprattutto quando si affrontano sfide come la somministrazione di agenti terapeutici in siti anatomicamente complessi o la terapia di processi infiammatori generalizzati e malattie degenerative.

Negli ultimi anni la letteratura scientifica ha cominciato a discutere la possibilità di utilizzare le cellule staminali mesenchimali come strumenti terapeutici anche nei confronti di forme tumorali. Studi in-vitro hanno evidenziato come le MSCs possano interagire con il sistema immunitario anche in queste forme di patologia e come tali cellule, grazie alla loro capacità di homing, possano essere studiate per veicolare nella sede del tumore agenti ad azione terapeutica nei confronti della cellula neoplastica.

I dati sulla possibilità di sfruttare questi approcci in-vivo rimangono comunque piuttosto limitati ed in alcuni casi contraddittori.

L'uso di MSCs ingegnerizzate presenta importanti criticità, ancora in larga parte da risolvere. L'intrappolamento delle cellule somministrate in tessuti aspecifici, non coinvolti nella patologia, può compromettere l'efficacia del trattamento.

Inoltre, la complessa azione biologica di queste cellule determina il rischio che queste possano, in alcune condizioni, facilitare la crescita tumorale o indurre stati di dormienza e chemioresistenza nelle cellule neoplastiche.

Un'applicazione importante delle MSCs nella terapia dei tumori è la viroterapia oncolitica, che utilizza particelle virali geneticamente modificate per attaccare selettivamente le cellule neoplastiche.

Le MSCs, in questi approcci fungono da carrier per localizzare in sede di lesione i virus oncolitici. Questa terapia offre numerosi vantaggi potenziali, come la specificità d'azione e la possibilità di combinazione con altre forme di trattamento.

Per quanto riguarda la medicina veterinaria in particolare, recentemente alcuni lavori hanno affrontato la terapia di tumori solidi del cane con l'utilizzo di virus oncolitici veicolati da MSCs. Questi esperimenti, seppur preliminari, evidenziano l'importante potenziale applicativo delle MSCs in queste patologie.

I sistemi utilizzati (quali dCelyvir e adenovirus oncolitico ICOCAV17), hanno dimostrato di poter raggiungere in modo efficiente il tessuto tumorale, con conseguente sviluppo di un effetto terapeutico in numerosi casi clinici trattati.

Tuttavia, il trattamento presenta anche delle sfide significative, come la necessità di superare barriere fisiologiche per raggiungere efficacemente il tessuto tumorale e la potenziale induzione di una risposta immunitaria contro il virus veicolato. Questi ostacoli sottolineano la necessità di ulteriori ricerche per confermare l'efficacia e la sicurezza della viroterapia oncolitica.

In conclusione, l'avanzamento delle tecnologie e la comprensione sempre più profonda delle interazioni cellulari stanno aprendo nuove frontiere nel campo delle terapie innovative.

La ricerca e le applicazioni in ambito veterinario, come dimostrato da studi su pazienti animali, offrono preziose informazioni che potranno essere traslate nello sviluppo di terapie personalizzate più sicure efficaci e per i pazienti umani affetti da neoplasie assimilabili, sottolineando l'importanza dell'interconnessione tra medicina umana e veterinaria.

BIBLIOGRAFIA

1. Venkei, Z. G. & Yamashita, Y. M. Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division. *J Cell Biol* **217**, 3785–3795 (2018).
2. Morrison, S. J. & Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**, 1068–1074 (2006).
3. Knoblich, J. A. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* **132**, 583–597 (2008).
4. Chen, C., Fingerhut, J. M. & Yamashita, Y. M. The ins(ide) and outs(ide) of asymmetric stem cell division. *Curr Opin Cell Biol* **43**, 1–6 (2016).
5. Inaba, M. & Yamashita, Y. M. Asymmetric stem cell division: precision for robustness. *Cell Stem Cell* **11**, 461–469 (2012).
6. Andrzejewska, A., Lukomska, B. & Janowski, M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells* **37**, 855–864 (2019).
7. Nombela-Arrieta, C., Ritz, J. & Silberstein, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 126–131 (2011).
8. Spees, J. L., Lee, R. H. & Gregory, C. A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther* **7**, 125 (2016).
9. Naji, A. *et al.* Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci* **76**, 3323–3348 (2019).
10. Haynesworth, S. E., Baber, M. A. & Caplan, A. I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* **166**, 585–592 (1996).
11. Holgate, S. T. *et al.* Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* **105**, 193–204 (2000).
12. Doorn, J. *et al.* Pro-osteogenic trophic effects by PKA activation in human mesenchymal stromal cells. *Biomaterials* **32**, 6089–6098 (2011).
13. Caplan, A. I. & Bruder, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* **7**, 259–264 (2001).
14. Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815–1822 (2005).
15. Iyer, S. S. & Rojas, M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opin Biol Ther* **8**, 569–581 (2008).
16. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **8**, 726–736 (2008).
17. Weiss, D. J. *et al.* Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc Am Thorac Soc* **8**, 223–272 (2011).
18. Yagi, H. *et al.* Bone marrow mesenchymal stromal cells attenuate organ injury induced by LPS and burn. *Cell Transplant* **19**, 823–830 (2010).

19. Guan, X.-J. *et al.* Mesenchymal stem cells protect cigarette smoke-damaged lung and pulmonary function partly via VEGF-VEGF receptors. *J Cell Biochem* **114**, 323–335 (2013).
20. Murphy, M. B., Moncivais, K. & Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* **45**, e54 (2013).
21. Spaggiari, G. M., 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* **113**, 6576–6583 (2009).
22. Selmani, Z. *et al.* Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells* **26**, 212–222 (2008).
23. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**, 677–686 (2004).
24. Mantovani, A., Sica, A., Allavena, P., Garlanda, C. & Locati, M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum Immunol* **70**, 325–330 (2009).
25. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883–899 (2010).
26. Parekkadan, B. & Milwid, J. M. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng* **12**, 87–117 (2010).
27. Ezquer, F. *et al.* The antidiabetic effect of mesenchymal stem cells is unrelated to their transdifferentiation potential but to their capability to restore Th1/Th2 balance and to modify the pancreatic microenvironment. *Stem Cells* **30**, 1664–1674 (2012).
28. Tollervey, J. R. & Lunyak, V. V. Adult stem cells: simply a tool for regenerative medicine or an additional piece in the puzzle of human aging? *Cell Cycle* **10**, 4173–4176 (2011).
29. Tidball, J. G. & Villalta, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**, R1173–1187 (2010).
30. Choi, E. W. *et al.* Transplantation of CTLA4Ig gene-transduced adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reduces inflammatory immune response and improves Th1/Th2 balance in experimental autoimmune thyroiditis. *J Gene Med* **13**, 3–16 (2011).
31. Kong, Q.-F. *et al.* Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF-β. *J Neuroimmunol* **207**, 83–91 (2009).
32. Mokarram, N., Merchant, A., Mukhatyar, V., Patel, G. & Bellamkonda, R. V. Effect of modulating macrophage phenotype on peripheral nerve repair. *Biomaterials* **33**, 8793–8801 (2012).
33. Wang, Y. *et al.* Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney Int* **72**, 290–299 (2007).
34. Sica, A. *et al.* Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* **18**, 349–355 (2008).
35. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).

36. Siegel, G., Schäfer, R. & Dazzi, F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation* **87**, S45-49 (2009).
37. Eliopoulos, N., Stagg, J., Lejeune, L., Pomme, S. & Galipeau, J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* **106**, 4057–4065 (2005).
38. Hare, J. M. *et al.* Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow–derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* **308**, 2369–2379 (2012).
39. Huang, X.-P. *et al.* Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. *Circulation* **122**, 2419–2429 (2010).
40. Richardson, J. D. *et al.* Optimization of the cardiovascular therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells-taking the next step. *Stem Cell Rev Rep* **9**, 281–302 (2013).
41. Mirotsov, M. *et al.* Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1643–1648 (2007).
42. Alfaro, M. P. *et al.* The Wnt modulator sFRP2 enhances mesenchymal stem cell engraftment, granulation tissue formation and myocardial repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18366–18371 (2008).
43. Zhang, Z. *et al.* Secreted frizzled related protein 2 protects cells from apoptosis by blocking the effect of canonical Wnt3a. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 370–377 (2009).
44. Block, G. J. *et al.* Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells* **27**, 670–681 (2009).
45. Rehman, J. *et al.* Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109**, 1292–1298 (2004).
46. Frohm, M. *et al.* The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* **272**, 15258–15263 (1997).
47. Wu, H., Zhang, G., Minton, J. E., Ross, C. R. & Blecha, F. Regulation of cathelicidin gene expression: induction by lipopolysaccharide, interleukin-6, retinoic acid, and *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection. *Infect Immun* **68**, 5552–5558 (2000).
48. Rogan, M. P. *et al.* Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. *Respir Res* **7**, 29 (2006).
49. Frohm Nilsson, M. *et al.* The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect Immun* **67**, 2561–2566 (1999).
50. Nijnik, A. & Hancock, R. E. W. The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Curr Opin Hematol* **16**, 41–47 (2009).
51. Coffelt, S. B. *et al.* The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3806–3811 (2009).

52. Németh, K. *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* **15**, 42–49 (2009).
53. Gonzalez-Rey, E. *et al.* Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* **58**, 929–939 (2009).
54. Krasnodembskaya, A. *et al.* Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells* **28**, 2229–2238 (2010).
55. Barbash, I. M. *et al.* Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* **108**, 863–868 (2003).
56. Khaldoyanidi, S. Directing stem cell homing. *Cell Stem Cell* **2**, 198–200 (2008).
57. Vajkoczy, P. *et al.* Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med* **197**, 1755–1765 (2003).
58. Karp, J. M. & Leng Teo, G. S. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* **4**, 206–216 (2009).
59. Heo, J. S., Choi, Y., Kim, H.-S. & Kim, H. O. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med* **37**, 115–125 (2016).
60. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H. & Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* **24**, 1294–1301 (2006).
61. Wagner, W. *et al.* Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* **33**, 1402–1416 (2005).
62. Arnhold, S. J. *et al.* Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* **68**, 1095–1105 (2007).
63. Bourzac, C. *et al.* Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Vet J* **42**, 519–527 (2010).
64. Lang, H. M., Schnabel, L. V., Cassano, J. M. & Fortier, L. A. Effect of needle diameter on the viability of equine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Vet Surg* **46**, 731–737 (2017).
65. Ishihara, A. *et al.* Performance of a gravitational marrow separator, multidirectional bone marrow aspiration needle, and repeated bone marrow collections on the production of concentrated bone marrow and separation of mesenchymal stem cells in horses. *Am J Vet Res* **74**, 854–863 (2013).
66. Schnabel, L. V. *et al.* Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* **27**, 1392–1398 (2009).
67. Godwin, E. E., Young, N. J., Dudhia, J., Beamish, I. C. & Smith, R. K. W. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J* **44**, 25–32 (2012).
68. Schnabel, L. V., Fortier, L. A., McIlwraith, C. W. & Nobert, K. M. Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when? *Vet J* **197**, 570–577 (2013).

69. Zayed, M. *et al.* Concepts and challenges in the use of mesenchymal stem cells as a treatment for cartilage damage in the horse. *Res Vet Sci* **118**, 317–323 (2018).
70. Koch, T. G., Berg, L. C. & Betts, D. H. Current and future regenerative medicine - principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can Vet J* **50**, 155–165 (2009).
71. Caniglia, C. J., Schramme, M. C. & Smith, R. K. The effect of intralesional injection of bone marrow derived mesenchymal stem cells and bone marrow supernatant on collagen fibril size in a surgical model of equine superficial digital flexor tendonitis. *Equine Vet J* **44**, 587–593 (2012).
72. Barrachina, L., Romero, A., Zaragoza, P., Rodellar, C. & Vázquez, F. J. Practical considerations for clinical use of mesenchymal stem cells: From the laboratory to the horse. *Vet J* **238**, 49–57 (2018).
73. Barrachina, L. *et al.* Priming Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells with Proinflammatory Cytokines: Implications in Immunomodulation-Immunogenicity Balance, Cell Viability, and Differentiation Potential. *Stem Cells Dev* **26**, 15–24 (2017).
74. Ardanaz, N. *et al.* Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. *BMC Vet Res* **12**, 65 (2016).
75. Joswig, A.-J. *et al.* Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Res Ther* **8**, 42 (2017).
76. Hatsushika, D. *et al.* Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthritis Cartilage* **22**, 941–950 (2014).
77. Broeckx, S. *et al.* Allogenic mesenchymal stem cells as a treatment for equine degenerative joint disease: a pilot study. *Curr Stem Cell Res Ther* **9**, 497–503 (2014).
78. Edmonds, R. E., Garvican, E. R., Smith, R. K. W. & Dudhia, J. Influence of commonly used pharmaceutical agents on equine bone marrow-derived mesenchymal stem cell viability. *Equine Vet J* **49**, 352–357 (2017).
79. Vilar, J. M. *et al.* Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. *BMC Vet Res* **9**, 131 (2013).
80. Guercio, A. *et al.* Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biol Int* **36**, 189–194 (2012).
81. Whitworth, D. J. *et al.* Derivation of mesenchymal stromal cells from canine induced pluripotent stem cells by inhibition of the TGF β /activin signaling pathway. *Stem Cells Dev* **23**, 3021–3033 (2014).
82. Cuervo, B. *et al.* Hip osteoarthritis in dogs: a randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors. *Int J Mol Sci* **15**, 13437–13460 (2014).
83. Penha, E. M. *et al.* Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs. *Stem Cells Int* **2014**, 437521 (2014).
84. Sarmiento, C. A. P., Rodrigues, M. N., Bocabello, R. Z., Mess, A. M. & Miglino, M. A. Pilot study: bone marrow stem cells as a treatment for dogs with chronic spinal cord injury. *Regen Med Res* **2**, 9 (2014).

85. Ferrer, L. *et al.* Treatment of perianal fistulas with human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells: a canine model of human fistulizing Crohn's disease. *Regen Med* **11**, 33–43 (2016).
86. Pérez-Merino, E. M. *et al.* Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: Endoscopic and histological outcomes. *Vet J* **206**, 391–397 (2015).
87. Webb, T. L. & Webb, C. B. Stem cell therapy in cats with chronic enteropathy: a proof-of-concept study. *J Feline Med Surg* **17**, 901–908 (2015).
88. Pogue, B. *et al.* Stem-cell therapy for dilated cardiomyopathy: a pilot study evaluating retrograde coronary venous delivery. *J Small Anim Pract* **54**, 361–366 (2013).
89. Villatoro, A. J. *et al.* Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. *Biomed Res Int* **2015**, 527926 (2015).
90. Wood, J. A. *et al.* Periocular and intra-articular injection of canine adipose-derived mesenchymal stem cells: an in vivo imaging and migration study. *J Ocul Pharmacol Ther* **28**, 307–317 (2012).
91. Zeira, O. *et al.* Adult autologous mesenchymal stem cells for the treatment of suspected non-infectious inflammatory diseases of the canine central nervous system: safety, feasibility and preliminary clinical findings. *J Neuroinflammation* **12**, 181 (2015).
92. Quimby, J. M. & Dow, S. W. Novel treatment strategies for feline chronic kidney disease: A critical look at the potential of mesenchymal stem cell therapy. *Vet J* **204**, 241–246 (2015).
93. Quimby, J. M., Webb, T. L., Gibbons, D. S. & Dow, S. W. Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: a pilot study. *J Feline Med Surg* **13**, 418–426 (2011).
94. Pezzanite, L. M. *et al.* Equine allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells elicit antibody responses in vivo. *Stem Cell Res Ther* **6**, 54 (2015).
95. Berglund, A. K., Fortier, L. A., Antczak, D. F. & Schnabel, L. V. Immunoprivileged no more: measuring the immunogenicity of allogeneic adult mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* **8**, 288 (2017).
96. Consentius, C., Reinke, P. & Volk, H.-D. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: what has been seen in vitro and in vivo? *Regen Med* **10**, 305–315 (2015).
97. Carrade, D. D. *et al.* Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy* **13**, 419–430 (2011).
98. Pigott, J. H., Ishihara, A., Wellman, M. L., Russell, D. S. & Bertone, A. L. Investigation of the immune response to autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Vet Immunol Immunopathol* **156**, 99–106 (2013).
99. Ridge, S. M., Sullivan, F. J. & Glynn, S. A. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer* **16**, 31 (2017).
100. Dimarino, A. M., Caplan, A. I. & Bonfield, T. L. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol* **4**, 201 (2013).

101. Hill, B. S., Pelagalli, A., Passaro, N. & Zannetti, A. Tumor-educated mesenchymal stem cells promote pro-metastatic phenotype. *Oncotarget* **8**, 73296–73311 (2017).
102. Lee, H.-Y. & Hong, I.-S. Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential. *Cancer Sci* **108**, 1939–1946 (2017).
103. Qi, K., Li, N., Zhang, Z. & Melino, G. Tissue regeneration: The crosstalk between mesenchymal stem cells and immune response. *Cell Immunol* **326**, 86–93 (2018).
104. Ma, S. *et al.* Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* **21**, 216–225 (2014).
105. Shi, Y. *et al.* How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* **33**, 136–143 (2012).
106. Lee, J. W., Fang, X., Krasnodembskaya, A., Howard, J. P. & Matthay, M. A. Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors. *Stem Cells* **29**, 913–919 (2011).
107. Hass, R., Kasper, C., Böhm, S. & Jacobs, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* **9**, 12 (2011).
108. Ren, G. *et al.* Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* **184**, 2321–2328 (2010).
109. Li, N. & Hua, J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci* **74**, 2345–2360 (2017).
110. Poggi, A., Musso, A., Dapino, I. & Zocchi, M. R. Mechanisms of tumor escape from immune system: role of mesenchymal stromal cells. *Immunol Lett* **159**, 55–72 (2014).
111. Spaggiari, G. M. & Moretta, L. Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity. *Immunol Cell Biol* **91**, 27–31 (2013).
112. Papaccio, F. *et al.* Concise Review: Cancer Cells, Cancer Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development. *Stem Cells Transl Med* **6**, 2115–2125 (2017).
113. Turley, S. J., Cremasco, V. & Astarita, J. L. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* **15**, 669–682 (2015).
114. Krampera, M. *et al.* Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* **15**, 1054–1061 (2013).
115. Le Blanc, K. & Davies, L. C. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol Lett* **168**, 140–146 (2015).
116. Spaggiari, G. M. & Moretta, L. Interactions between mesenchymal stem cells and dendritic cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **130**, 199–208 (2013).
117. Stagg, J. & Galipeau, J. Mechanisms of immune modulation by mesenchymal stromal cells and clinical translation. *Curr Mol Med* **13**, 856–867 (2013).
118. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* **36**, 2566–2573 (2006).

119. Wang, Y., Chen, X., Cao, W. & Shi, Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* **15**, 1009–1016 (2014).
120. Le Blanc, K. & Mougiakakos, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol* **12**, 383–396 (2012).
121. Tu, Z., Li, Q., Bu, H. & Lin, F. Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H. *Stem Cells Dev* **19**, 1803–1809 (2010).
122. Raffaghello, L. *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* **26**, 151–162 (2008).
123. Hu, C.-H. D., Kosaka, Y., Marcus, P., Rashedi, I. & Keating, A. Differential Immunomodulatory Effects of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells on Natural Killer Cells. *Stem Cells Dev* **28**, 933–943 (2019).
124. Galland, S. *et al.* Tumor-Derived Mesenchymal Stem Cells Use Distinct Mechanisms to Block the Activity of Natural Killer Cell Subsets. *Cell Rep* **20**, 2891–2905 (2017).
125. Casado, J. G., Tarazona, R. & Sanchez-Margallo, F. M. NK and MSCs crosstalk: the sense of immunomodulation and their sensitivity. *Stem Cell Rev Rep* **9**, 184–189 (2013).
126. Krampera, M. *et al.* Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **24**, 386–398 (2006).
127. Rasmusson, I., Ringdén, O., Sundberg, B. & Le Blanc, K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* **76**, 1208–1213 (2003).
128. Beyth, S. *et al.* Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* **105**, 2214–2219 (2005).
129. Nauta, A. J., Kruisselbrink, A. B., Lurvink, E., Willemze, R. & Fibbe, W. E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **177**, 2080–2087 (2006).
130. Zhang, B. *et al.* Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. *Blood* **113**, 46–57 (2009).
131. Chen, H.-W. *et al.* Mesenchymal stem cells tune the development of monocyte-derived dendritic cells toward a myeloid-derived suppressive phenotype through growth-regulated oncogene chemokines. *J Immunol* **190**, 5065–5077 (2013).
132. Yen, B. L. *et al.* Multipotent human mesenchymal stromal cells mediate expansion of myeloid-derived suppressor cells via hepatocyte growth factor/c-met and STAT3. *Stem Cell Reports* **1**, 139–151 (2013).
133. François, M., Romieu-Mourez, R., Li, M. & Galipeau, J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther* **20**, 187–195 (2012).
134. Philipp, D., Suhr, L., Wahlers, T., Choi, Y.-H. & Paunel-Görgülü, A. Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells highly strengthens their potential to promote IL-6-dependent M2b polarization. *Stem Cell Res Ther* **9**, 286 (2018).

135. Paul, S. & Lal, G. Regulatory and effector functions of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells and their therapeutic potential in adoptive cellular therapy for cancer. *Int J Cancer* **139**, 976–985 (2016).
136. L, M. *et al.* A regulatory cross-talk between Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *European journal of immunology* **39**, (2009).
137. Chabannes, D. *et al.* A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* **110**, 3691–3694 (2007).
138. De Miguel, M. P. *et al.* Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med* **12**, 574–591 (2012).
139. Nasef, A. *et al.* Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr* **13**, 217–226 (2007).
140. Najar, M. *et al.* Immunological modulation following bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and Th17 lymphocyte co-cultures. *Inflamm Res* **68**, 203–213 (2019).
141. Zimmermann, J. A., Hettiaratchi, M. H. & McDevitt, T. C. Enhanced Immunosuppression of T Cells by Sustained Presentation of Bioactive Interferon- γ Within Three-Dimensional Mesenchymal Stem Cell Constructs. *Stem Cells Transl Med* **6**, 223–237 (2017).
142. Ren, C. *et al.* Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells expressing interferon-beta in a mouse prostate cancer lung metastasis model. *Gene Ther* **15**, 1446–1453 (2008).
143. Phinney, D. G. & Pittenger, M. F. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells* **35**, 851–858 (2017).
144. Zhang, B. *et al.* Exosomes from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: Identification, Purification, and Biological Characteristics. *Stem Cells Int* **2016**, 1929536 (2016).
145. Asari, S. *et al.* Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp Hematol* **37**, 604–615 (2009).
146. Corcione, A. *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* **107**, 367–372 (2006).
147. Bernardo, M. E. & Fibbe, W. E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* **13**, 392–402 (2013).
148. Dumitru, C. A., Hemedda, H., Jakob, M., Lang, S. & Brandau, S. Stimulation of mesenchymal stromal cells (MSCs) via TLR3 reveals a novel mechanism of autocrine priming. *FASEB J* **28**, 3856–3866 (2014).
149. Krampera, M. Mesenchymal stromal cell ‘licensing’: a multistep process. *Leukemia* **25**, 1408–1414 (2011).
150. Glenn, J. D. & Whartenby, K. A. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells* **6**, 526–539 (2014).
151. Ayala-Cuellar, A. P., Kang, J.-H., Jeung, E.-B. & Choi, K.-C. Roles of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration and Immunomodulation. *Biomol Ther (Seoul)* **27**, 25–33 (2019).
152. Lu, Y. *et al.* TLR4 plays a crucial role in MSC-induced inhibition of NK cell function. *Biochem Biophys Res Commun* **464**, 541–547 (2015).

153. Raicevic, G. *et al.* Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. *Hum Immunol* **71**, 235–244 (2010).
154. Waterman, R. S., Henkle, S. L. & Betancourt, A. M. Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. *PLoS One* **7**, e45590 (2012).
155. Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L. & Betancourt, A. M. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* **5**, e10088 (2010).
156. Li, W. *et al.* Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ* **19**, 1505–1513 (2012).
157. Giuliani, M. *et al.* TLR ligands stimulation protects MSC from NK killing. *Stem Cells* **32**, 290–300 (2014).
158. Jiang, M. *et al.* CD14 dictates differential activation of mesenchymal stromal cells through AKT, NF- κ B and P38 signals. *Biosci Rep* **39**, BSR20190807 (2019).
159. Adamo, A., Dal Collo, G., Bazzoni, R. & Krampera, M. Role of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles in tumour microenvironment. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1871**, 192–198 (2019).
160. Whiteside, T. L. Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment. *Semin Immunol* **35**, 69–79 (2018).
161. Lobb, R. J. *et al.* Exosomes derived from mesenchymal non-small cell lung cancer cells promote chemoresistance. *Int J Cancer* **141**, 614–620 (2017).
162. Gentile, P. & Garcovich, S. Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells (ASCs) and Adipocyte-Secreted Exosomal microRNA (A-SE-miR) Modulate Cancer Growth and proMote Wound Repair. *J Clin Med* **8**, 855 (2019).
163. Samuel, P., Fabbri, M. & Carter, D. R. F. Mechanisms of Drug Resistance in Cancer: The Role of Extracellular Vesicles. *Proteomics* **17**, (2017).
164. Zhu, W. *et al.* Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. *Cancer Lett* **315**, 28–37 (2012).
165. Mardpour, S. *et al.* Interaction between mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles and immune cells by distinct protein content. *J Cell Physiol* **234**, 8249–8258 (2019).
166. Robbins, P. D. & Morelli, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* **14**, 195–208 (2014).
167. Khare, D. *et al.* Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Affect mRNA Expression and Function of B-Lymphocytes. *Front Immunol* **9**, 3053 (2018).
168. Zhang, Q. *et al.* Exosomes originating from MSCs stimulated with TGF- β and IFN- γ promote Treg differentiation. *J Cell Physiol* **233**, 6832–6840 (2018).
169. Zhang, B. *et al.* Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. *Stem Cells Dev* **23**, 1233–1244 (2014).

170. Whiteside, T. L. Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *J Clin Invest* **126**, 1216–1223 (2016).
171. Whiteside, T. L. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. *Adv Clin Chem* **74**, 103–141 (2016).
172. Fisher, D. T., Appenheimer, M. M. & Evans, S. S. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin Immunol* **26**, 38–47 (2014).
173. Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a016295 (2014).
174. Fregni, G. *et al.* Reciprocal modulation of mesenchymal stem cells and tumor cells promotes lung cancer metastasis. *EBioMedicine* **29**, 128–145 (2018).
175. Avnet, S. *et al.* Pre-clinical Models for Studying the Interaction Between Mesenchymal Stromal Cells and Cancer Cells and the Induction of Stemness. *Front Oncol* **9**, 305 (2019).
176. Cortini, M., Massa, A., Avnet, S., Bonuccelli, G. & Baldini, N. Tumor-Activated Mesenchymal Stromal Cells Promote Osteosarcoma Stemness and Migratory Potential via IL-6 Secretion. *PLoS One* **11**, e0166500 (2016).
177. Melief, S. M., Geutskens, S. B., Fibbe, W. E. & Roelofs, H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica* **98**, 888–895 (2013).
178. Zhao, W., Phinney, D. G., Bonnet, D., Dominici, M. & Kramerper, M. Mesenchymal stem cell biodistribution, migration, and homing in vivo. *Stem Cells Int* **2014**, 292109 (2014).
179. Ullah, M., Liu, D. D. & Thakor, A. S. Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *iScience* **15**, 421–438 (2019).
180. François, S. *et al.* Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* **24**, 1020–1029 (2006).
181. Mazo, I. B., Quackenbush, E. J., Lowe, J. B. & von Andrian, U. H. Total body irradiation causes profound changes in endothelial traffic molecules for hematopoietic progenitor cell recruitment to bone marrow. *Blood* **99**, 4182–4191 (2002).
182. Eder, V. *et al.* Gamma irradiation induces acetylcholine-evoked, endothelium-independent relaxation and activates K-channels of isolated pulmonary artery of rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **60**, 1530–1537 (2004).
183. Freas, W., Hart, J. L., Golightly, D., McClure, H. & Muldoon, S. M. Contractile properties of isolated vascular smooth muscle after photoradiation. *Am J Physiol* **256**, H655–664 (1989).
184. Ip, J. E. *et al.* Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Mol Biol Cell* **18**, 2873–2882 (2007).
185. Rüster, B. *et al.* Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* **108**, 3938–3944 (2006).
186. Segers, V. F. M. *et al.* Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H1370–1377 (2006).

187. Alon, R. *et al.* The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* **128**, 1243–1253 (1995).
188. Salas, A., Shimaoka, M., Chen, S., Carman, C. V. & Springer, T. Transition from rolling to firm adhesion is regulated by the conformation of the I domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *J Biol Chem* **277**, 50255–50262 (2002).
189. Sigal, A. *et al.* The LFA-1 integrin supports rolling adhesions on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment. *J Immunol* **165**, 442–452 (2000).
190. Steingen, C. *et al.* Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol* **44**, 1072–1084 (2008).
191. Yeo, G. C. & Weiss, A. S. Soluble matrix protein is a potent modulator of mesenchymal stem cell performance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 2042–2051 (2019).
192. Li, Y. *et al.* Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **356**, 780–784 (2007).
193. Liu, H. *et al.* Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1 α in MSCs. *Biochem Biophys Res Commun* **401**, 509–515 (2010).
194. Deng, M. *et al.* TGF β 3 recruits endogenous mesenchymal stem cells to initiate bone regeneration. *Stem Cell Res Ther* **8**, 258 (2017).
195. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. & Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **25**, 2739–2749 (2007).
196. Popielarczyk, T. L., Huckle, W. R. & Barrett, J. G. Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Home via the PI3K-Akt, MAPK, and Jak/Stat Signaling Pathways in Response to Platelet-Derived Growth Factor. *Stem Cells Dev* **28**, 1191–1202 (2019).
197. Wang, J. *et al.* Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Functionalized by Hybrid Baculovirus-Adeno-Associated Viral Vectors for Targeting Hypopharyngeal Carcinoma. *Stem Cells Dev* **28**, 543–553 (2019).
198. Saberi, K. *et al.* Melatonin preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes their engraftment and improves renal regeneration in a rat model of chronic kidney disease. *J Mol Histol* **50**, 129–140 (2019).
199. Zheng, X.-B. *et al.* Bone marrow-derived CXCR4-overexpressing MSCs display increased homing to intestine and ameliorate colitis-associated tumorigenesis in mice. *Gastroenterol Rep (Oxf)* **7**, 127–138 (2019).
200. Wangler, S. *et al.* CD146/MCAM distinguishes stem cell subpopulations with distinct migration and regenerative potential in degenerative intervertebral discs. *Osteoarthritis Cartilage* **27**, 1094–1105 (2019).
201. Sackstein, R. *et al.* Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med* **14**, 181–187 (2008).
202. Ries, C. *et al.* MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* **109**, 4055–4063 (2007).

203. Kim, D. *et al.* In vivo tracking of human mesenchymal stem cells in experimental stroke. *Cell Transplant* **16**, 1007–1012 (2008).
204. Kidd, S. *et al.* Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* **27**, 2614–2623 (2009).
205. Galland, S. & Stamenkovic, I. Mesenchymal stromal cells in cancer: a review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *J Pathol* **250**, 555–572 (2020).
206. Puré, E. & Lo, A. Can Targeting Stroma Pave the Way to Enhanced Antitumor Immunity and Immunotherapy of Solid Tumors? *Cancer Immunol Res* **4**, 269–278 (2016).
207. Poggi, A., Varesano, S. & Zocchi, M. R. Corrigendum: How to Hit Mesenchymal Stromal Cells and Make the Tumor Microenvironment Immunostimulant Rather Than Immunosuppressive. *Front Immunol* **9**, 1342 (2018).
208. Sun, Z., Wang, S. & Zhao, R. C. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J Hematol Oncol* **7**, 14 (2014).
209. Jing, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells in inflammation microenvironment accelerates hepatocellular carcinoma metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* **7**, e43272 (2012).
210. Liu, Y. *et al.* Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *J Biol Chem* **286**, 25007–25015 (2011).
211. Cho, J. A. *et al.* Exosomes from ovarian cancer cells induce adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to acquire the physical and functional characteristics of tumor-supporting myofibroblasts. *Gynecol Oncol* **123**, 379–386 (2011).
212. Dostert, G., Mesure, B., Menu, P. & Velot, É. How Do Mesenchymal Stem Cells Influence or Are Influenced by Microenvironment through Extracellular Vesicles Communication? *Front Cell Dev Biol* **5**, 6 (2017).
213. Raz, Y. *et al.* Bone marrow-derived fibroblasts are a functionally distinct stromal cell population in breast cancer. *J Exp Med* **215**, 3075–3093 (2018).
214. Brune, J. C. *et al.* Mesenchymal stromal cells from primary osteosarcoma are non-malignant and strikingly similar to their bone marrow counterparts. *Int J Cancer* **129**, 319–330 (2011).
215. McLean, K. *et al.* Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest* **121**, 3206–3219 (2011).
216. Hernanda, P. Y. *et al.* Tumor promotion through the mesenchymal stem cell compartment in human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **34**, 2330–2340 (2013).
217. Gottschling, S. *et al.* Mesenchymal stem cells in non-small cell lung cancer--different from others? Insights from comparative molecular and functional analyses. *Lung Cancer* **80**, 19–29 (2013).
218. Johann, P.-D. *et al.* Tumour stromal cells derived from paediatric malignancies display MSC-like properties and impair NK cell cytotoxicity. *BMC Cancer* **10**, 501 (2010).
219. Xu, X. *et al.* Isolation and comparison of mesenchymal stem-like cells from human gastric cancer and adjacent non-cancerous tissues. *J Cancer Res Clin Oncol* **137**, 495–504 (2011).

220. Razmkhah, M. *et al.* Adipose derived stem cells (ASCs) isolated from breast cancer tissue express IL-4, IL-10 and TGF- β 1 and upregulate expression of regulatory molecules on T cells: do they protect breast cancer cells from the immune response? *Cell Immunol* **266**, 116–122 (2011).
221. Razmkhah, M., Mansourabadi, Z., Mohtasebi, M. S., Talei, A.-R. & Ghaderi, A. Cancer and normal adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs): Do they have differential effects on tumor and immune cells? *Cell Biol Int* **42**, 334–343 (2018).
222. Razmkhah, M., Abtahi, S. & Ghaderi, A. Mesenchymal Stem Cells, Immune Cells and Tumor Cells Crosstalk: A Sinister Triangle in the Tumor Microenvironment. *Curr Stem Cell Res Ther* **14**, 43–51 (2019).
223. Ren, G. *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med* **1**, 51–58 (2012).
224. Luo, J. *et al.* Infiltrating bone marrow mesenchymal stem cells increase prostate cancer stem cell population and metastatic ability via secreting cytokines to suppress androgen receptor signaling. *Oncogene* **33**, 2768–2778 (2014).
225. Kreso, A. & Dick, J. E. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* **14**, 275–291 (2014).
226. Medema, J. P. Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nat Cell Biol* **15**, 338–344 (2013).
227. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3983–3988 (2003).
228. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756–760 (2006).
229. Jeon, H.-M. *et al.* ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9*-mediated suppression of SOX2. *Cancer Res* **71**, 3410–3421 (2011).
230. Brooks, M. D., Burness, M. L. & Wicha, M. S. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell* **17**, 260–271 (2015).
231. Sun, Y. *et al.* Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat Med* **18**, 1359–1368 (2012).
232. Charafe-Jauffret, E. *et al.* Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* **69**, 1302–1313 (2009).
233. Jiao, X. *et al.* c-Jun induces mammary epithelial cellular invasion and breast cancer stem cell expansion. *J Biol Chem* **285**, 8218–8226 (2010).
234. Xin, Y. *et al.* POU5F1 enhances the invasiveness of cancer stem-like cells in lung adenocarcinoma by upregulation of MMP-2 expression. *PLoS One* **8**, e83373 (2013).
235. Chen, L. *et al.* The IL-8/CXCR1 axis is associated with cancer stem cell-like properties and correlates with clinical prognosis in human pancreatic cancer cases. *Sci Rep* **4**, 5911 (2014).
236. Friedl, P. & Alexander, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* **147**, 992–1009 (2011).
237. Plaks, V., Kong, N. & Werb, Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell* **16**, 225–238 (2015).
238. Eppert, K. *et al.* Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med* **17**, 1086–1093 (2011).

239. Piccirillo, S. G. M. *et al.* Genetic and functional diversity of propagating cells in glioblastoma. *Stem Cell Reports* **4**, 7–15 (2015).
240. Chen, K., Huang, Y. & Chen, J. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin* **34**, 732–740 (2013).
241. Sirko, S. *et al.* Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. [corrected]. *Cell Stem Cell* **12**, 426–439 (2013).
242. Yan, G.-N. *et al.* Endothelial cells promote stem-like phenotype of glioma cells through activating the Hedgehog pathway. *J Pathol* **234**, 11–22 (2014).
243. Mani, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–715 (2008).
244. Ouyang, G., Wang, Z., Fang, X., Liu, J. & Yang, C. J. Molecular signaling of the epithelial to mesenchymal transition in generating and maintaining cancer stem cells. *Cell Mol Life Sci* **67**, 2605–2618 (2010).
245. Karin, M. & Greten, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* **5**, 749–759 (2005).
246. Li, C.-W. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res* **72**, 1290–1300 (2012).
247. Li, Y. *et al.* c-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9951–9956 (2011).
248. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
249. Suvà, M. L. *et al.* Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell* **157**, 580–594 (2014).
250. Lee, T. K. W. *et al.* CD24(+) liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation. *Cell Stem Cell* **9**, 50–63 (2011).
251. Jeter, C. R. *et al.* NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene* **30**, 3833–3845 (2011).
252. Rudin, C. M. *et al.* Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nat Genet* **44**, 1111–1116 (2012).
253. Eun, K., Ham, S. W. & Kim, H. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Rep* **50**, 117–125 (2017).
254. Li, L. & Xie, T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 605–631 (2005).
255. Oh, M. & Nör, J. E. The Perivascular Niche and Self-Renewal of Stem Cells. *Front Physiol* **6**, 367 (2015).
256. Calabrese, C. *et al.* A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* **11**, 69–82 (2007).
257. Charles, N. *et al.* Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells. *Cell Stem Cell* **6**, 141–152 (2010).

258. Jeon, H.-M. *et al.* Crosstalk between glioma-initiating cells and endothelial cells drives tumor progression. *Cancer Res* **74**, 4482–4492 (2014).
259. Beck, B. *et al.* A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature* **478**, 399–403 (2011).
260. Zhang, Z., Dong, Z., Lauxen, I. S., Filho, M. S. & Nör, J. E. Endothelial cell-secreted EGF induces epithelial to mesenchymal transition and endows head and neck cancer cells with stem-like phenotype. *Cancer Res* **74**, 2869–2881 (2014).
261. Simon, M. C. & Keith, B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 285–296 (2008).
262. Löfstedt, T. *et al.* Induction of ID2 expression by hypoxia-inducible factor-1: a role in dedifferentiation of hypoxic neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **279**, 39223–39231 (2004).
263. Zhang, C. *et al.* Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E2047-2056 (2016).
264. Yang, M.-H. *et al.* Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol* **10**, 295–305 (2008).
265. Joseph, J. V. *et al.* Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1 α -ZEB1 axis. *Cancer Lett* **359**, 107–116 (2015).
266. Bao, B. *et al.* The biological kinship of hypoxia with CSC and EMT and their relationship with deregulated expression of miRNAs and tumor aggressiveness. *Biochim Biophys Acta* **1826**, 272–296 (2012).
267. Xing, F. *et al.* Hypoxia-induced Jagged2 promotes breast cancer metastasis and self-renewal of cancer stem-like cells. *Oncogene* **30**, 4075–4086 (2011).
268. Condeelis, J. & Pollard, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* **124**, 263–266 (2006).
269. Sullivan, N. J. *et al.* Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* **28**, 2940–2947 (2009).
270. Wu, Y. *et al.* Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell* **15**, 416–428 (2009).
271. Vermeulen, L. *et al.* Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* **12**, 468–476 (2010).
272. Hamada, S. *et al.* Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **421**, 349–354 (2012).
273. Lotti, F. *et al.* Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J Exp Med* **210**, 2851–2872 (2013).
274. Orkin, S. H. & Hochedlinger, K. Chromatin connections to pluripotency and cellular reprogramming. *Cell* **145**, 835–850 (2011).
275. Liang, G. & Zhang, Y. Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: an epigenetic perspective. *Cell Res* **23**, 49–69 (2013).

276. Widschwendter, M. *et al.* Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* **39**, 157–158 (2007).
277. Ohm, J. E. *et al.* A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet* **39**, 237–242 (2007).
278. Easwaran, H. *et al.* A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer. *Genome Res* **22**, 837–849 (2012).
279. Rizzo, S. *et al.* Ovarian cancer stem cell-like side populations are enriched following chemotherapy and overexpress EZH2. *Mol Cancer Ther* **10**, 325–335 (2011).
280. Iliopoulos, D. *et al.* Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells. *Mol Cell* **39**, 761–772 (2010).
281. Crea, F. *et al.* Pharmacologic disruption of Polycomb Repressive Complex 2 inhibits tumorigenicity and tumor progression in prostate cancer. *Mol Cancer* **10**, 40 (2011).
282. Benoit, Y. D. *et al.* Pharmacological inhibition of polycomb repressive complex-2 activity induces apoptosis in human colon cancer stem cells. *Exp Cell Res* **319**, 1463–1470 (2013).
283. Pathania, R. *et al.* DNMT1 is essential for mammary and cancer stem cell maintenance and tumorigenesis. *Nat Commun* **6**, 6910 (2015).
284. Yang, L., Rau, R. & Goodell, M. A. DNMT3A in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer* **15**, 152–165 (2015).
285. Roesch, A. *et al.* A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* **141**, 583–594 (2010).
286. Chaffer, C. L. *et al.* Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell* **154**, 61–74 (2013).
287. Timaner, M., Tsai, K. K. & Shaked, Y. The multifaceted role of mesenchymal stem cells in cancer. *Semin Cancer Biol* **60**, 225–237 (2020).
288. Chulpanova, D. S. *et al.* Application of Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Agent Delivery in Anti-tumor Treatment. *Front Pharmacol* **9**, 259 (2018).
289. Mohr, A. & Zwacka, R. The future of mesenchymal stem cell-based therapeutic approaches for cancer - From cells to ghosts. *Cancer Lett* **414**, 239–249 (2018).
290. Sage, E. K., Thakrar, R. M. & Janes, S. M. Genetically modified mesenchymal stromal cells in cancer therapy. *Cytotherapy* **18**, 1435–1445 (2016).
291. Pereboeva, L., Komarova, S., Mikheeva, G., Krasnykh, V. & Curiel, D. T. Approaches to utilize mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles. *Stem Cells* **21**, 389–404 (2003).
292. Power, A. T. & Bell, J. C. Cell-based delivery of oncolytic viruses: a new strategic alliance for a biological strike against cancer. *Mol Ther* **15**, 660–665 (2007).
293. Saspotas, L. S. *et al.* Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4822–4827 (2009).
294. Pessina, A. *et al.* Mesenchymal stromal cells primed with paclitaxel provide a new approach for cancer therapy. *PLoS One* **6**, e28321 (2011).

295. Petrella, F., Rimoldi, I., Rizzo, S. & Spaggiari, L. Mesenchymal Stromal Cells for Antineoplastic Drug Loading and Delivery. *Medicines (Basel)* **4**, 87 (2017).
296. Borghese, C. *et al.* Gefitinib inhibits the cross-talk between mesenchymal stem cells and prostate cancer cells leading to tumor cell proliferation and inhibition of docetaxel activity. *J Cell Biochem* **114**, 1135–1144 (2013).
297. Borriello, L. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Share Characteristics and Protumorigenic Activity with Mesenchymal Stromal Cells. *Cancer Res* **77**, 5142–5157 (2017).
298. Fierro, F. *et al.* Inhibition of platelet-derived growth factor receptorbeta by imatinib mesylate suppresses proliferation and alters differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Prolif* **40**, 355–366 (2007).
299. Davies, L. C., Heldring, N., Kadri, N. & Le Blanc, K. Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. *Stem Cells* **35**, 766–776 (2017).
300. Chinnadurai, R., Copland, I. B., Patel, S. R. & Galipeau, J. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- γ -licensed human mesenchymal stromal cells. *J Immunol* **192**, 1491–1501 (2014).
301. Liu, O. *et al.* Periodontal ligament stem cells regulate B lymphocyte function via programmed cell death protein 1. *Stem Cells* **31**, 1371–1382 (2013).
302. Dvorak, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* **315**, 1650–1659 (1986).
303. Xie, C. *et al.* Systemically Infused Mesenchymal Stem Cells Show Different Homing Profiles in Healthy and Tumor Mouse Models. *Stem Cells Transl Med* **6**, 1120–1131 (2017).
304. Ma, F. *et al.* Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Promote Breast Cancer Metastasis by Interleukin-8- and Interleukin-6-Dependent Induction of CD44(+)/CD24(-) Cells. *Cell Transplant* **24**, 2585–2599 (2015).
305. Smith, C. L. *et al.* Pre-exposure of human adipose mesenchymal stem cells to soluble factors enhances their homing to brain cancer. *Stem Cells Transl Med* **4**, 239–251 (2015).
306. Arvelo, F., Sojo, F. & Cotte, C. Tumour progression and metastasis. *Ecancermedicalscience* **10**, 617 (2016).
307. Son, B.-R. *et al.* Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells* **24**, 1254–1264 (2006).
308. Rustad, K. C. & Gurtner, G. C. Mesenchymal Stem Cells Home to Sites of Injury and Inflammation. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **1**, 147–152 (2012).
309. Nwabo Kamdje, A. H. *et al.* Mesenchymal stromal cells' role in tumor microenvironment: involvement of signaling pathways. *Cancer Biol Med* **14**, 129–141 (2017).
310. Huang, W.-H. *et al.* Mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of tumors in mice. *Oncogene* **32**, 4343–4354 (2013).
311. Ramdasi, S., Sarang, S. & Viswanathan, C. Potential of Mesenchymal Stem Cell based application in Cancer. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* **9**, 95–103 (2015).

312. Khakoo, A. Y. *et al.* Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* **203**, 1235–1247 (2006).
313. Qiao, L. *et al.* Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res* **18**, 500–507 (2008).
314. Cousin, B. *et al.* Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PLoS One* **4**, e6278 (2009).
315. Doi, C., Maurya, D. K., Pyle, M. M., Troyer, D. & Tamura, M. Cytotherapy with naive rat umbilical cord matrix stem cells significantly attenuates growth of murine pancreatic cancer cells and increases survival in syngeneic mice. *Cytotherapy* **12**, 408–417 (2010).
316. Chanda, D. *et al.* Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in prostate cancer bone metastasis. *Clin Cancer Res* **15**, 7175–7185 (2009).
317. Otsu, K. *et al.* Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood* **113**, 4197–4205 (2009).
318. Rivera-Cruz, C. M., Shearer, J. J., Figueiredo Neto, M. & Figueiredo, M. L. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell Polarization within the Tumor Microenvironment Niche. *Stem Cells Int* **2017**, 4015039 (2017).
319. Studeny, M. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* **62**, 3603–3608 (2002).
320. Ahn, J. ok *et al.* Anti-tumor effect of adipose tissue derived-mesenchymal stem cells expressing interferon- β and treatment with cisplatin in a xenograft mouse model for canine melanoma. *PLoS One* **8**, e74897 (2013).
321. Szegezdi, E. *et al.* Stem cells are resistant to TRAIL receptor-mediated apoptosis. *J Cell Mol Med* **13**, 4409–4414 (2009).
322. Yuan, Z., Kolluri, K. K., Sage, E. K., Gowers, K. H. C. & Janes, S. M. Mesenchymal stromal cell delivery of full-length tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand is superior to soluble type for cancer therapy. *Cytotherapy* **17**, 885–896 (2015).
323. Mohammadpour, H., Pourfathollah, A. A., Nikougofar Zarif, M. & Shahbazfar, A. A. Irradiation enhances susceptibility of tumor cells to the antitumor effects of TNF- α activated adipose derived mesenchymal stem cells in breast cancer model. *Sci Rep* **6**, 28433 (2016).
324. Zhang, B. *et al.* The inhibitory effect of MSCs expressing TRAIL as a cellular delivery vehicle in combination with cisplatin on hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* **13**, 1175–1184 (2012).
325. Srinivasula, S. M. *et al.* A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**, 112–116 (2001).
326. Khorashadizadeh, M. *et al.* Bypassing the need for pre-sensitization of cancer cells for anticancer TRAIL therapy with secretion of novel cell penetrable form of Smac from hA-MSCs as cellular delivery vehicle. *Tumour Biol* **36**, 4213–4221 (2015).
327. Chen, X. *et al.* A tumor-selective biotherapy with prolonged impact on established metastases based on cytokine gene-engineered MSCs. *Mol Ther* **16**, 749–756 (2008).

328. You, Q. *et al.* Effect of targeted ovarian cancer therapy using amniotic fluid mesenchymal stem cells transfected with enhanced green fluorescent protein-human interleukin-2 in vivo. *Mol Med Rep* **12**, 4859–4866 (2015).
329. Yang, Z.-S. *et al.* Cancer cell-oriented migration of mesenchymal stem cells engineered with an anticancer gene (PTEN): an imaging demonstration. *Onco Targets Ther* **7**, 441–446 (2014).
330. Guo, X. R. *et al.* PTEN-mRNA engineered mesenchymal stem cell-mediated cytotoxic effects on U251 glioma cells. *Oncol Lett* **11**, 2733–2740 (2016).
331. Martinez-Quintanilla, J. *et al.* Therapeutic efficacy and fate of bimodal engineered stem cells in malignant brain tumors. *Stem Cells* **31**, 1706–1714 (2013).
332. Du, W. *et al.* Stem cell-released oncolytic herpes simplex virus has therapeutic efficacy in brain metastatic melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E6157–E6165 (2017).
333. Pessina, A. *et al.* Role of SR-4987 stromal cells in the modulation of doxorubicin toxicity to in vitro granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM). *Life Sci* **65**, 513–523 (1999).
334. Pascucci, L. *et al.* Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery. *J Control Release* **192**, 262–270 (2014).
335. Coccè, V. *et al.* Drug Loaded Gingival Mesenchymal Stromal Cells (GinPa-MSCs) Inhibit In Vitro Proliferation of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Sci Rep* **7**, 9376 (2017).
336. Pessina, A. *et al.* Mesenchymal stromal cells primed with Paclitaxel attract and kill leukaemia cells, inhibit angiogenesis and improve survival of leukaemia-bearing mice. *Br J Haematol* **160**, 766–778 (2013).
337. Bonomi, A. *et al.* Paclitaxel-releasing mesenchymal stromal cells inhibit the growth of multiple myeloma cells in a dynamic 3D culture system. *Hematol Oncol* **35**, 693–702 (2017).
338. Brini, A. T. *et al.* Cell-mediated drug delivery by gingival interdental papilla mesenchymal stromal cells (GinPa-MSCs) loaded with paclitaxel. *Expert Opin Drug Deliv* **13**, 789–798 (2016).
339. Nicolay, N. H. *et al.* Mesenchymal stem cells maintain their defining stem cell characteristics after treatment with cisplatin. *Sci Rep* **6**, 20035 (2016).
340. Li, L. *et al.* Silica nanorattle-doxorubicin-anchored mesenchymal stem cells for tumor-tropic therapy. *ACS Nano* **5**, 7462–7470 (2011).
341. Bonomi, A. *et al.* Effect of canine mesenchymal stromal cells loaded with paclitaxel on growth of canine glioma and human glioblastoma cell lines. *Vet J* **223**, 41–47 (2017).
342. Pokharel, D. *et al.* Deciphering Cell-to-Cell Communication in Acquisition of Cancer Traits: Extracellular Membrane Vesicles Are Regulators of Tissue Biomechanics. *OMICS* **20**, 462–469 (2016).
343. EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O. & Wood, M. J. A. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 347–357 (2013).
344. de Abreu, R. C. *et al.* Native and bioengineered extracellular vesicles for cardiovascular therapeutics. *Nat Rev Cardiol* **17**, 685–697 (2020).

345. Lin, R., Wang, S. & Zhao, R. C. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. *Mol Cell Biochem* **383**, 13–20 (2013).
346. Shi, S. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitate nasopharyngeal carcinoma progression. *Am J Cancer Res* **6**, 459–472 (2016).
347. Gu, H. *et al.* Exosomes derived from human mesenchymal stem cells promote gastric cancer cell growth and migration via the activation of the Akt pathway. *Mol Med Rep* **14**, 3452–3458 (2016).
348. Bliss, S. A. *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Stimulate Cycling Quiescence and Early Breast Cancer Dormancy in Bone Marrow. *Cancer Res* **76**, 5832–5844 (2016).
349. Del Fattore, A. *et al.* Differential effects of extracellular vesicles secreted by mesenchymal stem cells from different sources on glioblastoma cells. *Expert Opin Biol Ther* **15**, 495–504 (2015).
350. Cocce, V. *et al.* Fluorescent Immortalized Human Adipose Derived Stromal Cells (hASCs-TS/GFP+) for Studying Cell Drug Delivery Mediated by Microvesicles. *Anticancer Agents Med Chem* **17**, 1578–1585 (2017).
351. Yuan, Z., Kolluri, K. K., Gowers, K. H. C. & Janes, S. M. TRAIL delivery by MSC-derived extracellular vesicles is an effective anticancer therapy. *J Extracell Vesicles* **6**, 1265291 (2017).
352. Walker, S. *et al.* Extracellular vesicle-based drug delivery systems for cancer treatment. *Theranostics* **9**, 8001–8017 (2019).
353. Studeny, M. *et al.* Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* **96**, 1593–1603 (2004).
354. Kucerova, L., Altanerova, V., Matuskova, M., Tyciakova, S. & Altaner, C. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res* **67**, 6304–6313 (2007).
355. Xin, H. *et al.* Targeted delivery of CX3CL1 to multiple lung tumors by mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **25**, 1618–1626 (2007).
356. Kidd, S. *et al.* Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* **27**, 2614–2623 (2009).
357. Kosaka, N., Yoshioka, Y., Fujita, Y. & Ochiya, T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest* **126**, 1163–1172 (2016).
358. Baek, G., Choi, H., Kim, Y., Lee, H.-C. & Choi, C. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Therapeutics and as a Drug Delivery Platform. *Stem Cells Transl Med* **8**, 880–886 (2019).
359. Massa, M. *et al.* Clinical Applications of Mesenchymal Stem/Stromal Cell Derived Extracellular Vesicles: Therapeutic Potential of an Acellular Product. *Diagnostics (Basel)* **10**, 999 (2020).
360. Weng, Z. *et al.* Therapeutic roles of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in cancer. *J Hematol Oncol* **14**, 136 (2021).
361. Kalluri, R. & LeBleu, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* **367**, eaau6977 (2020).
362. Wang, J., Chen, D. & Ho, E. A. Challenges in the development and establishment of exosome-based drug delivery systems. *J Control Release* **329**, 894–906 (2021).

363. Gardiner, C. *et al.* Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles* **5**, 32945 (2016).
364. Théry, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* **7**, 1535750 (2018).
365. Varderdou-Minasian, S. & Lorenowicz, M. J. Mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles in tissue repair: challenges and opportunities. *Theranostics* **10**, 5979–5997 (2020).
366. Lee, J.-K. *et al.* Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. *PLoS One* **8**, e84256 (2013).
367. Pakravan, K. *et al.* MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling axis in breast cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)* **40**, 457–470 (2017).
368. Bruno, S. *et al.* Microvesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells inhibit tumor growth. *Stem Cells Dev* **22**, 758–771 (2013).
369. Wu, S., Ju, G.-Q., Du, T., Zhu, Y.-J. & Liu, G.-H. Microvesicles derived from human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells attenuate bladder tumor cell growth in vitro and in vivo. *PLoS One* **8**, e61366 (2013).
370. Reza, A. M. M. T., Choi, Y.-J., Yasuda, H. & Kim, J.-H. Human adipose mesenchymal stem cell-derived exosomal-miRNAs are critical factors for inducing anti-proliferation signalling to A2780 and SKOV-3 ovarian cancer cells. *Sci Rep* **6**, 38498 (2016).
371. Takahara, K. *et al.* microRNA-145 Mediates the Inhibitory Effect of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells on Prostate Cancer. *Stem Cells Dev* **25**, 1290–1298 (2016).
372. Liu, J. *et al.* Extracellular vesicles-encapsulated let-7i shed from bone mesenchymal stem cells suppress lung cancer via KDM3A/DCLK1/FXYD3 axis. *J Cell Mol Med* **25**, 1911–1926 (2021).
373. Herrmann, I. K., Wood, M. J. A. & Fuhrmann, G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat Nanotechnol* **16**, 748–759 (2021).
374. Liang, Y., Duan, L., Lu, J. & Xia, J. Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics* **11**, 3183–3195 (2021).
375. Haney, M. J. *et al.* TPP1 Delivery to Lysosomes with Extracellular Vesicles and their Enhanced Brain Distribution in the Animal Model of Batten Disease. *Adv Healthc Mater* **8**, e1801271 (2019).
376. Fuhrmann, G., Serio, A., Mazo, M., Nair, R. & Stevens, M. M. Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *J Control Release* **205**, 35–44 (2015).
377. Cho, N.-J., Hwang, L. Y., Solandt, J. J. R. & Frank, C. W. Comparison of Extruded and Sonicated Vesicles for Planar Bilayer Self-Assembly. *Materials (Basel)* **6**, 3294–3308 (2013).
378. Haney, M. J. *et al.* Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J Control Release* **207**, 18–30 (2015).
379. Johnsen, K. B. *et al.* Evaluation of electroporation-induced adverse effects on adipose-derived stem cell exosomes. *Cytotechnology* **68**, 2125–2138 (2016).

380. Kim, M. S. *et al.* Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine* **12**, 655–664 (2016).
381. Lamichhane, T. N. *et al.* Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. *Cell Mol Bioeng* **9**, 315–324 (2016).
382. Sato, Y. T. *et al.* Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. *Sci Rep* **6**, 21933 (2016).
383. Alvarez-Erviti, L. *et al.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* **29**, 341–345 (2011).
384. Jia, G. *et al.* NRP-1 targeted and cargo-loaded exosomes facilitate simultaneous imaging and therapy of glioma in vitro and in vivo. *Biomaterials* **178**, 302–316 (2018).
385. Wang, J. *et al.* The use of RGD-engineered exosomes for enhanced targeting ability and synergistic therapy toward angiogenesis. *Nanoscale* **9**, 15598–15605 (2017).
386. Goh, W. J. *et al.* EXOPLEXs: Chimeric Drug Delivery Platform from the Fusion of Cell-Derived Nanovesicles and Liposomes. *Biomacromolecules* **19**, 22–30 (2018).
387. Piffoux, M., Silva, A. K. A., Wilhelm, C., Gazeau, F. & Taresté, D. Modification of Extracellular Vesicles by Fusion with Liposomes for the Design of Personalized Biogenic Drug Delivery Systems. *ACS Nano* **12**, 6830–6842 (2018).
388. Hoppstädter, J. *et al.* Toll-Like Receptor 2 Release by Macrophages: An Anti-inflammatory Program Induced by Glucocorticoids and Lipopolysaccharide. *Front Immunol* **10**, 1634 (2019).
389. O'Brien, K. P. *et al.* Employing mesenchymal stem cells to support tumor-targeted delivery of extracellular vesicle (EV)-encapsulated microRNA-379. *Oncogene* **37**, 2137–2149 (2018).
390. Katakowski, M. *et al.* Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Lett* **335**, 201–204 (2013).
391. Lang, F. M. *et al.* Mesenchymal stem cells as natural biofactories for exosomes carrying miR-124a in the treatment of gliomas. *Neuro Oncol* **20**, 380–390 (2018).
392. Wang, B. *et al.* Retraction Note: Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted exosomes overexpressing microRNA-34a ameliorate glioblastoma development via down-regulating MYCN. *Cell Oncol (Dordr)* **44**, 1207 (2021).
393. Xu, Y. *et al.* microRNA-16-5p-containing exosomes derived from bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation, migration, and invasion, while promoting apoptosis of colorectal cancer cells by downregulating ITGA2. *J Cell Physiol* **234**, 21380–21394 (2019).
394. Jiang, S. *et al.* Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived microRNA-205-containing exosomes impede the progression of prostate cancer through suppression of RHPN2. *J Exp Clin Cancer Res* **38**, 495 (2019).
395. Yuan, L., Liu, Y., Qu, Y., Liu, L. & Li, H. Exosomes Derived From MicroRNA-148b-3p-Overexpressing Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Restrain Breast Cancer Progression. *Front Oncol* **9**, 1076 (2019).
396. Li, X., Liu, L. L., Yao, J. L., Wang, K. & Ai, H. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Inhibit Endometrial Cancer Cell Proliferation and Migration through Delivery of Exogenous miR-302a. *Stem Cells Int* **2019**, 8108576 (2019).

397. Zhang, H. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-206 inhibits osteosarcoma progression by targeting TRA2B. *Cancer Lett* **490**, 54–65 (2020).
398. Meng, Q., Zhang, B., Zhang, Y., Wang, S. & Zhu, X. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles impede the progression of cervical cancer via the miR-144-3p/CEP55 pathway. *J Cell Mol Med* **25**, 1867–1883 (2021).
399. Shimbo, K. *et al.* Exosome-formed synthetic microRNA-143 is transferred to osteosarcoma cells and inhibits their migration. *Biochem Biophys Res Commun* **445**, 381–387 (2014).
400. Ma, M. *et al.* miRNA-221 of exosomes originating from bone marrow mesenchymal stem cells promotes oncogenic activity in gastric cancer. *Onco Targets Ther* **10**, 4161–4171 (2017).
401. Zhang, K. *et al.* Extracellular vesicle-mediated delivery of miR-101 inhibits lung metastasis in osteosarcoma. *Theranostics* **10**, 411–425 (2020).
402. Naseri, Z., Oskuee, R. K., Jaafari, M. R. & Forouzandeh Moghadam, M. Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-142-3p inhibitor reduces tumorigenicity of breast cancer in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine* **13**, 7727–7747 (2018).
403. Mendt, M. *et al.* Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. *JCI Insight* **3**, e99263, 99263 (2018).
404. Altanerova, U. *et al.* Prodrug suicide gene therapy for cancer targeted intracellularly by mesenchymal stem cell exosomes. *Int J Cancer* **144**, 897–908 (2019).
405. Melzer, C. *et al.* Taxol-Loaded MSC-Derived Exosomes Provide a Therapeutic Vehicle to Target Metastatic Breast Cancer and Other Carcinoma Cells. *Cancers (Basel)* **11**, 798 (2019).
406. Coccè, V. *et al.* In Vitro Anticancer Activity of Extracellular Vesicles (EVs) Secreted by Gingival Mesenchymal Stromal Cells Primed with Paclitaxel. *Pharmaceutics* **11**, 61 (2019).
407. Bagheri, E. *et al.* Targeted doxorubicin-loaded mesenchymal stem cells-derived exosomes as a versatile platform for fighting against colorectal cancer. *Life Sci* **261**, 118369 (2020).
408. Rossignoli, F. *et al.* Inducible Caspase9-mediated suicide gene for MSC-based cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* **26**, 11–16 (2019).
409. Horwitz, E. M. & Dominici, M. How do mesenchymal stromal cells exert their therapeutic benefit? *Cytotherapy* **10**, 771–774 (2008).
410. D'souza, N. *et al.* Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies. *BMC Med* **13**, 186 (2015).
411. Munir, H. & McGettrick, H. M. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease: Risks and Rewards. *Stem Cells Dev* **24**, 2091–2100 (2015).
412. Grisendi, G. *et al.* Understanding tumor-stroma interplays for targeted therapies by armed mesenchymal stromal progenitors: the Mesenkillers. *Am J Cancer Res* **1**, 787–805 (2011).
413. Straathof, K. C. *et al.* An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* **105**, 4247–4254 (2005).
414. Ramos, C. A. *et al.* An inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of mesenchymal stromal cell therapies. *Stem Cells* **28**, 1107–1115 (2010).

415. Bourguine, P. *et al.* Combination of immortalization and inducible death strategies to generate a human mesenchymal stromal cell line with controlled survival. *Stem Cell Res* **12**, 584–598 (2014).
416. Di Stasi, A. *et al.* Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med* **365**, 1673–1683 (2011).
417. Fukuhara, H., Ino, Y. & Todo, T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci* **107**, 1373–1379 (2016).
418. Raja, J., Ludwig, J. M., Gettinger, S. N., Schalper, K. A. & Kim, H. S. Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *J Immunother Cancer* **6**, 140 (2018).
419. Hemminki, A. *et al.* A canine conditionally replicating adenovirus for evaluating oncolytic virotherapy in a syngeneic animal model. *Mol Ther* **7**, 163–173 (2003).
420. Agarwal, P. *et al.* Evaluation of tumor immunity after administration of conditionally replicative adenoviral vector in canine osteosarcoma patients. *Heliyon* **7**, e06210 (2021).
421. Sánchez, D., Cesarman-Maus, G., Amador-Molina, A. & Lizano, M. Oncolytic Viruses for Canine Cancer Treatment. *Cancers (Basel)* **10**, 404 (2018).
422. Cejalvo, T. *et al.* Remission of Spontaneous Canine Tumors after Systemic Cellular Viroimmunotherapy. *Cancer Res* **78**, 4891–4901 (2018).
423. Ternovoi, V. V. *et al.* Productive replication of human adenovirus type 5 in canine cells. *J Virol* **79**, 1308–1311 (2005).
424. Matsugo, H. *et al.* A potential bat adenovirus-based oncolytic virus targeting canine cancers. *Sci Rep* **11**, 16706 (2021).
425. Moreno, R. *et al.* Enhanced Antitumor Efficacy of Oncolytic Adenovirus-loaded Menstrual Blood-derived Mesenchymal Stem Cells in Combination with Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Mol Cancer Ther* **18**, 127–138 (2019).
426. Cejalvo, T. *et al.* Remission of Spontaneous Canine Tumors after Systemic Cellular Viroimmunotherapy. *Cancer Res* **78**, 4891–4901 (2018).
427. Iizuka, K. *et al.* Antitumor activity of an oncolytic measles virus against canine urinary bladder transitional cell carcinoma cells. *Res Vet Sci* **133**, 313–317 (2020).
428. Li, P. *et al.* Oncolytic activity of canine distemper virus in canine mammary tubular adenocarcinoma cells. *Vet Comp Oncol* **17**, 174–183 (2019).
429. Chambers, M. R. *et al.* Evaluation of immunologic parameters in canine glioma patients treated with an oncolytic herpes virus. *J Transl Genet Genom* **5**, 423–442 (2021).
430. Santos, M. R. *et al.* Oncolytic effect of Newcastle disease virus is attributed to interferon regulation in canine mammary cancer cell lines. *Vet Comp Oncol* **19**, 593–601 (2021).
431. Igase, M. *et al.* Anti-tumour activity of oncolytic reovirus against canine histiocytic sarcoma cells. *Vet Comp Oncol* **17**, 184–193 (2019).
432. Béguin, J. *et al.* Preclinical Evaluation of the Oncolytic Vaccinia Virus TG6002 by Translational Research on Canine Breast Cancer. *Mol Ther Oncolytics* **19**, 57–66 (2020).

433. Petrov, I. *et al.* Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (cAdMSCs) as a 'Trojan Horse' in Vaccinia Virus Mediated Oncolytic Therapy against Canine Soft Tissue Sarcomas. *Viruses* **12**, 750 (2020).
434. Cheng, P.-H., Wechman, S. L., McMasters, K. M. & Zhou, H. S. Oncolytic Replication of E1b-Deleted Adenoviruses. *Viruses* **7**, 5767–5779 (2015).
435. Zhao, Y. *et al.* Oncolytic Adenovirus: Prospects for Cancer Immunotherapy. *Front Microbiol* **12**, 707290 (2021).
436. Reale, A., Calistri, A. & Altomonte, J. Giving Oncolytic Viruses a Free Ride: Carrier Cells for Oncolytic Virotherapy. *Pharmaceutics* **13**, 2192 (2021).
437. Goradel, N. H. *et al.* Oncolytic adenovirus: A tool for cancer therapy in combination with other therapeutic approaches. *J Cell Physiol* **234**, 8636–8646 (2019).
438. Lawler, S. E., Speranza, M.-C., Cho, C.-F. & Chiocca, E. A. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review. *JAMA Oncol* **3**, 841–849 (2017).
439. Fukuhara, H., Ino, Y. & Todo, T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci* **107**, 1373–1379 (2016).
440. MacNeill, A. L., Weishaar, K. M., Séguin, B. & Powers, B. E. Safety of an Oncolytic Myxoma Virus in Dogs with Soft Tissue Sarcoma. *Viruses* **10**, 398 (2018).
441. García, M. *et al.* A Phase 1 Trial of Oncolytic Adenovirus ICOVIR-5 Administered Intravenously to Cutaneous and Uveal Melanoma Patients. *Hum Gene Ther* **30**, 352–364 (2019).
442. Mantwill, K. *et al.* Concepts in Oncolytic Adenovirus Therapy. *Int J Mol Sci* **22**, 10522 (2021).
443. Zheng, M., Huang, J., Tong, A. & Yang, H. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Barriers and Recent Advances. *Mol Ther Oncolytics* **15**, 234–247 (2019).
444. Kazimirsky, G., Jiang, W., Slavin, S., Ziv-Av, A. & Brodie, C. Mesenchymal stem cells enhance the oncolytic effect of Newcastle disease virus in glioma cells and glioma stem cells via the secretion of TRAIL. *Stem Cell Res Ther* **7**, 149 (2016).
445. Ramírez, M., García-Castro, J., Melen, G. J., González-Murillo, Á. & Franco-Luzón, L. Patient-derived mesenchymal stem cells as delivery vehicles for oncolytic virotherapy: novel state-of-the-art technology. *Oncolytic Virother* **4**, 149–155 (2015).
446. Rincón, E. *et al.* Mesenchymal stem cell carriers enhance antitumor efficacy of oncolytic adenoviruses in an immunocompetent mouse model. *Oncotarget* **8**, 45415–45431 (2017).
447. Wang, X., Zhao, X. & He, Z. Mesenchymal stem cell carriers enhance anti-tumor efficacy of oncolytic virotherapy. *Oncol Lett* **21**, 238 (2021).
448. Ruano, D. *et al.* First-in-Human, First-in-Child Trial of Autologous MSCs Carrying the Oncolytic Virus Icovir-5 in Patients with Advanced Tumors. *Mol Ther* **28**, 1033–1042 (2020).
449. Baronzio, G., Parmar, G., Baronzio, M. & Kiselevsky, M. Tumor interstitial fluid: proteomic determination as a possible source of biomarkers. *Cancer Genomics Proteomics* **11**, 225–237 (2014).
450. Harisi, R. & Jeney, A. Extracellular matrix as target for antitumor therapy. *Onco Targets Ther* **8**, 1387–1398 (2015).

451. Willmon, C. *et al.* Cell carriers for oncolytic viruses: Fed Ex for cancer therapy. *Mol Ther* **17**, 1667–1676 (2009).
452. Nakashima, H., Kaur, B. & Chiocca, E. A. Directing systemic oncolytic viral delivery to tumors via carrier cells. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**, 119–126 (2010).
453. Josiah, D. T. *et al.* Adipose-derived stem cells as therapeutic delivery vehicles of an oncolytic virus for glioblastoma. *Mol Ther* **18**, 377–385 (2010).
454. Leoni, V. *et al.* Systemic delivery of HER2-retargeted oncolytic-HSV by mesenchymal stromal cells protects from lung and brain metastases. *Oncotarget* **6**, 34774–34787 (2015).
455. Ong, H.-T. *et al.* Systemically delivered measles virus-infected mesenchymal stem cells can evade host immunity to inhibit liver cancer growth. *J Hepatol* **59**, 999–1006 (2013).
456. Castleton, A. *et al.* Human mesenchymal stromal cells deliver systemic oncolytic measles virus to treat acute lymphoblastic leukemia in the presence of humoral immunity. *Blood* **123**, 1327–1335 (2014).
457. Mader, E. K. *et al.* Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles viruses from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model. *Clin Cancer Res* **15**, 7246–7255 (2009).
458. Hakkarainen, T. *et al.* Human mesenchymal stem cells lack tumor tropism but enhance the antitumor activity of oncolytic adenoviruses in orthotopic lung and breast tumors. *Hum Gene Ther* **18**, 627–641 (2007).
459. Stoff-Khalili, M. A. *et al.* Mesenchymal stem cells as a vehicle for targeted delivery of CRAds to lung metastases of breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* **105**, 157–167 (2007).
460. Yong, R. L. *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer Res* **69**, 8932–8940 (2009).
461. Bolontrade, M. F. *et al.* A specific subpopulation of mesenchymal stromal cell carriers overrides melanoma resistance to an oncolytic adenovirus. *Stem Cells Dev* **21**, 2689–2702 (2012).
462. Huang, Y.-F., Chen, M.-J., Wu, M.-H. & Hung, S.-C. The use of hypoxic cultured mesenchymal stem cell for oncolytic virus therapy. *Cancer Gene Ther* **20**, 308–316 (2013).
463. Li, Z. *et al.* E1A-engineered human umbilical cord mesenchymal stem cells as carriers and amplifiers for adenovirus suppress hepatocarcinoma in mice. *Oncotarget* **7**, 51815–51828 (2016).
464. Yuan, X. *et al.* Mesenchymal stem cells deliver and release conditionally replicative adenovirus depending on hepatic differentiation to eliminate hepatocellular carcinoma cells specifically. *Cancer Lett* **381**, 85–95 (2016).
465. Yoon, A.-R. *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Mediated Delivery of an Oncolytic Adenovirus Enhances Antitumor Efficacy in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* **79**, 4503–4514 (2019).
466. Mahasa, K. J. *et al.* Mesenchymal stem cells used as carrier cells of oncolytic adenovirus results in enhanced oncolytic virotherapy. *Sci Rep* **10**, 425 (2020).
467. Na, Y. *et al.* Systemic administration of human mesenchymal stromal cells infected with polymer-coated oncolytic adenovirus induces efficient pancreatic tumor homing and infiltration. *J Control Release* **305**, 75–88 (2019).

468. Kaczorowski, A. *et al.* Delivery of improved oncolytic adenoviruses by mesenchymal stromal cells for elimination of tumorigenic pancreatic cancer cells. *Oncotarget* **7**, 9046–9059 (2016).
469. Guo, Y. *et al.* Menstrual Blood-Derived Stem Cells as Delivery Vehicles for Oncolytic Adenovirus Virotherapy for Colorectal Cancer. *Stem Cells Dev* **28**, 882–896 (2019).
470. Hoyos, V. *et al.* Mesenchymal Stromal Cells for Linked Delivery of Oncolytic and Apoptotic Adenoviruses to Non-small-cell Lung Cancers. *Mol Ther* **23**, 1497–1506 (2015).
471. Moreno, R. *et al.* Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells as Potential Cell Carriers for Oncolytic Adenovirus. *Stem Cells Int* **2017**, 3615729 (2017).
472. Martínez-Quintanilla, J., He, D., Wakimoto, H., Alemany, R. & Shah, K. Encapsulated stem cells loaded with hyaluronidase-expressing oncolytic virus for brain tumor therapy. *Mol Ther* **23**, 108–118 (2015).
473. Delgado-Bonet, P., Tomeo-Martín, B. D., Ortiz-Díez, G. & Perisé-Barríos, A. J. Tumor-Homing of Mesenchymal Stem Cells Infected with Oncolytic Virus in a Canine Patient. *Vet Sci* **9**, 285 (2022).
474. Cejalvo, T. *et al.* Remission of Spontaneous Canine Tumors after Systemic Cellular Viroimmunotherapy. *Cancer Res* **78**, 4891–4901 (2018).
475. Cloquell, A. *et al.* Systemic cellular viroimmunotherapy for canine high-grade gliomas. *J Immunother Cancer* **10**, e005669 (2022).
476. Gómez, A. *et al.* Biodistribution Analysis of Oncolytic Adenoviruses in Canine Patient Necropsy Samples Treated with Cellular Virotherapy. *Mol Ther Oncolytics* **18**, 525–534 (2020).
477. Martín-Carrasco, C. *et al.* Safety and Efficacy of an Oncolytic Adenovirus as an Immunotherapy for Canine Cancer Patients. *Vet Sci* **9**, 327 (2022).
478. Kaid, C. *et al.* Safety, Tumor Reduction, and Clinical Impact of Zika Virus Injection in Dogs with Advanced-Stage Brain Tumors. *Mol Ther* **28**, 1276–1286 (2020).
479. Lønning, P. E. & Knappskog, S. Mapping genetic alterations causing chemoresistance in cancer: identifying the roads by tracking the drivers. *Oncogene* **32**, 5315–5330 (2013).
480. Shi, Y., Du, L., Lin, L. & Wang, Y. Tumour-associated mesenchymal stem/stromal cells: emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 35–52 (2017).
481. Rafii, A. *et al.* Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS One* **3**, e3894 (2008).
482. Wang, Y. *et al.* Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Lett* **295**, 110–123 (2010).
483. Wang, Y. *et al.* Autocrine production of interleukin-8 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cytokine* **56**, 365–375 (2011).
484. Hofer, H. R. & Tuan, R. S. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Res Ther* **7**, 131 (2016).
485. Hillyer, P., Mordelet, E., Flynn, G. & Male, D. Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. *Clin Exp Immunol* **134**, 431–441 (2003).

486. Ha, H., Debnath, B. & Neamati, N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics* **7**, 1543–1588 (2017).
487. De Palma, M. & Lewis, C. E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* **23**, 277–286 (2013).
488. Zheng, Y. *et al.* Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood* **114**, 3625–3628 (2009).
489. Gutiérrez-González, A. *et al.* Evaluation of the potential therapeutic benefits of macrophage reprogramming in multiple myeloma. *Blood* **128**, 2241–2252 (2016).
490. Shree, T. *et al.* Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev* **25**, 2465–2479 (2011).
491. Beyar-Katz, O. *et al.* Bortezomib-induced pro-inflammatory macrophages as a potential factor limiting anti-tumour efficacy. *J Pathol* **239**, 262–273 (2016).
492. Le Naour, A. *et al.* Tumor cells educate mesenchymal stromal cells to release chemoprotective and immunomodulatory factors. *J Mol Cell Biol* **12**, 202–215 (2020).
493. Ijichi, H. *et al.* Inhibiting Cxcr2 disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Invest* **121**, 4106–4117 (2011).
494. Tomao, F., D’Incalci, M., Biagioli, E., Peccatori, F. A. & Colombo, N. Restoring platinum sensitivity in recurrent ovarian cancer by extending the platinum-free interval: Myth or reality? *Cancer* **123**, 3450–3459 (2017).
495. Hayashi, S. *et al.* Synthetic hexa- and heptapeptides that inhibit IL-8 from binding to and activating human blood neutrophils. *J Immunol* **154**, 814–824 (1995).
496. Castells, M. *et al.* Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Lett* **326**, 59–68 (2012).
497. Duluc, D. *et al.* Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* **110**, 4319–4330 (2007).
498. Gerszten, R. E. *et al.* MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* **398**, 718–723 (1999).
499. Vasandan, A. B. *et al.* Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE2-dependent mechanism. *Sci Rep* **6**, 38308 (2016).
500. Tan, H.-Y. *et al.* The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, 2795090 (2016).
501. Zhao, W. *et al.* Long non-coding RNA PVT1 encapsulated in bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes promotes osteosarcoma growth and metastasis by stabilizing ERG and sponging miR-183-5p. *Aging (Albany NY)* **11**, 9581–9596 (2019).
502. Du, T. *et al.* Microvesicles derived from human Wharton’s jelly mesenchymal stem cells promote human renal cancer cell growth and aggressiveness through induction of hepatocyte growth factor. *PLoS One* **9**, e96836 (2014).
503. Dong, L. *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote lung adenocarcinoma growth by transferring miR-410. *Cell Death Dis* **9**, 218 (2018).

504. Guo, Q. *et al.* microRNA-130b-3p Contained in MSC-Derived EVs Promotes Lung Cancer Progression by Regulating the FOXO3/NFE2L2/TXNRD1 Axis. *Mol Ther Oncolytics* **20**, 132–146 (2021).
505. Zhou, X. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote the in vitro proliferation and migration of breast cancer cells through the activation of the ERK pathway. *Int J Oncol* **54**, 1843–1852 (2019).
506. Ren, W. *et al.* Extracellular vesicles secreted by hypoxia pre-challenged mesenchymal stem cells promote non-small cell lung cancer cell growth and mobility as well as macrophage M2 polarization via miR-21-5p delivery. *J Exp Clin Cancer Res* **38**, 62 (2019).
507. Roccaro, A. M. *et al.* BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest* **123**, 1542–1555 (2013).
508. Mao, J. *et al.* UBR2 Enriched in p53 Deficient Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Exosome Promoted Gastric Cancer Progression via Wnt/ β -Catenin Pathway. *Stem Cells* **35**, 2267–2279 (2017).
509. Yang, J. *et al.* Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 341–352 (2020).
510. Zhou, X. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote the in vitro proliferation and migration of breast cancer cells through the activation of the ERK pathway. *Int J Oncol* **54**, 1843–1852 (2019).
511. Fornetti, J., Welm, A. L. & Stewart, S. A. Understanding the Bone in Cancer Metastasis. *J Bone Miner Res* **33**, 2099–2113 (2018).
512. Haider, M.-T., Smit, D. J. & Taipaleenmäki, H. The Endosteal Niche in Breast Cancer Bone Metastasis. *Front Oncol* **10**, 335 (2020).
513. Ono, M. *et al.* Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal* **7**, ra63 (2014).
514. Casson, J., Davies, O. G., Smith, C.-A., Dalby, M. J. & Berry, C. C. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles may promote breast cancer cell dormancy. *J Tissue Eng* **9**, 2041731418810093 (2018).
515. Yang, Y. *et al.* Acquisition of new tumor cell properties by MSC-derived exosomes. *Int J Oncol* **47**, 244–252 (2015).
516. Ji, R. *et al.* Exosomes derived from human mesenchymal stem cells confer drug resistance in gastric cancer. *Cell Cycle* **14**, 2473–2483 (2015).
517. Yoon, Y.-S., Park, J.-S., Tkebuchava, T., Luedeman, C. & Losordo, D. W. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation* **109**, 3154–3157 (2004).
518. Chang, M. G. *et al.* Proarrhythmic potential of mesenchymal stem cell transplantation revealed in an in vitro coculture model. *Circulation* **113**, 1832–1841 (2006).
519. Sale, G. E. & Storb, R. Bilateral diffuse pulmonary ectopic ossification after marrow allograft in a dog. Evidence for allotransplantation of hemopoietic and mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* **11**, 961–966 (1983).

520. Zarogoulidis, P. *et al.* Suicide Gene Therapy for Cancer - Current Strategies. *J Genet Syndr Gene Ther* **4**, 16849 (2013).
521. Malecki, M. Frontiers in Suicide Gene Therapy of Cancer. *J Genet Syndr Gene Ther* **2012**, e114 (2012).
522. Berger, C., Flowers, M. E., Warren, E. H. & Riddell, S. R. Analysis of transgene-specific immune responses that limit the in vivo persistence of adoptively transferred HSV-TK-modified donor T cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* **107**, 2294–2302 (2006).
523. Tey, S.-K., Dotti, G., Rooney, C. M., Heslop, H. E. & Brenner, M. K. Inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of alodepleted T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **13**, 913–924 (2007).
524. Garin, M. I. *et al.* Molecular mechanism for ganciclovir resistance in human T lymphocytes transduced with retroviral vectors carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Blood* **97**, 122–129 (2001).
525. Kuczynski, E. A., Vermeulen, P. B., Pezzella, F., Kerbel, R. S. & Reynolds, A. R. Vessel co-option in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **16**, 469–493 (2019).
526. Jain, R. K. & Stylianopoulos, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol* **7**, 653–664 (2010).
527. Hagedorn, C. & Kreppel, F. Capsid Engineering of Adenovirus Vectors: Overcoming Early Vector-Host Interactions for Therapy. *Hum Gene Ther* **28**, 820–832 (2017).
528. Guedan, S. & Alemany, R. CAR-T Cells and Oncolytic Viruses: Joining Forces to Overcome the Solid Tumor Challenge. *Front Immunol* **9**, 2460 (2018).
529. Sharp, D. W. & Lattime, E. C. Recombinant Poxvirus and the Tumor Microenvironment: Oncolysis, Immune Regulation and Immunization. *Biomedicines* **4**, 19 (2016).
530. Nayyar, G., Chu, Y. & Cairo, M. S. Overcoming Resistance to Natural Killer Cell Based Immunotherapies for Solid Tumors. *Front Oncol* **9**, 51 (2019).
531. Oh, E., Hong, J., Kwon, O.-J. & Yun, C.-O. A hypoxia- and telomerase-responsive oncolytic adenovirus expressing secretable trimeric TRAIL triggers tumour-specific apoptosis and promotes viral dispersion in TRAIL-resistant glioblastoma. *Sci Rep* **8**, 1420 (2018).
532. Vaupel, P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* **9 Suppl 5**, 10–17 (2004).
533. Goradel, N. H. *et al.* Oncolytic virotherapy: Challenges and solutions. *Curr Probl Cancer* **45**, 100639 (2021).
534. Zamarin, D. *et al.* Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. *Sci Transl Med* **6**, 226ra32 (2014).
535. Kaufman, H. L. *et al.* Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. *Ann Surg Oncol* **17**, 718–730 (2010).
536. Le, D. T. *et al.* Safety and survival with GVAX pancreas prime and Listeria Monocytogenes-expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* **33**, 1325–1333 (2015).

537. Ringelhan, M., Pfister, D., O'Connor, T., Pikarsky, E. & Heikenwalder, M. The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol* **19**, 222–232 (2018).
538. Kaufman, H. L., Kohlhapp, F. J. & Zloza, A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 642–662 (2015).