



Collegio Ghislieri
Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

14° Corso di formazione avanzata

Cellule rare circolanti

12-15 maggio 2015, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Giampaolo Merlini

14° Corso di formazione avanzata

Cellule rare circolanti



Collegio Ghislieri

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

14° Corso di formazione avanzata

Cellule rare circolanti

12-15 maggio 2015, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Giampaolo Merlini

© Copyright 2015  EDIMES
Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Edizioni Internazionali srl
Divisione EDIMES - Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

Tutti i diritti sono riservati.
Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo
(compresi i microfilm e le copie fotostatiche)
senza il permesso scritto dell'editore.

Indice

Prefazione e dedica	pag. IX
1. Unicità del fenotipo staminale: approcci single-molecole..... <i>CarloAlberto Redi</i>	» 1
2. Trasposoni e LINE L1 nel destino differenziativo delle singole cellule staminali..... <i>CarloAlberto Redi</i>	» 11
3. Le very small embryonic-like stem cell: cellule rare con grandi potenzialità in medicina rigenerativa..... <i>Manuela Monti</i>	» 18
4. Stem cell aging, clonal hematopoiesis and myelodysplastic syndromes	» 24
<i>Mario Cazzola</i>	
5. Riprogrammazione genetica: proprietà delle singole cellule..... <i>Manuela Monti</i>	» 31
6. Selezione immunomagnetica del graft: nuove prospettive in oncematologia..... <i>Claudia Del Fante</i>	» 37
7. What statisticians want: How to make an impact-factor (migliorare la qualità della ricerca clinica)	» 44
<i>Luigia Scudeller</i>	
8. La ricerca ed i limiti del possibile	» 50
<i>Salvatore Veca</i>	
9. Citogenetica e lesioni molecolari delle cellule staminali in oncematologia..... <i>Paolo Bernasconi, Marina Boni, Paola Maria Cavigliano, Irene Dambroso, Barbara Rocca, Rita Zappatore, Celeste Calvello, Ilaria Giardini, Antonella Orlando, Marilena Caresana, Francesco Ripamonti</i>	» 55
10. Secretomi: nuovi farmaci nella riparazione tissutale..... <i>Cesare G. Perotti</i>	» 64
11. Mesenchymal stromal cells: characterization, production and therapeutic use	» 69
<i>Mauro Krampera</i>	

12. Cellule tumorali circolanti e cancro della mammella	»	74
<i>Bianca Rovati, Sara Mariucci, Sara Delfanti, Paolo Pedrazzoli</i>		
13. Cellule T regolatrici: piccole cellule, molte funzioni.....	»	81
<i>Chiara Vasco</i>		
14. Il trapianto aploidentico T-repleto.....	»	85
<i>Luca Castagna</i>		
15. Regenerative medicine: something for the kidney?.....	»	97
<i>Barbara Imberti</i>		
16. La verità sulle cellule staminali.....	»	105
<i>Giuseppe Remuzzi</i>		
17. Microfluidica e cellule tumorali circolanti: progressi tecnologici.....	»	107
<i>Giuliano Mazzini</i>		
18. Circulating Myeloma Plasma Cells.....	»	117
<i>Lucia Nobili, Antonino Neri</i>		
19. Immunoterapia e Cellule Staminali del Cancro: evidenze precliniche e prospettive cliniche.....	»	124
<i>Massimo Aglietta</i>		
20. Standardized flow cytometry data analysis for the diagnosis, classification and monitoring of haematological malignancies.....	»	136
<i>A. Orfao, Q. Lécresse, C.E. Pedreira, E. Mejstrikova, V.H.J. van der Velden, S. Böttcher, J. Flores-Montero, S. Matarraz, A.W. Langerak, J. Almeida, A. Trinquand, L. Martín-Martín, A.J. van der Sluijs-Gelling, D. Karsch, L. Sędek, M. Lima, M. Gomes da Silva, Elaine S. Costa, G. Gaipa, M. Roussel, L. Campos-Guyotat, B. Paiva, N. Villamor-Casas, R. Fluxa, J. Verde, G. Grigore, J.J.M. van Dongen</i>		
21. Clinical and biological significance of rare tumor cells in multiple myeloma.....	»	149
<i>Bruno Paiva</i>		
22. Applicazioni Cliniche della Biopsia Liquida nel Carcinoma del Colon-Retto Metastatico.....	»	154
<i>Salvatore Siena, Erica Bonazzina, Giuseppina Ziranu, Andrea Sartore-Bianchi</i>		

23. Deterministic factors and stochastic events at the origin of Cancer Cells and of Metastatic Cells.....	» 161
<i>Lucio Luzzatto</i>	
24. Liquid biopsy in new drug development: Clinical perspectives and research opportunities.....	» 165
<i>Giuseppe Curigliano</i>	
25. Circulating and tissue mesenchymal stem cells in organ homeostasis and repair: an open debate	» 183
<i>Angelo Parini</i>	
26. The potential of single cell investigation: dissecting the human immune response to pathogens and self-antigens	» 188
<i>Antonio Lanzavecchia</i>	

Prefazione e dedica

Questo 14° Corso di formazione avanzata “Cellule rare circolanti” è dedicato alla memoria di Carlo Bernasconi, scomparso il 5 settembre 2014 per il rapido aggravamento di una lunga malattia. Carlo ha avuto una vita professionale lunga, fortunata e grandemente produttiva; ha contribuito da protagonista allo sviluppo della moderna Ematologia e ha creato una Scuola che è famosa in tutto il mondo.

I corsi sono stati ideati, organizzati e animati dalla grande passione scientifica di Carlo, che è sempre riuscito a cogliere i movimenti più avanzati della ricerca scientifica biomedica, con particolare predilezione per l'onco-ematologia. Anche il tema di quest'anno è stato discusso con Carlo, e insieme ne avevamo tratteggiato le linee principali.

È una eredità molto ricca quella lasciata da Carlo ed è una sfida difficile per tutti noi continuare la sua straordinaria opera di diffusione e condivisione della conoscenza nell'area biomedica.

Prof. Giampaolo Merlini

Unicità del fenotipo staminale: approcci single-molecole

CarloAlberto Redi

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “Lazzaro Spallanzani”, Università degli Studi di Pavia,
via Adolfo Ferrata n. 9, Pavia
Centro di Ricerche di Medicina Rigenerativa, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo,
Viale Camillo Golgi n. 19, Pavia

Lo sviluppo tecnologico di diverse metodiche molecolari avvenuto nella ultima decade sta sviluppando nuove forme di genomica, epigenomica, trascrittomica e proteomica (solo per citare alcune delle -omiche) indirizzandole allo studio di singole cellule. Questo fatto permette di rivedere studi classici alla luce di nuovi orizzonti concettuali e di porre nuove domande in Biologia e Medicina, domande in tempi precedenti non certamente formulabili. Un esempio semplice è quello degli studi di genomica svolta a livello di singola cellula, studi capaci di chiarire le relazioni tra diverse generazioni di cellule a partire da una singola cellula progenitrice (cell lineage relationships), in altri termini di tracciare la genealogia di intere popolazioni di cellule a partire da una cellula progenitrice. Così pure gli studi di epigenomica e proteomica a livello di singola cellula permettono ormai di valutare lo stato funzionale di singole unità cellulari.

È molto probabile che nell’arco di tempo della prossima decade queste tecnologie saranno integrate assegnando loro così un potenziale conoscitivo ancora maggiore per una analisi multidimensionale delle singole cellule. Analisi di questo tipo saranno in grado di produrre una conoscenza dettagliata a livelli sino ad oggi impensabili ad esempio sull’albero di derivazione da singole cellule di un intero organismo, anche di organismi superiori quali i Mammiferi (non solo più quindi una genealogia cellulare per organismi “deterministici” quali *Caenorabditis elegans*, la cui cartografia descrittiva è già nota), per culminare nella ricostruzione dell’intera linea cellulare umana (dallo zigote): la completa genealogia cellulare umana avrà ovviamente una ricaduta amplissima su tutta la biologia umana e la medicina (Frumkin et al., 2005; Shapiro et al., 2013). Ad oggi la letteratura scientifica è essenzialmente basata su lavori nei quali vengono esaminati numeri altissimi di cellule (in organi, tessuti o cellule isolate, comunque campioni ricchi di cellule). È questo un retaggio storico legato alle tecniche che si sono sviluppate nel corso di secoli; di recente è però divenuto possibile indagare fenomeni a livello di singola cellula sia tramite tecniche microscopiche sia tramite tecniche molecolari (Shapiro et al., 2013). Ciò permette un indubbio avanzamento delle conoscenze scientifiche dei fenomeni studiati poichè permette di verificare se i dati che si riferiscono a popolazioni di cellule (dati “medi”) sono confermati e

ben si adattano ai valori dei parametri (“medi”) ottenuti dalle singole cellule: in altri termini permettono di verificare se il valore medio ottenuto per le popolazioni di cellule, in quelli che ormai appaiono come studi classici, ben rappresenta il comportamento delle singole cellule studiate (Ray, 2013). Questi nuovi studi su singole cellule stanno ricoluzionando molte delle tradizionali discipline scientifiche poichè forniscono una enorme quantità di informazioni che molto spesso non erano previste poichè mascherate dal valore medio ottenuto grazie agli studi su popolazioni di cellule (di necessità condotti su popolazioni di cellule per via delle tecniche disponibili). Gli esempi capaci di confortare queste semplici osservazioni metodologiche sono ormai numerosi a livello di misure su singola cellula per attività enzimatiche (Levine et al., 2013), stati metabolici (Zenobi, 2013) e risposta trascrizionale (Sanchez e Golding, 2013). Risulta evidente quale incomparabile vantaggio possa derivare da misure effettuate su singole cellule: la possibilità di conoscere le variazioni nelle risposte di singole cellule ad identici stimoli o identiche condizioni di stimolazione (biochimica, biofisica, ecc). In molti casi addirittura è possibile conoscere le variazioni temporali delle risposte nel corso della stimolazione o delle variazioni “ambientali” a cui è sottoposta la singola cellula. Ad esempio la trascrizione genica è particolarmente suscettibile di avvenire per picchi di espressione genica (i.e., sintesi di RNA) che variano in modo consistente da una cellula ad un’altra cellula della stessa popolazione cellulare o che si accendono in alcune cellule ma non in altre, sempre della medesima popolazione cellulare. Il significato biologico di queste variazioni di risposta da parte di alcune cellule ma non di altre cellule appartenenti alla stessa popolazione cellulare è per ora solo ipotizzabile per la semplice ragione che disponiamo ancora di pochi dati. È possibile tentare di darne una spiegazione, speculativa, ipotizzando che forse le variazioni nelle risposte possano rivelarsi vantaggiose ai fini della conservazione energetica o per assicurare che alcune cellule sopravvivano in uno stato naïve in un ambiente in continuo cambiamento. Può anche essere suggerito che siano condizioni di tipo biofisico (i biologi tendono a prediligere aspetti biochimici!) a determinare una inevitabile variabilità di risposta a sollecitazioni di qualsivoglia natura: si pensi alla struttura anatomica di una nicchia di cellule staminali (CS) e si può ben immaginare come l’ambiente della nicchia sia di per se eterogeneo nell’assicurare stimoli biofisici (basterà ricordare le relazioni fisiche di contatto tra membrane cellulari delle cellule hub e delle cellule progenitrici di una qualunque nicchia di CS).

Prima di procedere nella trattazione del tema sarà bene precisare alcuni dettagli metodologici utili ad evitare trappole concettuali e capaci di indicare nuove esigenze di ricerca. Un primo aspetto riguarda la terminologia attualmente utilizzata: nella ormai vasta bibliografia disponibile (tutta degli ultimi anni e prodotta ad un ritmo vertiginoso) non è ancora ben definita l’epistemologia genetica del concetto stesso di variabilità individuale tra cellule teoricamente identiche sotto il profilo genetico. E così si parla di “variabilità tra cellula e cellula” intendendo il fenomeno per il quale singole cellule in una popolazione di cellule geneticamente identiche mostrano comportamenti e attività variabili tra loro. Come pure si fa riferimento alla “eterogeneità cellulare” indicando un concetto del tutto simile a

quello di variabilità tra cellule e cellula. Non vi è però, purtroppo, consenso su quale dei termini impiegare ed in quale contesto così che alla fine i due termini si presentano “intercambiabili” nella letteratura attuale. Talvolta il termine “eterogeneità” è usato per indicare la presenza di multipli fenotipi all’interno di una singola popolazione di cellule mentre il termine “variabilità” è usato per indicare variazioni di parametri nell’intorno di un singolo fenotipo. Comunque sia, la variabilità tra cellule e cellule si riferisce al fenomeno per il quale non vi sono due cellule geneticamente identiche che mostrino lo stesso fenotipo e comportamento dinamico. Va subito precisato che l’entità e l’origine della variabilità tra cellule dipende essenzialmente dalla attività cellulare che viene misurata e confrontata tra cellule: è chiaro che il caso, o la stocasticità, ha un ruolo considerevole in tutti i processi cellulari che coinvolgono un numero limitato di molecole. Piccole differenze in termini di corredo molecolare possono portare a grandi differenze nel tipo di comportamento cellulare. È chiaro che, in generale, meccanismi molecolari “robusti” sono in grado di tamponare variabilità cellulare dovuta ad intrinseci processi di stocasticità (o variabilità in termini di corredo molecolare). Ne risulta così che sono certamente dei fattori estrinseci quelli in grado di spiegare la stragrande maggioranza della variabilità totale misurata tra cellule. Una delle maggiori componenti tra i fattori estrinseci, in particolare per quelle cellule che si trovano in relazioni architetturali di aderenza tra loro, è rappresentata dal microambiente nel quale sono situate le singole cellule.

È evidente infatti che anche in condizioni di coltura cellulare perfettamente controllate, una popolazione di cellule in crescita sarà continuamente soggetta a microambienti variabili come conseguenza di un numero di cellule in continua crescita unitamente ad una adesione e migrazione cellulare in costante aumento. All’aumento numerico della dimensione della popolazione cellulare si accompagna un aumento della densità locale delle cellule per cui sempre più cellule si troveranno circondate da altre cellule (ciascuna singola cellula mostrando un diverso grado di esposizione a densità locali).

Va qui precisato che queste considerazioni non sono superate neppure negli studi di alta definizione (high-throughput) ove si applica la comune pratica di normalizzare i valori ottenuti per il numero di cellule poiché, ovviamente, il contesto popolazionale (ora ricordato) delle singole cellule può essere sostanzialmente diverso anche per popolazioni caratterizzate dallo stesso numero di cellule. Se da un lato è chiara la necessità di adottare approcci multiparametrici capaci di correggere l’influenza esercitata dal contesto popolazionale al livello di singola cellula dall’altro lato va precisato che questi approcci sono in via di sviluppo ed al momento non vi è una piena comprensione di quali processi cellulari siano influenzati dal contesto popolazionale. Sebbene il quadro teorico si presenti non dei più facili da aggredire, un numero sempre maggiore di domande a questo riguardo può essere formulato e studiato grazie soprattutto all’avanzamento delle tecniche di sequenziamento del DNA (next-generation sequencing). Le tecniche di sequenziamento del DNA sono state non solo raffinate in termini di analisi qualitativa ma anche in termini di quantità di DNA richiesta per questo tipo di analisi al punto che oggi è possibile analizzare le singole cellule in termini di sequenza di DNA.

Questa capacità permette di affrontare problemi biologici di ricerca cosiddetta di base (ad esempio la caratterizzazione degli eventi della precoce differenziazione cellulare nella embriogenesi umana) come pure problemi di applicazione clinica (Shapiro et al., 2013). Esempi recentissimi, ma ormai di citazione classica, sono i lavori sulla eterogeneità cellulare nei tumori (Dalerba et al., 2011) e la analisi trascrittomica di singole cellule rare circolanti in alcuni tumori (Ramskold et al., 2012). Diverse sono le metodiche che si possono impiegare per studiare cellule a livello di singole unità: la citofluorimetria a flusso, la spettrometria di massa e l'analisi di immagine di tipo quantitativo sono tra le tecniche più impiegate oltre al sequenziamento di DNA ed alla microfluidica. Risulta ovvio che alla base di ciascuna di queste tecniche vi è la essenziale necessità di una preparativa citologica capace di portare all'isolamento (individuazione) di singole cellule.

Avendo precisato queste necessarie premesse concettuali e di indirizzo metodologico è possibile affrontare il tema dell'unicità del fenotipo staminale a livello di singola cellula.

È ben noto che le CS svolgono un ruolo centrale nella rigenerazione dei tessuti e per il futuro di tutta la medicina rigenerativa. Per definizione le CS hanno la capacità di dividersi producendo una cellula figlia identica alla cellula madre ed una cellula che si differenzierà in uno dei diversi tipi cellulari che compongono l'organismo. Le CS sono di norma rare e difficili da isolare con la complicazione che vi è un lungo lasso temporale tra il momento in cui si riesce ad identificare o isolare una potenziale CS e la certificata espressione funzionale della sua staminalità. Inoltre, e questo è il fuoco di questa presentazione, le diverse popolazioni di CS presentano un alto grado di eterogeneità: anche le popolazioni di CS presunte omogenee presentano un alto tasso di eterogeneità (Enver et al., 2009) se si considerano diversi parametri cellulari intrinseci quali ad esempio lo stato delle modificazioni epigenetiche (Cedar e Bergman, 2011) e quello delle circuiterie regolatrici i fattori di trascrizione (Moignard et al., 2013). L'intrinseca variabilità cellulare tra CS risulta anche da dati di tipo indiretto, è ben nota infatti la grande variabilità della suscettibilità ad andare incontro al fenomeno della riprogrammazione genetica.

Le differenze cellulari dovute a fattori intrinseci alla cellula (probabilmente del tipo variazioni epigenetiche, diversi corredi molecolari, ecc.) sono il fulcro delle attuali ricerche tese ad una migliore comprensione del controllo molecolare della funzione di staminalità assegnata ad una cellula (o all'instaurarsi della funzione di staminalità in contesti fisiologici non previsti, i.e., cellule staminali tumorali) con l'interessante possibilità applicativa di tipo terapeutico. Ed è evidente che questa conoscenza non può derivare altro che da analisi su singole cellule: si pensi a come un routinario saggio biochimico quale il Western blotting è in grado di mascherare ogni variabilità cellulare presente nel campione. A questo proposito va precisato che la analisi su singole cellule non è solo un prerequisito concettuale per capire a fondo la biologia delle CS, a volte è una necessità metodologica dovuta all'inapplicabilità della tecnica disponibile. Proprio la tecnica del Western blotting ne è un esempio: per effettuare una simile analisi sono richieste moltissime cellule ed a volte in biologia delle CS non si hanno a disposizione alti numeri

di CS! Fermo resta che la principale necessità per studi su singola cellula di CS è il fatto che queste differiscono per proprietà intrinsecamente legate alla dinamica dello stato funzionale per cui se è necessario conoscere quali siano i fattori che determinano il destino citodifferenziativo di una CS è necessario conoscere ad esempio la dinamica molecolare di eventi quali il ciclo cellulare e l'andamento dei picchi di trascrizione del DNA. Nuove tecniche molecolari per analisi a livello di singole cellule si stanno sviluppando ad un ritmo sempre crescente ed i nuovi metodi si vanno integrando con quelli classici al fine di rispondere alle domande irrisolte che ancora sono alla base della biologia delle CS. Prima di passarne in rassegna alcune è bene ricordare che queste ultime a volte producono risultati che vengono sovra-interpretati, producono effetti inattesi e portano con se nuove limitazioni tecniche: è il bello del lavoro di ricerca! Ciascuna tecnologia di singola cellula ha una sua caratteristica peculiare di forza conoscitiva e deve essere scelta per rispondere ad una specifica domanda alla volta (approccio riduzionista). I microarrays su singola cellula, la spettrometria di massa ed il deep-sequencing sono di rilievo per una dettagliata analisi della espressione genica per un singolo momento (al tempo zero) e valgono per quel particolare valore temporale scelto. L'analisi di geni candidato, grazie a RTqPCR su singola cellula, alla PCR digitale, ed all'ibridazione *in situ* di RNA (o la sua immunocolorazione), unitamente alla valutazione di specifiche proteine, grazie all'osservazione microscopica della loro fluorescenza diretta (o più frequentemente indiretta), permettono una analisi integrata dei meccanismi molecolari capaci di regolare i processi biologici legati alla funzione di staminalità. Sebbene ciascuna delle tecnologie single-cell sia di alta precisione è chiaro che la scelta della specifica tecnologia risponde alle domande biologiche in studio.

L'analisi della espressione di RNA grazie alla RT-qPCR o alla RT-PCR digitale richiede la prioritaria conoscenza dei geni di interesse per il disegno dei loro primers. La PCR digitale ha il significativo vantaggio di permettere una quantificazione assoluta delle molecole bersaglio in studio senza dover ricorrere ad alcuna normalizzazione. Anche l'analisi per microarray richiede la prioritaria conoscenza dei geni in studio; a differenza delle metodiche basate sulla PCR quest'ultima permette la simultanea analisi per ibridazione di migliaia di geni. D'altro lato, il sequenziamento avanzato (deep sequencing) di singole cellule non richiede la prioritaria conoscenza dei geni candidato permettendo anzi la scoperta di nuovi potenziali geni sino a quel momento sconosciuti o nuove specie di RNA o varianti di splicing. Cionondimeno, le tecnologie PCR, microarray e sequenziamento avanzato sono tutte basate sull'isolamento degli acidi nucleici il che significa che l'impiego di queste tecniche per la single-cell analisi comporta la perdita di altre informazioni legate alla biologia della singola cellula: ad esempio. La distruzione della cellula per estrarre gli acidi nucleici ne cancella ogni informazioni sulla struttura interna ed anche molte sulle relazioni architetturali/spaziali con altre cellule. È possibile in buona parte superare questi inconvenienti grazie alla diretta analisi di immagini ottenuta per ibridazione di sonde sulle cellule fissate, il che però a sua volta comporta lo svantaggio di un basso potenziale per analisi simultanee per via della sovrapposizione degli spettri di emissione dei fluorofori

impiegati. Vero è che esiste la possibilità dell'analisi di immagine di diverse specie di RNA grazie al loro legame con sequenze bersaglio, il che ha anche il vantaggio di permettere di seguire nel tempo le immagini permettendo così di tracciare una valutazione dinamica per quegli RNA in studio: se può sembrare facilmente eseguibile una simile metodica è bene precisare che resta estremamente laboriosa e costosa anche in termini di tempo necessario (anche per il fatto che solo poche sequenze di RNA possono essere analizzate simultaneamente). Le metodiche che si basano sulle tecnologie degli anticorpi permettono di rivelare strutture proteiche sulla superficie delle membrane di cellule viventi o anche di antigeni intracellulari in cellule fissate sia grazie all'analisi di immagine sia per citofluorimetria a flusso. Come per tutti gli approcci basati sulla fluorescenza il potenziale per analisi multiple e simultanee è piuttosto basso.

Il "sorteggio" di singole cellule (cell sorting) è spesso la base per poter svolgere future ricerche e sotto questo profilo la fluorescenza proteica permette una analisi di immagine in continuo (time-lapse) sia *in vitro* sia *in vivo* in grado di essere non-invasiva ed altamente informativa. Fermo resta che ad oggi è ancora la spettrometria di massa che permette di localizzare e rilevare molte proteine in singole cellule (Wu e Singh, 2012). Nel corso degli anni le tecniche basate sulla PCR sono divenute sempre più sofisticate, basterà pensare alla PCR real-time quantitativa basata sulla trascrizione inversa (RT-qPCR).

Ad esempio, l'espressione genica su singola cellula analizzata con la RT-qPCR è ampiamente utilizzata nello studio delle CS e cellule progenitrici ematopoietiche ed ha già permesso da tempo di conoscere la gerarchia e la genealogia delle cellule progenitrici mieloeritroidi (Pronk et al., 2007) caratterizzandole anche sotto il profilo fenotipico e funzionale, non solo nell'aspetto assai interessante della topografia molecolare. Anche la microfluidica (si veda la relazione di Giuliano Mazzini in questo volume) ha permesso alla RT-qPCR di divenire altamente sensibile nell'analisi su singola cellula: sino a 9216 reazioni individuali di RT-qPCR per singole cellule (96 cellule x 96 geni) possono essere sviluppate simultaneamente in sistemi microfluidici commercialmente già sul mercato e disponibili (e.g., Fluidigm®). Con un sistema di questo tipo Moignard e collaboratori (Moignard et al., 2013) hanno analizzato 18 fattori di trascrizione in 597 popolazioni primarie di CS e cellule progenitrici ematopoietiche scoprendo specifici profili di espressione per specifiche sottopopolazioni di CS e progenitrici ematopoietiche ed allo stesso tempo confermando alcune relazioni di circuiteria tra questi fattori e scoprendone anche di nuove (relazioni).

Una alta variabilità individuale tra singole CS e cellule progenitrici ematopoietiche è stata osservata nel numero assoluto (non relativo!) di molecole di mRNA di svariati "house-keeping genes" grazie all'analisi di RT-qPCR digitale (droplet digital PCR, ddPCR) compiuta su singole cellule (Warren et al., 2006; Hindson et al., 2011). Anche l'analisi di trascrittomica compiuta su 12 singole CS ematopoietiche ne ha rivelato l'alta eterogeneità individuale (Ramos et al., 2006); è questo un dato di grande rilievo non solo teorico ma anche pratico per la medicina traslazionale: eterogeneità individuale nel corredo molecolare può significare una potenziale diversa risposta a stimoli farmacologici.

Anche l'analisi della espressione di ben 48 geni in CS pluripotenti allo stadio di blastocisti di 64 cellule ha permesso di assegnare specifici profili di espressione genica ai presuntivi tre foglietti embrionali (Guo et al., 2010), il che è teoricamente atteso ma non era ancora stato dimostrato ad uno stadio così precoce dello sviluppo embrionale una così alta variabilità individuale. Dato biologico che per altro è interessante tracciare a ritroso sino alle più precoci fasi dello sviluppo embrionale (il sogno dei biologi da secoli a questa parte, individuare il momento più precoce della separazione della linea germinale da quella somatica o comunque individuare il momento in cui sia mai possibile delineare un destino differenziale diverso per i primi due blastomeri!). Kurimoto e collaboratori (Kurimoto et al., 2006) sono riusciti a dimostrare la presenza di due diversi tipi di blastomeri nel topo allo stadio di sviluppo embrionale corrispondente ai 3.5 giorni (E3.5) su singoli blastomeri che mantengono una morfologia del tutto simile e simile ancora a quella del successivo giorno di sviluppo. Tang e collaboratori hanno per primi descritto un intero trascrittoma per una singola cellula riuscendo poi a chiarire le basi molecolari della trasformazione di CS pluripotenti transienti (quelle del nodo embrionale) in CS embrionali dimostrando in modo inequivocabile il ruolo svolto dai cambiamenti metabolici, dai regolatori epigenetici e quello di alcuni micro RNA per il mantenimento della capacità di autorinnovo (Tang et al., 2010). Nuovi geni e nuovi micro RNA (long non-coding RNAs) coinvolti nello stabilire la funzione di staminalità in CS embrionali umane derivate da embrioni pre-impianto sono stati scoperti da Yan e collaboratori rivelando anche qui una alta variabilità tra cellule e cellule (Yan et al., 2013).

Certamente la variabilità inter-cellulare messa in evidenza non riguarda solo il mondo degli acidi nucleici ma anche le proteine. La citofluorimetria a flusso resta la tecnica d'elezione per lo studio dell'espressione di proteine a livello intra-cellulare sebbene la osservazione microscopica diretta ed "in continuo", il sorteggio di singole cellule, la microdissezione di singole cellule grazie a forbici laser e le metodiche di isolamento di singole cellule basate sulle tecniche di microfluidica siano alternative possibili.

Di recente la osservazione diretta "in continuo" ha dimostrato una alta variabilità in popolazioni di CS neurali ritenute omogenee dimostrando in realtà la presenza di diversi progenitori staminali (Ortega et al., 2013). La citofluorimetria a flusso per analizzare le proteine a livello intra-cellulare si basa sull'impiego di anticorpi che per poter reagire necessitano della preventiva fissazione e permeabilizzazione della membrana cellulare: combinando questa metodica con la immunocolazione degli antigeni di superficie diviene possibile identificare anche popolazioni di cellule costituite da poche unità, permettendo così di analizzarle senza doverle preventivamente purificare (il che è un grande vantaggio quando le cellule di interesse siano rare). Da alcuni anni è in uso anche una altra tecnica non-invasiva di analisi di proteine intra-cellulari sviluppata grazie all'impiego di nanocorpuscoli coniugati con antigeni fluorescenti ("chromobodies", Rothbauer et al., 2006). Grazie all'impiego di quest'ultima tecnica (con una sonda coniugata con la GFP per la trascrizione del fattore di staminalità Nanog) Chambers e collaboratori hanno messo in evidenza una alta variabilità delle CS embrionali per quanto riguarda

l'espressione di uno dei più potenti fattori della pluripotenza staminale, Nanog (Chambers et al., 2007) mentre l'impiego di una sonda coniugata a due fluorofori, sempre per Nanog, ha chiarito che le CS embrionali esprimono entrambi gli alleli di Nanog (Filipczyk et al., 2013).

Tra i tanti esempi di variabilità cellulare tra CS per corredo di singole molecole vi è quello paradigmatico messo in evidenza in una nicchia che risulta essere quella storicamente analizzata per prima, l'archetipo della nicchia, quella delle cripte intestinali che negli anni '50 del secolo scorso e con l'impiego di autoradiografia permise di "provare" l'esistenza delle CS. Grazie all'analisi di immagine eseguita in vivo Ritsma e collaboratori hanno potuto descrivere in termini molecolari la costituzione della nicchia a livello di risoluzione delle singole cellule progenitrici mesenchimali (Ritsma et al., 2014). Ne è scaturito un forte sostegno al nuovo paradigma concettuale della biologia delle CS che concepisce la staminalità come una funzione assegnata alle cellule da fattori estrinseci, da quei fattori presenti in uno speciale microambiente (la nicchia) capaci di mantenere o attivare quelle circuiterie geniche che sono alla base del fenotipo staminale. Grazie ad una elegante analisi d'immagini eseguita *in vivo* ed in continuo (cell lineage-tracing technology) sulle cellule della cripta intestinale hanno potuto dimostrare che la posizione relativa di ciascuna cellula entro la nicchia ne regola il destino differenziativo in termini stocastici: molte cellule all'interno della nicchia ("border" e "central" cellule) alla base della cripta hanno il potenziale staminale ma solo quelle che risiedono nel profondo della base ("central cells") si comportano funzionalmente come CS *bona fide* nel lungo periodo anche se pure le "border" hanno il potenziale per comportarsi come "central" una volta che "per caso" vengono a trovarsi nella zona delle "central". Da qui lo stabilirsi del nuovo paradigma concettuale per le CS, paradigma che è proprio basato sull'esistenza di popolazioni cellulari eterogenee, sulla variabilità o eterogeneità cellulare, ove una popolazione dinamicamente eterogenea funziona, nel lungo termine temporale, come una singola popolazione di CS.

Simili risultati, e con le stesse tecniche di analisi di immagini quantitative legate al tracciamento delle genealogie cellulari (clonal cell labeling strategies) sono stati raggiunti anche da Kumar e collaboratori per quanto riguarda lo sviluppo del polmone. L'analisi della proliferazione, migrazione e differenziazione di singole CS mesenchimali ha permesso di scoprire una alta eterogeneità di progenitori mesenchimali responsabili della produzione dei diversi tipi cellulari polmonari (Kumar et al., 2014). Risultati del tutto simili sono stati ottenuti da De Ward e collaboratori per l'esofago (De Ward et al., 2014).

Bibliografia

1. Cedar H, Bergman Y. Epigenetics of haematopoietic cell development. Nat. Rev. Immunol. 2011; 11: 478-488.
2. Chambers I, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. Nature. 2007; 450: 1230-1234.
3. De Ward AD, Cramer J, Lagasse E. Cellular heterogeneity in the mouse eso-

- phagus implicates the presence of a non-quiescent epithelial stem cell population. *Cell Rep.* 2014; 9: 701-711.
4. Dalerba P, et al. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. *Nature Biotech.* 2011; 29: 1120-1127.
 5. Enver T, Pera M, Peterson C, Andrews PW. Stem cell states, fates, and the rules of attraction. *Cell Stem Cell.* 2009; 4: 387-397.
 6. Etzrodt M, Ende M, Schroeder T. Quantitative Single-Cell Approaches to Stem Cell Research. *Cell Stem Cell.* 2014; 15: 546-558.
 7. Filipczyk A, et al. Biallelic expression of nanog protein in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2013; 13: 12-13.
 8. Frumkin D, Wasserstrom A, Kaplan S, Feige U, Shapiro E. Genomic variability within an organism exposes its cell lineage tree. *PLoS Computat. Biol.* 2005; 1: 382-394.
 9. Guo G et al. Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev. Cell.* 2010; 18: 675-685.
 10. Hindson BJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* 2011; 83: 8604-8610.
 11. Hoppe PS, Coutu DL, Schroeder T. Single-cell technologies sharpen up mammalian stem cell research. *Nature Cell Biology.* 2014; 16: 919-927.
 12. Kumar ME, Bogard PE, Espinoza FH, Menke DB, Kingsley DM, Krasnow MA. Defining a mesenchymal progenitor niche at single-cell resolution. *Science.* 2014; 346: 827-831.
 13. Kurimoto K, et al. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34: e42.
 14. Levine JH, Lin Y, Elowitz MB. Functional Roles of Pulsing in Genetic Circuits. *Science.* 2013; 342: 1193-1200.
 15. Moignard V, et al. Characterization of transcriptional networks in blood stem and progenitor cells using high-throughput single-cell gene expression analysis. *Nat. Cell Biol.* 2013; 15: 363-372.
 16. Ortega F, et al. Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nat. Cell Biol.* 2013; 15: 602-613.
 17. Pronk CJH, et al. Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell Stem Cell.* 2007; 1: 428-442.
 18. Ramos CA, et al. Evidence for diversity in transcriptional profiles of single hematopoietic stem cells. *PLoS Genet.* 2006; 2, e159.
 19. Ramskold D, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nature Biotech.* 2012; 30: 777-782.
 20. Ray LB. Cells go solo. *Science.* 2013; 342: 1187.
 21. Ritsma L, et al. Intestinal crypt homeostasis revealed at singlestemcell level by in vivo live imaging. *Nature.* 2014; 507: 362-365.
 22. Rothbauer U, et al. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat. Methods.* 2006; 3: 887-889.

23. Sanchez A, Golding I. Genetic Determinants and Cellular Constraints in Noisy Gene Expression. *Science*. 2013; 342: 1188-1193.
24. Shapiro E, Tamir Biezuner T, Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nature Review Genetics*. 2013; 14: 618-630.
25. Tang F, et al. Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. *Cell Stem Cell*. 2010; 6: 468-478.
26. Zenobi R. Single-Cell Metabolomics: Analytical and Biological Perspectives. *Science*. 2013; 342: 1201.
27. Warren L, Bryder D, Weissman IL, Quake SR. Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RTPCR. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006; 103: 17807-17812.
28. Wu M, Singh AK. Single-cell protein analysis. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2012; 23: 83-88.
29. Yan L, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2013; 20: 1131-1139.

Trasposoni e LINE L1 nel destino differenziativo delle singole cellule staminali

CarloAlberto Redi

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “Lazzaro Spallanzani”, Università degli Studi di Pavia,
via Adolfo Ferrata n.9, Pavia
Centro di Ricerche di Medicina Rigenerativa, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo,
Viale Camillo Golgi n.19, Pavia

Più della metà del genoma umano è derivato da sequenze di DNA di elementi mobili, la quasi totalità delle quali è costituita da retrotrasposoni che si diffondono nei genomi ospiti per trascrizione inversa attraverso un intermedio di RNA e la risultante integrazione del DNA retrotrascritto (per una recente disamina, si veda Cordaux e Batzer 2009). Questi retroelementi endogeni (Endogenous RetroElements) rappresentano da un lato una essenziale forza evolutiva (per la capacità di creare nuovi contesti di regolazione dell'espressione genica o di adattamento di nuove funzioni geniche) ma dall'altro costituiscono un potenziale deregolatore della corretta integrità genomica e della relativa espressione genica: ne risulta che evolutivamente si sono sviluppati contromeccanismi di repressione trascrizionale di queste sequenze nel corso delle fasi più precoci dello sviluppo embrionale. Questi processi dinamici di mutuo controllo e interazione tra sequenze di acidi nucleici vanno di pari passo con le modificazioni epigenetiche delle sequenze di DNA del genoma materno e paterno a partire dal momento successivo alla fecondazione. Infatti, nel corso delle più precoci fasi dello sviluppo embrionale dei Mammiferi i genomi materno e paterno subiscono dapprima un completo azzeramento delle modificazioni epigenetiche alla base del controllo dell'espressione differenziale dei geni (imprinting) e subito dopo la reimposizione di un nuovo programma epigenetico. L'epigenoma funge dunque, sotto il profilo epistemologico genetico, da interfaccia genoma/ambiente, digitalizza ciò che accade al nostro genoma esposto all'“ambiente” (da quello embrio-feto-materno a quello della nostra vita adulta, dallo stile di vita all'ambiente in senso più biochimico/biofisico di presenza di xenobionti) e permette una risposta, di significato adattativo, agli stimoli ambientali. È da queste premesse biologiche che è necessario elaborare un discorso capace di includere tutti gli “attori” che concorrono a comporre il nostro genoma e ne esauriscono le capacità di espressione fenotipica, a tutti i livelli di organizzazione del vivente, dal cellulare al tissutale, dall'organo al corpo intero. Questo ciclico azzerare e reimporre un primo programma epigenetico ha nelle cellule staminali (CS) costituite dallo zigote (CS totipotente) e dai blastomeri che si originano dalle prime fasi della segmentazione quello che gli autori di lingua tedesca chiamano il *korper*, il corpo inteso come substrato fisico.

Ed è proprio come queste prime CS embrionali (SE) si vengono a costituire il fatto iniziale del nostro accadere biologico che sarà determinante al fine di una corretta costituzione fisica del nuovo individuo. Diviene dunque necessario capire quali sono gli elementi costitutivi del genoma quelli che assegneranno un preciso destino differenziativo alle cellule che vanno producendosi nel corso delle prime fasi embrionali. In seguito all'azzeramento epigenomico del pronucleo femminile e di quello maschile (prima dell'anfimissi), le SE nel loro passaggio da totipotenti (zigote e primissimi blastomeri) a pluripotenti (cellule del nodo embrionale) sono fondamentalmente inattive sotto il profilo della espressione genica. In altri termini vengono prodotti nuclei "identici" che segregano in territori citoplasmatici sempre più differenziati, per via della partizione del citoplasma oocitario, sino allo stadio di blastocisti. Saranno poi le interazioni nucleo-citoplasmatiche quelle che porteranno ad una espressione differenziale dei geni legati al "commitment" (impegno) differenziativo delle SE. Nel corso di questi passaggi dello sviluppo embrionale il metabolismo degli acidi nucleici è essenzialmente quello legato alla duplicazione del DNA in concomitanza delle mitosi che si vanno succedendo nel passaggio da unicellulare (zigote) a pluricellulare (blastocisti). Diversi sono i meccanismi che presiedono alla repressione della trascrizione del DNA mentre tutta la macchina enzimatica nucleare è coinvolta nella duplicazione. Quelli che presiedono al silenziamento del DNA non codificante proteine, circa il 98% del genoma umano (il principale "attore" della composizione genomica), sono di particolare interesse poichè la loro azione nelle precocissime fasi dello sviluppo embrionale è in grado di determinare il futuro differenziativo delle CS e quindi la costituzione/composizione dei tessuti (ed organi) derivanti dai tre foglietti embrionali. Di particolare interesse ai fini del futuro differenziativo delle SE e quindi a cascata delle CS somatiche e dei tessuti ed organi che andranno formandosi sono i meccanismi preposti alla repressione degli elementi di DNA mobile, trasposoni (i principali costituenti dell'attore DNA non codificante), che per loro intrinseca natura rispondono ad un metabolismo del DNA capace di generare variabilità. Gli elementi trasponibili, ben più della metà del genoma umano, sono "pezzi" di DNA che si copiano e si reinseriscono qui e là lungo tutto l'asse della fibra di cromatina. Sono dunque potenzialmente in grado di alterare le circuiterie di controllo dell'espressione genica grazie ad inserzioni casuali in regioni quali i promotori o repressori dei geni stessi creando così variabilità nella espressione dei geni sotto controllo delle porzioni di DNA a significato regolativo che le incorporano. Gli elementi LINE-1s (Long INterspersed Element-1s) sono tra gli elementi mobili gli unici ancora attivi nell'autonoma replicazione all'interno del genoma umano, continuamente capaci di espressione ed amplificazione delle 6-7 kilobasi di DNA che li compongono. Nel genoma umano ne sono presenti circa 500,000 copie, il che ne fa circa il 20% dell'intero genoma indicandone la rilevanza nel corso dell'evoluzione delle scimmie antropomorfe e dell'uomo (Marchetto et al., 2013). Se da un lato risulta chiaro come questi elementi siano un fattore cruciale dell'evoluzione del genoma umano (come sopra ricordato ne costituiscono circa il 20%), dall'altro è ancora più evidente il potenziale di alterazione della fisiologica e regolare macchina molecolare alla base dello sviluppo embrionale e dell'omeo-

stasi tissutale: la loro proliferazione, essenzialmente fuori controllo, può infatti risultare dannosa nel breve volgere del tempo ontogenetico sebbene rivelarsi fonte di variabilità genetica utilissima sull'orizzonte evolutivo filogenetico. È questo un tipico tema di EVO-DEVO o addirittura come si ritiene oggi di ECO-EVO-DEVO vista la capacità di fattori ambientali (ecologici) di interferire con la regolare espressione del genoma nel corso dello sviluppo embrionale, integrandosi con modificazioni epigenomiche. Queste considerazioni generali assumono un significato di particolare rilievo quando si pensi al metabolismo degli elementi mobili nelle cellule germinali e nei primi blastomeri originati dalle fasi precoci della segmentazione. Risulta infatti evidente come qualsivoglia cambiamento nella composizione/costituzione del genoma nelle primissime fasi dello sviluppo embrionale andrà parallelamente e proporzionalmente incontro ad una amplificazione mano a mano che il numero di cellule dell'organismo andrà aumentando con lo sviluppo del corpo adulto. Come già ricordato, nelle cellule dell'organismo a partire dal momento di reimposizione dell'imprinting genetico (dalla blastocisti al momento dell'impianto sino all'adulto) questi elementi finiscono sotto controllo della repressione esercitata dalla metilazione delle isole CpG ma nelle SE totipotenti (zigote, blastomeri delle primissime fasi della segmentazione e della morula) e pluripotenti (blastomeri del nodo embrionale) viene a mancare un tale controllo di soppressione dell'amplificazione delle LINE-1s e può quindi aprirsi una finestra temporale all'interno della quale può originarsi una notevole variabilità, eterogeneità, di costituzione/composizione del genoma di queste CS (ciascuna singolarmente sede di fenomeni stocastici di amplificazione dei trasposoni) che si riverbererà amplificata nelle fasi successive dello sviluppo e quindi nel corredo cellulare dell'organismo adulto. A rendere ancora più efficaci le LINE1s nel generare variabilità genomica (comunque ben presenti con più di 100 elementi attivi nella retrotrasposizione e con ben più di 40 di elementi LINE1s "altamente attivi", Beck et al., 2011) è il fatto che esse forniscono la macchina enzimatica necessaria alla trasposizione dei retroelementi non-autonomi come le SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements, il principale costituente essendo le ripetizioni Alu) e le SVAs (SINE-VNTR) Variable Number Tandem Repeat - Alu, una composita famiglia di ERE tipica degli ominidi): ed anche la trasposizione degli elementi SINEs e SVAs è un potente generatore di variabilità/eterogeneità genomica cellulare. Di pari passo a queste attività del metabolismo degli acidi nucleici nel corso delle prime fasi dello sviluppo embrionale avvengono anche cambiamenti su scala globale del genoma delle CS (di queste primissime fasi dello sviluppo embrionale), cambiamenti che sono alla base delle diverse vie differenziative intraprese dalle CS. Molti di questi cambiamenti sono regolati da alterazioni epigenetiche, il più delle volte dovute alla metilazione, del DNA. Le SE delle prime fasi embrionali si presentano in diversi stati di pluripotenza (stato basale, o naïve, e stato iniziale delle CS dell'epiblasto, EpiSCs). È frutto di speculazione, per ora, ma è estremamente suggestivo ritenere che queste condizioni derivino dalla asimmetria epigenetica dei due genomi parentali (Burton e Torres-Padilla, 2014). I due genomi parentali restano, nel topo, separati fisicamente all'interno della cellula uovo/zigote prima dell'anfimissi ed a questo livello esibiscono un'alta asimmetria nei li-

velli di composizione/costituzione del loro genoma. A questo livello, nella gran parte dei Mammiferi, i due genomi vengono del tutto azzerati per quanto riguarda le marcature epigenetiche (avviene una demetilazione estensiva) che tanto differiscono tra l'uno e l'altro (ad esempio per quanta riguarda la presenza di Citosine metilate). Il genoma paterno risulta essere più veloce di quello materno nel terminare la demetilazione e questo fatto pare legato al rimpiazzo delle protamine con gli istoni (di origine materna). L'alta eterogeneità cellulare per quanto riguarda la composizione/costituzione del genoma delle cellule del nodo embrionale (le SE) è risultata evidente alla analisi di trascrittomiche effettuata su singole cellule (Kurimoto et al., 2006) di topolini nella fase pre-impianto (blastocisti). Questo dato sostiene l'ipotesi di un modello di specificazione delle linee di differenziazione cellulare basato su una distribuzione a sale-e-pepe dei diversi progenitori (già resi eterogenei dai processi stocastici di amplificazione trasposonica sopra ricordati): nel nodo embrionale sarebbero mescolate eterogeneamente le SE progenitrici del primitivo endoderma e dell'epiblasto, il tutto rinforzato da una intrinseca stocastica variabilità tra cellula e cellula SE che agirebbe da rinforzo grazie a segnali antagonistici tra cellule, segnali che sono sottesi al processo di differenziazione in primitivo endoderma ed epiblasto (Rossant e Tam, 2009; Ohnishi et al., 2014) a cui vanno incontro queste SE. Lo sviluppo dell'embrione preimpianto di mammifero è altamente regolativo, come la formazione di gemelli identici è li a dimostrare, e ciò significa che ciascuna cellula del nodo embrionale non è pre-determinata nella sua via citodifferenziativa. Ben diversa è la situazione nella grande maggioranza delle specie di non Mammiferi ove la via citodifferenziativa è determinata dalla distribuzione asimmetrica di determinanti citoplasmatici che vanno segregando in modo asimmetrico tra le cellule figlie nel corso della segmentazione: si pensi alle proteine del complesso PAR in *Drosophila melanogaster* e in *Caenorhabditis elegans*. La loro distribuzione corticale asimmetrica nell'oozita determinerà l'asse antero-posteriore del futuro embrione. In contrasto con questo meccanismo, nel topo e nell'uomo sino allo stadio di 8 blastomeri, ciascuna SE rimane morfologicamente identica alle altre e può dare origine a tutti i tipi di tessuti dell'embrione quando venga trapiantata in un altro embrione, integrandosi perfettamente sotto il profilo differenziativo nel nuovo tessuto ospite (Johnson, 2009). È questa potenziale capacità di sviluppo (al di là delle interessanti considerazioni filosofiche sul concetto di "potenza") a risultare il fatto biologico di maggiore difficoltà (il motivo) per il quale ancora non si è riusciti a stabilire se blastomeri dello stadio precedente quello a 8 cellule presentino significative differenze intra-cellulari capaci di determinare almeno in parte il loro destino differenziativo prima della formazione della blastocisti. È possibile iniziare a mettere a fuoco l'asimmetria nella costituzione cellulare della blastocisti a partire dallo stadio della morula a 16 blastomeri quando si origina uno strato di blastomeri che viene racchiuso da un'altro strato di blastomeri collocati più esternamente: le cellule dello strato interno tendono a formare le cellule del nodo embrionale (le SE) mentre quelle dello strato posto più esternamente a formare le cellule del trofotoderma. Comunque, i blastomeri ancora allo stadio di 16 cellule mantengono una alta plasticità (sono SE pluripotenti) e non sono determinati (committed) ad alcuna

specifica via di citodifferenziazione. Le cellule del trofotoderma vengono a determinarsi più precocemente rispetto a quelle del nodo embrionale; queste ultime si differenziano in epiblasto embrionale e primitivo endoderma embrionale nel successivo ciclo di divisione cellulare. Le SE che si possono derivare dal nodo embrionale a questo stadio di sviluppo mantengono comunque ancora la capacità di differenziarsi in cellule del trofotoderma se opportunamente stimolate in coltura attraverso sia la repressione del fattore di trascrizione “octamer-binding transcription factor 4”, Oct4, oppure attraverso la espressione del fattore “caudal type homeobox 2”, Cdx2 (Niwa et al., 2005). Resta comunque cruciale al fine di un regolare sviluppo embrionale il controllo esercitato sui potenziali generatori di variabilità cellulare non-programmata, precisamente di quelli legati a processi stocastici capaci di generare variabilità non-controllata, quelli legati dunque alla creazione di variabilità genomica. Diversi lavori hanno analizzato il metabolismo delle sequenze LINE-1s sia sotto il profilo di generatore di variabilità genetica nei processi di speciazione ed in quelli filogenetici (si veda il lavoro del gruppo C.A. Redi, Rebuzzini et al., 2009) sia sotto il profilo di generatori di variabilità cellulare. In un recentissimo lavoro, a questo riguardo, il gruppo di Didier Trono della scuola del Politecnico Federale di Losanna (Castro-Diaz et al., 2014) hanno messo in evidenza alcuni dei meccanismi attivi nelle SE delle prime fasi di sviluppo per “silenziare” i processi di amplificazione dei trasposoni (si rimanda alla estesa bibliografia di questo lavoro per un’analisi dettagliata dei lavori già pubblicati). Risulta così che delle proteine capaci di agire come repressori dei trasposoni, dette KAP1 (KRAB [KRüppel-Associated Box domain]-Associated Protein 1) il principale cofattore delle proteine KRAB-ZFPs (KRAB-containing Zinc Finger Proteins) già note per la capacità di restrizione della trascrizione di retrovirus endogeni, sono in grado di restringere la trascrizione di alcuni specifici elementi LINE1s ed in particolare di quelli entrati nel genoma umano tra i 26.8 ed i 7,6 milioni di anni fa. È qui necessario ricordare che il metabolismo degli elementi LINE1s è assai paradigmatico dei processi darwiniani di evoluzione ! Una volta stabilitisi all’interno di un genoma, i trasposoni LINE1s continuano a moltiplicarsi autonomamente sino a che il genoma ospite non evolve un sistema “di difesa” capace di inibire la trascrizione di quelle sequenze di DNA che compongono quello specifico elemento LINE1s; a sua volta quegli elementi LINE1s, od altri nuovi, mutando arricchiscono il repertorio (quali- e quantitativo) del genoma ospite tornando a moltiplicarsi grazie al fatto che le sequenze di DNA mutate non vengono più riconosciute e silenziate dalle proteine KAP1. A ciascun tempo evolutivo un singolo elemento LINE1 è attivo e determina un “lineage” di migliaia di copie che vanno amplificandosi prima di essere silenziate (e rimpiazzate da nuove copie originanti da un nuovo elemento LINE1 attivo) sotto la pressione selettiva dei fattori di restrizione della trascrizione del genoma ospite, fattori di restrizione della trascrizione che sono particolarmente attivi nel silenziare gli elementi LINE1 nel corso delle primissime fasi dello sviluppo embrionale (nelle SE).

È questa una dinamica evolutiva tipica, ad esempio, della evoluzione della relazione ospite-parassita o della evoluzione della riproduzione per sessualità-asesualità; in altri termini è una dinamica non nuova in termini di filosofia della Biolo-

gia evolutiva. Le interazioni dinamiche tra genoma ospite e trasposoni silenziati non vengono qui considerate sebbene di grande interesse al fine della espressione fenotipica di caratteristiche fisiologiche della cellula, caratteristiche non basate sulla espressione di geni ma sulle proprietà biofisiche che la cellula acquisisce ospitando un genoma di una particolare composizione/costituzione (Redi e Capanna, 2012). Risulta così che le proteine KRAB-ZFPs sono in grado di riconoscere specificatamente delle sequenze specifiche di alcuni elementi LINE-1s ed il legame così stabilito determina l'arruolamento delle proteine KAP1 capaci di prevenire la trascrizione dei trasposoni. Questi fenomeni risultano complicati, per una loro generalizzazione, dal fatto che paiono essere specifici per il tempo evolutivo della comparsa delle diverse famiglie di LINE1s. Infatti, nelle SE dell'uomo, il knockdown di KAP1 induce l'espressione delle LINE1s regolate da (legate a) KAP1 ma non esercita alcun effetto sulle (evolutive) più giovani LINE1s. Queste ultime vengono invece stimolate dalla deplezione della DNA-metiltransferasi il che sostiene l'idea che sia una circuitaria PIWI-piRNA (PIWI-interacting RNA) quella che regola (silenziando) le LINE1s nelle SE: in altri termini, il controllo (silenziamento) delle LINE1s che emergono come evolutivamente nuove nelle SE delle primissime fasi dello sviluppo embrionale sarebbe esercitato da sistemi di metilazione del DNA prima che repressori proteici del tipo KAP1 si vengano selezionando. È ragionevole ritenere che nel tempo evolutivo necessario alla selezione di proteine KAP1 specifiche per le nuove sequenze LINE1s, il genoma ospite eserciti un'azione di blocco per intervalli: prima dell'evoluzione di un sistema altamente specifico (proteine KAP1s), i piccoli RNA (microRNAs) possono attivare i meccanismi epigenetici della metilazione del DNA comunque capace di silenziare i trasposoni LINE-1s. Questo suggerimento trova sostegno nella dimostrazione di Narvaiza e Gage (2013) che microRNA della famiglia piRNA sono in grado di sopprimere la attività degli elementi LINE1s evolutivamente più giovani delle SE pluripotenti umane.

Bibliografia essenziale

1. Beck CR, et al. LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2011; 12: 187-215.
2. Burton A, Torres-Padilla ME. Chromatin dynamics in the regulation of cell fate allocation during early embryogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* 2014, 15: 722-732.
3. Castro-Diaz N, et al. Evolutionally dynamic L1 regulation in embryonic stem cells. *Genes Dev.* 2014; 28: 1397-1409.
4. Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet.* 2009; 10: 691-703.
5. Johnson MH, From mouse egg to mouse embryo: polarities, axes, and tissues. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2009; 25: 483-512.
6. Kurimoto K, et al. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34, e42.

7. Marchetto MC, et al. Differential L1 regulation in pluripotent stem cells of humans and apes. *Nature*. 2013; 503: 525-529.
8. Niwa H, et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*. 2005; 123: 917-929.
9. Ohnishi Y, et al. Cellto cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages. *Nature Cell Biol*. 2014; 16: 27-37.
10. Rebuzzini, et al. Quantitative variation of LINE-1 sequences in five species and three subspecies of the subgenus *Mus* and in five Robertsonian races of *Mus musculus domesticus*. *Chromosomes Res*. 2009; 17: 65-76.
11. Redi CA, Capanna E. Genome size evolution: sizing mammalian genomes. *Cytogenet Genome Res*. 2012; 137: 97-121.
12. Rossant J, Tam PP. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development*. 2009; 136: 701-713.

Le very small embryonic-like stem cell: cellule rare con grandi potenzialità in medicina rigenerativa

Manuela Monti

Centro Ricerche di Medicina Rigenerativa, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Lo sviluppo embrionale ed il successivo ringiovanimento dei tessuti adulti è regolato da una popolazione di cellule staminali che, auto-rinnovandosi, agiscono come guardiani dell'integrità di tessuti e organi, regolando la durata della vita di un organismo adulto. In medicina rigenerativa, le cellule staminali pluripotenti (PSC) vengono considerate le cellule più importanti, ovvero caratterizzate sia in vivo che in vitro grazie alla abilità di:

- originare le cellule dei tre foglietti embrionali, ecto, endo e meso-derma;
- completare lo sviluppo embrionale pre-impianto con la formazione della blastocisti;
- formare teratomi in modelli animali come prova definitiva della loro caratteristica pluripotenza.

Durante lo sviluppo embrionale, le PSC si originano dalla cellula staminale totipotente per eccellenza, ovvero lo zigote e durante le successive fasi dello sviluppo colonizzano la massa cellulare interna (ICM, Inner Cell Mass), da cui si originerà l'embrione vero e proprio. Le PSC isolate dalla ICM possono essere espanse in vitro come cellule staminali embrionali, ESC (Embryonic Stem Cells). Dopo la gastrulazione, quasi tutte le cellule perdono la loro caratteristica di pluripotenza e divengono "committed" (irreversibilmente impegnate) verso un destino cellulare ben più definito e specializzato per poi assumere caratteristica multi- e uni-potente nell'adulto. Molte ricerche stanno tuttavia concentrando la loro attenzione sulla possibile presenza di cellule staminali dotate di caratteristica pluripotente anche nei tessuti/organi adulti. Potenziali PSC sono state infatti descritte e isolate come:

- cellule progenitrici multipotenti adulte;
- cellule staminali adulte multipotenti;
- "unrestricted" cellule staminali somatiche;
- cellule adulte isolate dal midollo e "multilineage inducibile";
- "multilineage differentiating stress-enduring stem cells".

È verosimile pensare che molte delle cellule riportate in questo elenco, corrispondano, in realtà, allo stesso tipo cellulare.

circa 15 giorni in coltura in temperatura e umidità controllate, queste cellule sono in grado di formare cisti embrioidi, del tutto paragonabili ai corpi embrioidi ottenibili dalla coltura di ESC. Le sfere embrioidi risultano essere formate da cellule staminali “primitive” che sono in grado di formare i tre foglietti embrionali se coltivate in determinati ed appropriati terreni di coltura (Kucia et al., 2006).

In modelli animali portatori di diverse patologie come ad esempio lo stroke ischemico e l’infarto, si è visto come le VSELs vengano mobilizzate nel sangue periferico e siano in grado di rigenerare l’organo danneggiato (Fig. 1).

L’ischemia miocardica induce l’aumento di espressione di citochine (LIF), chemochine (SDF-1), fattori di crescita (VEGF, HGF) ed il rilascio di fosfolipidi nella zona di confine dell’infarto. L’aumentata espressione di tutti questi fattori è responsabile del rilascio delle VSELs dalla nicchia del midollo osseo e la loro successiva sedimentazione a livello del danno ischemico. Il rilascio delle VSELs dalla nicchia del midollo osseo è orchestrato dalla espressione di metalloproteinasasi e dal rilascio di fosfolipidi. Nel sangue periferico di un individuo adulto, le VSELs sono molto rare ma dopo ischemia queste cellule vengono rapidamente messe in circolo e l’espressione di marcatori di pluripotenza così come i marcatori specifici per le cellule di tipo cardiaco, muscolare e neuronale risulta molto elevata (Vojakowski et al., 2011).

Very Small Embryonic-like stem cells: storia e prospettive future

Una decina di anni orsono, Marius Ratajczak è stato il primo ad aver isolato una popolazione di cellule embrionali-simili nel midollo osseo murino (Kucia et al., 2006), scatenando però dubbi ed incertezze in una parte del mondo scientifico che si interroga tutt’ora riguardo alla loro reale esistenza (Abbot 2013; Ratajczak et al., 2014). Gli studi condotti dal prof. Ratajczak e collaboratori hanno permesso, inizialmente, di purificare una popolazione omogenea di cellule rare quiescenti (0,02% di cellule mononucleate del midollo osseo) Sca-1⁺ Lin⁻ CD45⁻, negative per i marcatori delle cellule ematopoietiche (MHC, HLA-DR) e mesenchimali (CD90⁻, CD105⁻, CD29⁻), di dimensione ridotta (diametro di 3-5 µm), aventi un grande nucleo costituito da eucromatina e con la capacità di formare neurosfere in coltura. Inoltre, queste cellule, hanno mostrato positività per i marcatori specifici delle ESC (Mvh, Stella, Fragilis, Nobox, Hdac6), per i marcatori di pluripotenza (Rex1, Nanog, SSEA1, Klf4), nonché la capacità di differenziarsi nelle cellule dei tre foglietti embrionali. A differenza delle ESC, tuttavia, non sono in grado di formare teratomi se iniettate in topi immunodeficienti.

Per tutte queste caratteristiche sono state dunque chiamate Very Small Embryonic-Like stem cells e Ratajczak e collaboratori hanno ipotizzato che queste cellule si depositano nel midollo osseo durante le primissime fasi dello sviluppo e che, per le loro caratteristiche di pluripotenza possono essere delle valide candidate per possibili impieghi in medicina rigenerativa.

Il gruppo guidato da Ratajczak ha inoltre identificato le VSELs nel sangue del cordone ombelicale come cellule CXCR4⁺ CD34⁺ CD133⁺ Lin⁻ CD45⁻, positive anche per Oct4 e SSEA-4 (Kucia et al., 2007; Zuba-Surma et al., 2011b).

Un altro gruppo, coordinato da Deepa Bhartiya ha mostrato per la prima volta la presenza di VSEL in situ, all'interno della loro nicchia nell'ovario di donne in perimenopausa e nel testicolo di pazienti malati di cancro alla prostata (Bhartiya et al., 2012). Le VSELS sono state individuate insieme alle cellule epiteliali superficiali come popolazione di cellule localizzate nell'ovario e, nel testicolo, come la popolazione cellulare sita nello strato basale della membrana basale dei tubuli seminiferi. VSELS sono state individuate anche nell'ovario di topo, coniglio, pecora e scimmia, sempre dal gruppo coordinato da D. Bhartiya.

Anche il gruppo di Danova-Alt et al. (2012) ha isolato dal sangue cordonale una popolazione cellulare CXCR4⁺ Lin⁻ CD45⁻ negativa però all'espressione dei geni per la pluripotenza. Si pensa che queste cellule siano state erroneamente definite VSELS poiché gli autori non hanno considerato l'analisi di altri parametri caratteristici di questo tipo cellulare, quali la grandezza e il numero totale.

La questione fondamentale riguardante la biologia delle VSELS riguarda il loro possibile ruolo in vivo. La presenza di cellule pluripotenti e quiescenti nei tessuti adulti fa pensare che il ruolo di queste cellule sia cruciale nel riparare i tessuti danneggiati in risposta a danni dovuti a diversi tipi di patologie e/o che possano servire come riserva cellulare o precursori cellulari per le cellule staminali adulte lineage-restricted. Le evidenze ad oggi disponibili riguardo la caratteristica di pluripotenza delle VSELS, suggeriscono che queste cellule possono essere in grado di differenziarsi nei tre foglietti embrionali, ecto-endo-mesoderma non solo in vitro ma anche in vivo sebbene evidenze sperimentali a supporto di questa ultima teoria siano ancora da verificare. Un'altra caratteristica assai importante è che le VSELS mostrano una alta eterogeneità. Infatti, come già sottolineato, solo l'11-41% di VSELS (in dipendenza dell'organo da cui vengono isolate), esprimono Oct4 (Zuba-Surma et al., 2008b) e l'analisi delle librerie geniche ottenute da 20 VSELS, ne rivela tre tipi differenti: embrionali staminali simili, epiblasto simili e Oct4-enriched (Shin et al., 2012). Questo spiega la possibilità che vi siano diverse sottopopolazioni di VSELS con diversi potenziali e che solo una di esse (o magari nessuna) sia in grado di formare le cellule costituenti i tre foglietti embrionali. Sarebbe inoltre interessante capire se le VSELS siano in grado di formare gameti in vivo. Sulla base di studi condotti dal 2012 è emerso che le VSELS sono costituite da una sottopopolazione di cellule che esprimono alti livelli di Stella e Prdm14, geni specifici per la linea germinale (Shin et al., 2012). Presumibilmente, questa popolazione cellulare è più simile alle cellule germinali primordiali (PGCs), rispetto alle VSELS.

Non è ancora chiaro se nei tessuti adulti le VSELS risiedono in una specifica nicchia, quali sono, eventualmente, i tipi cellulari costituenti la nicchia stessa e come la nicchia possa agire nel determinare il differenziamento tissutale. Se si potesse localizzare le VSELS in vivo grazie all'utilizzo di un costrutto formato da un reporter fluorescente associato ad un promotore (e.g. Stella, H2B-GFP or Oct4-H2B-GFP), si potrebbe, ad esempio, identificare la esatta localizzazione di queste cellule nella nicchia del midollo osseo, essendo le VSELS isolate dalla parte centrale del midollo presumibilmente diverse da quella della zona sub endostale (Taichman et al., 2010).

In vitro, il fenotipo quiescente delle VSELs e l'apparente blocco del ciclo cellulare non possono essere superati esponendo le cellule in coltura a fattori di crescita, per questo motivo sono necessarie ulteriori analisi; in vivo, invece, potrebbe essere data dall'esposizione a fattori di inibizione, all'assenza di fattori stimolanti o da entrambi. Sempre in vivo, le VSELs entrano nel ciclo cellulare dopo esposizione, ad esempio, ad irradiazione, suggerendo che, almeno nel midollo osseo, segnali indotti da stress possono indurre la proliferazione delle VSELs. Un altro parametro che rimane da studiare è se questa proliferazione implica realmente un rinnovamento o un differenziamento cellulare poiché la natura dei fattori in grado di indurre entrambi è difficile da valutare sperimentalmente.

Un altro aspetto importante della biologia delle VSELs è capire la loro reale origine. In seguito a determinati livelli di metilazione ed espressione di alcuni specifici geni imprintati, è stato ipotizzato che le VSELs siano collegate alle PGCs e che si formino da una sottopopolazione delle cellule staminali dell'epiblasto. Anche in questo caso, studi di lineage tracing sarebbero necessari per definire l'esatta origine di queste cellule.

Sebbene molte caratteristiche debbano ancora essere svelate, le VSELs rappresentano una alternativa terapeutica all'utilizzo delle ESC in medicina rigenerativa e lo sforzo di tutti i gruppi di ricerca coinvolti nello studio di queste cellule dovrebbe convergere nella stesura di protocolli condivisi per lo svolgimento di trials clinici volti all'impiego delle VSELs nella cura di diverse tipi di patologie.

Bibliografia essenziale

1. Abbot A. Doubt cast over tiny stem cells. *Nature*. 2013; 499: 300.
2. Bhartiya D, Sriraman K, Parte S. Stem Cell Interaction with Somatic Niche May Hold the Key to Fertility Restoration in Cancer Patients. *Obstetrics and Gynecology International*. 2012; e: 921082.
3. Danova-Alt R, Heider A, Egger D, Cross M, Alt R. Very small embryonic like stem cells purified from umbilical cord blood lack stem cells characteristics. *Plos One*. 2012, 7: e34899.
4. Kucia M, Reza R, Campbell FR, Zuba-Surma E, Majka M, Ratajczak J, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4⁺SSEA-1⁺Oct-4⁺stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*. 2006; 20: 857-869.
5. Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M, Moldenhawer S, Zuba-Surma E, et al. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4⁺ SSEA-4⁺ Oct-4⁺ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia*. 2007; 21: 297-303.
6. Ratajczak M, Zuba-Surma E, Wojakowski W, Suszynska M, Mierzejewska K, Liu R, Ratajczak J, Shin DM, Kucia M. Very small embryonic-like stem cells (VSELs) represent a real challenge in stem cell biology: recent pros and cons in the midst of a lively debate. *Leukemia*. 2014; 28: 437-484.
7. Shin DM, Liu R, Wu W, Waigel SJ, Zacharias W, Ratajczak MZ, et al. Global gene expression analysis of very small embryonic-like stem cells reveals that

- the Ezh2- dependent bivalent domain mechanism contributes to their pluripotent state. *Stem Cells Dev.* 2012; 21: 1639-1652.
8. Taichman RS, Wang Z, Shiozawa Y, Jung Y, Song J, Balduino A, et al. Prospective identification and skeletal localization of cells capable of multilineage differentiation in vivo. *Stem Cells Dev.* 2010; 19: 1557-1570.
 9. Wojakowski W, Kucia M, Liu R, Zuba-Surma E, Jadczyk T, Bachowski R, Nabisławek E, Kaźmierski M, Ratajczak M, Tendera M. Circulating Very Small Embryonic-Like Stem Cells in Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011; 4: 138-144.
 10. Zuba-Surma EK, Kucia M, Wu W, Klich I, Lillard JW Jr., Ratajczak J, Ratajczak MZ. Very small embryonic-like stem cells are present in adult murine organs: ImageStream-based morphological analysis and distribution studies. *Cytometry A.* 2008b; 73A: 1116-1127.
 11. Zuba-Surma EK, Klich I, Greco N, Laughlin MJ, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Optimization of isolation and further characterization of umbilical-cord-blood-derived very small embryonic/epiblast-like stem cells (VSELs). *Eur J Haematol.* 2011b; 84: 34-46.

Stem cell aging, clonal hematopoiesis and myelodysplastic syndromes

Mario Cazzola

Department of Hematology Oncology, Fondazione Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) Policlinico San Matteo, and Department of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy

This paper will examine the genetic basis of myelodysplastic syndromes (MDS) and discuss recent advances in our understanding of age-related clonal hematopoiesis, which derives from somatic mutations that occur in hematopoietic stem cells with aging and predisposes to myeloid neoplasm, including MDS.

We have reviewed the genetic basis of MDS and its clinical relevance in *Blood* (1): the reader is therefore referred to this open access review article for more detailed information, while the current article summarizes the crucial points only. As such, this article must be considered an acceptable secondary publication intended to disseminate important information to the widest possible audience, in agreement with the criteria of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE, http://www.icmje.org/publishing_d.html).

Pathophysiology of MDS

Myelodysplastic syndromes are clonal hematopoietic stem cell disorders characterized by cytopenia, myelodysplasia, ineffective hematopoiesis, and increased risk of progression to acute myeloid leukemia (AML) (2). The current diagnostic approach to MDS includes peripheral blood and bone marrow morphology to evaluate abnormalities of peripheral blood cells and hematopoietic precursors, bone marrow biopsy to assess marrow cellularity, fibrosis and topography, and cytogenetics to identify non-random chromosomal abnormalities (3). Based on these parameters, MDS are currently categorized according the 2008 World Health Organization (WHO) (2, 4).

Our working model of the pathophysiology of MDS is reported in Figure 1. As demonstrated by Walter et al. (5) through studies of whole genome sequencing, the vast majority of myeloid precursors (i.e., immature red cells, granulocytic/monocytic precursors, and megakaryocytes) are clonally derived in MDS. The myelodysplastic clone originates from the occurrence in an immature hematopoietic stem cell of a somatic mutation that provides survival and growth advantage: typically this founding mutation involves genes of RNA splicing or DNA methylation (1). During the natural course of the disease, the acquisition of additional driver mutations leads to formation of subclones of hematopoietic cells with fur-

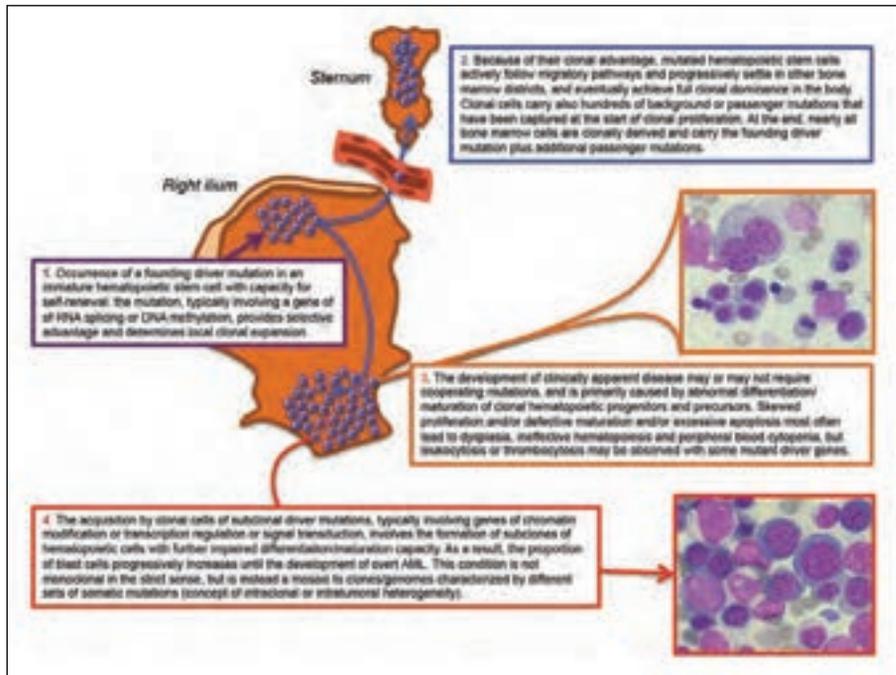


Fig. 1 - Schematic representation of our current understanding of the pathophysiology of myelodysplastic syndromes. In this example, the founding driver mutation is assumed to occur in a hematopoietic cell located in the bone marrow of the right ilium, and the sternum is shown to illustrate the concept of mutated stem cell migration through peripheral blood. Reproduced from Cazzola et al. (1).

ther impaired differentiation and/or maturation capacity: the proportion of blast cells progressively increases over time, and overt AML eventually develops.

Recurrent chromosomal abnormalities and somatic gene mutations in MDS

Recurrent chromosomal abnormalities are detected in about half of patients with MDS (6), and the most common aberrations include del(5q), trisomy 8, del(20q), and monosomy 7 or del(7q) (6-8). While most of these abnormalities are secondary genetic events, the isolated del(5q) of the 5q- syndrome represents a founding event, involving haploinsufficiency for *RPS14* and miR-145 (9-11).

Our understanding of the molecular basis of MDS has improved dramatically in the last 5 years as a result of a few fundamental studies (12-20). A list of the most common recurrently mutated genes in patients with MDS or myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm (MDS/MPN) is reported in Table 1. Somatic gene mutations are found in the vast majority of MDS patients but only 6 genes (*TET2*, *SF3B1*, *ASXL1*, *SRSF2*, *DNMT3A*, and *RUNX1*) are consistently mutated in 10% or more MDS patients. The driver genes whose mutations are responsible for MDS are frequently mutated also in other myeloid neoplasms, including AML and myeloproliferative neoplasms.

Tabella 1 - Recurrently mutated driver genes in patients with myelodysplastic syndrome or myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm*.

Biological pathways & genes	Clinical relevance of mutant gene including prognosis
<i>RNA splicing</i>	
<i>SF3B1</i>	Strictly associated with ring sideroblasts phenotype, associated with good overall survival and low risk of leukemic evolution
<i>SRSF2</i>	Mainly found in MDS subtypes characterized by multilineage dysplasia and/or excess blasts, co-mutated with <i>TET2</i> in chronic myelomonocytic leukemia, associated with poor overall survival and high risk of leukemic evolution
<i>U2AF1</i>	Mainly found in MDS subtypes characterized by multilineage dysplasia and/or excess blasts, associated with high risk of leukemic evolution
<i>DNA methylation</i>	
<i>TET2</i>	Found in all MDS subtypes, high mutation frequency (50-60%) in chronic myelomonocytic leukemia, may predict response to hypomethylating agents
<i>DNMT3A</i>	Found in all MDS subtypes, co-mutated with <i>SF3B1</i> in refractory anemia with ring sideroblasts, associated with unfavorable clinical outcome
<i>Histone modification</i>	
<i>ASXL1</i>	Mainly found in MDS subtypes characterized by multilineage dysplasia and/or excess blasts, high mutation frequency (40%) in chronic myelomonocytic leukemia, associated with unfavorable clinical outcome in all myeloid neoplasms
<i>EZH2</i>	Mainly found in MDS subtypes characterized by multilineage dysplasia and/or excess blasts, associated with unfavorable clinical outcome in all myeloid neoplasms
<i>Transcription</i>	
<i>RUNX1</i>	Mainly found in MDS subtypes characterized by multilineage dysplasia and/or excess blasts, associated with unfavorable clinical outcome
<i>BCOR</i>	Associated with poor prognosis
<i>DNA repair control</i>	
<i>TP53</i>	Associated with advanced disease and complex karyotype, mutated in 20% of patients with MDS with del(5q), involves poor overall survival and high risk of leukemic evolution, may predict poor response to lenalidomide in MDS with del(5q)
<i>Cohesin</i>	
<i>STAG2</i>	Mainly found in MDS subtypes characterized by multilineage dysplasia and/or excess blasts, mutated in about 10% of patients with AML
<i>RAS pathway</i>	

<i>CBL</i>	Found in different MDS subtypes, associated with juvenile myelomonocytic leukemia in children
<i>NRAS/KRAS</i>	Found in different MDS subtypes, associated with juvenile myelomonocytic leukemia in children
<i>DNA replication</i>	
<i>SETBP1</i>	Found in 25% of patients with atypical chronic myeloid leukemia and in subsets of patients with advanced MDS or chronic myelomonocytic leukemia, associated with poor overall survival and high risk of leukemic evolution
<i>Receptors</i>	
<i>CSF3R</i>	Strictly associated with chronic neutrophilic leukemia, found in a subset of patients with aCML

*Information is from Cazzola et al. (1).

Genotype/phenotype relationships have been defined (1). In particular, *SF3B1* mutation appears to be strictly associated with refractory anemia with ring sideroblasts with or without marked thrombocytosis (16, 21, 22), the combination of *SRSF2* and *TET2* mutation with chronic myelomonocytic leukemia (22, 23), and activating *CSF3R* mutation with chronic neutrophilic leukemia (19).

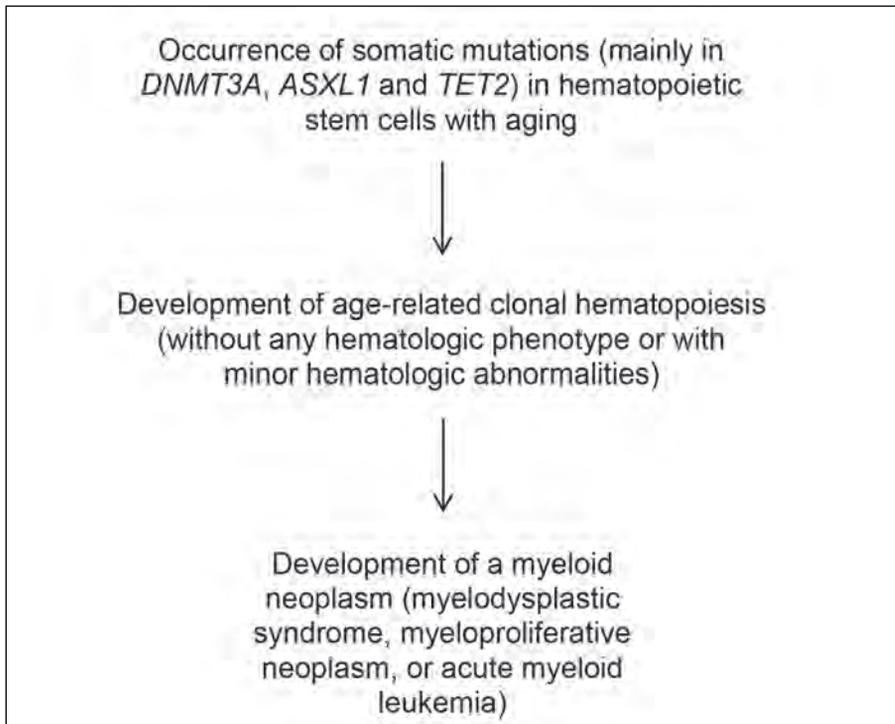


Fig. 2 - Relationship between age-related clonal hematopoiesis and development of a myeloid neoplasm.

Age-related clonal hematopoiesis and the emergence of neoplastic blood-cell clones with aging

Recent studies suggest that the development of MDS reflects the occurrence of somatic mutations in hematopoietic stem cells with aging.

Xie et al. (24) studied 2,728 individuals from the Cancer Genome Atlas (patients with solid tumors) and discovered 77 blood-specific mutations in genes known to be associated hematologic malignancies. Somatic mutations we associated with advanced age, and most of them were from genes known to be mutated in myeloid neoplasms (*DNMT3A*, *TET2*, *JAK2*, *ASXL1*, *TP53*, *BCORL1* and *SF3B1*).

Similar observations have been recently reported in 2 articles in the *New England Journal of Medicine*. Genovese et al. (25) analyzed whole-exome sequencing data from DNA in the peripheral-blood cells of 12,380 persons who were unselected for hematologic phenotypes. They detected clonal hematopoiesis with somatic mutations in 10% of persons older than 65 years of age. Clonal expansions most frequently involved somatic mutations in three genes (*DNMT3A*, *ASXL1* and *TET2*) that are typically mutated in MDS and other myeloid neoplasms, and clonal hematopoiesis represented a strong risk factor for subsequent hematologic malignancies. Jaiswal et al. (26) analyzed whole-exome sequencing data from DNA in the peripheral-blood cells of 17,182 persons and looked for somatic mutations in 160 genes that are recurrently mutated in hematologic malignancies. Detectable somatic mutations rose in frequency with age, and the majority of the variants occurred in *DNMT3A*, *TET2*, and *ASXL1*. Again, the presence of a somatic mutation was associated with an increase in the risk of hematologic malignancy. In conclusion, as schematically represented in Figure 2, normal aging confers a predisposition to development of age-related clonal hematopoiesis, and this latter in turn involves a high risk of development of MDS or other myeloid neoplasms (27).

Bibliografia

1. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood*. 2013; 122: 4021-4034.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC. 2008.
3. Cazzola M, Malcovati L. Prognostic classification and risk assessment in myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010; 24: 459-468.
4. Della Porta MG, Travaglino E, Boveri E, et al. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2015; 29: 66-75.
5. Walter MJ, Shen D, Ding L, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012; 366: 1090-1098.
6. Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007; 110: 4385-4395.

7. Schanz J, Steidl C, Fonatsch C, et al. Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 1963-1970.
8. Schanz J, Tuchler H, Sole F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol.* 2012; 30: 820-829.
9. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature.* 2008; 451: 335-339.
10. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med.* 2010; 16: 49-58.
11. Barlow JL, Drynan LF, Hewett DR, et al. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med.* 2010; 16: 59-66.
12. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med.* 2009; 360: 2289-2301.
13. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* 2009; 41: 838-842.
14. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2011; 364: 2496-2506.
15. Yoshida K, Sanada M, Shiraiishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature.* 2011; 478: 64-69.
16. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med.* 2011; 365: 1384-1395.
17. Graubert TA, Shen D, Ding L, et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* 2012; 44: 53-57.
18. Piazza R, Valletta S, Winkelmann N, et al. Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Nat Genet.* 2013; 45: 18-24.
19. Maxson JE, Gotlib J, Pollyea DA, et al. Oncogenic CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia and atypical CML. *N Engl J Med.* 2013; 368: 1781-1790.
20. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2013.
21. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2011; 118: 6239-6246.
22. Malcovati L, Papaemmanuil E, Ambaglio I, et al. Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. *Blood.* 2014; 124: 1513-1521.
23. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013; 122: 3616-3627.
24. Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med.* 2014; 20: 1472-1478.

25. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014; 371: 2477-2487.
26. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014; 371: 2488-2498.
27. Abkowitz JL. Clone wars - the emergence of neoplastic blood-cell clones with aging. *N Engl J Med.* 2014; 371: 2523-2525.

Riprogrammazione genetica: proprietà delle singole cellule

Manuela Monti

Centro Ricerche di Medicina Rigenerativa, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Una delle più promettenti linee di ricerca sulla riprogrammazione genetica delle cellule è quella della diretta conversione di un tipo cellulare in un altro tipo, conversione ottenuta grazie alla espressione forzata di specifici fattori di trascrizione in dipendenza del tipo cellulare desiderato (Hanna et al., 2010).

Il primo esempio di conversione di identità cellulare diretta senza passare da uno stato di pluripotenza staminale è stato quello ottenuto nel 1989 da Harold Weintraub con la scoperta del fattore “miogenico” MyoD identificato nel corso di esperimenti sullo sviluppo del muscolo. Il solo MyoD è in grado di riprogrammare tutta una serie di diversi tipi di linee cellulari in cellule multinucleate muscolari, in miotubi. Dal tempo dell’esperimento di Weintraub i ricercatori sono riusciti ad ottenere altre conversioni dirette trasformando, ad esempio, cellule del pancreas esocrino in cellule endocrine o epatociti; linfociti B in macrofagi; fibroblasti in neuroni, cardiomiociti, epatociti. Oggi sappiamo che i fattori di trascrizione impiegati per ottenere queste conversioni dirette non solo “accendono” specifici gruppi di geni ma nel contempo ne “spengono” altri così da ottenere un nuovo e stabile repertorio di geni attivi e silenti.

Queste conversioni dirette sono di grande interesse per la medicina poiché permetterebbero di trattare tante patologie, si pensi ad esempio alla possibilità di trattare il diabete (guarendo i pazienti, non solo alleviando i sintomi come si può fare oggi con la somministrazione dell’insulina, che non cura il diabete, lo controlla), convertendo delle cellule esocrine del pancreas in cellule endocrine capaci di produrre insulina. Il trapianto di insule pancreatiche è oggi una realtà di successo ma purtroppo il numero di donatori è molto limitato rispetto al bisogno clinico: la produzione di cellule B potrebbe risolvere questa drammatica situazione e se la conversione diretta riguardasse le stesse cellule del paziente si potrebbero evitare tutte le problematiche relative al rigetto immunitario delle cellule trapiantate. La relativa facilità di ottenere cellule pancreatiche da cellule del fegato o quella di ottenere cardiomiociti da fibroblasti cardiaci induce a ritenere che la comune origine embriologica dei tessuti possa essere un elemento di facilitazione per

Correspondence: Mario Cazzola, MD, Department of Hematology Oncology, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, 27100 Pavia, Italy - E-mail: mario.cazzola@unipv.it

la riprogrammazione genetica o, detto in altri termini, più i tessuti sono lontani embriologicamente nella loro derivazione dai tre foglietti embrionali e più difficile sarà ottenere riprogrammazione genetica tra di loro. Comunque sia, i recenti successi nell'ottenere riprogrammazioni dirette mettono in chiaro che è possibile superare qualunque barriera di derivazione embriologica fatto salvo che vengano impiegati fattori di trascrizione sufficientemente "potenti" o in alti dosaggi. È di rilievo capire che la riprogrammazione non rappresenta semplicemente una accensione di un certo repertorio di geni da parte dei fattori di trascrizione introdotti. I fattori di trascrizione impiegati hanno di norma un certo numero di geni (che presiedono allo specifico stato differenziato che si vuole ottenere grazie alla riprogrammazione) bersaglio, ma quei geni si esprimono sino al momento in cui i fattori di trascrizione sono presenti; una volta persi, il fenotipo cellulare riprogrammato reverte a quello originario.

Una reale e robusta riprogrammazione prevede l'acquisizione di uno stato irreversibile del nuovo fenotipo, capace di persistere a dispetto della perdita dei fattori di trascrizione che hanno provocato la riprogrammazione. Nel caso delle iPS (induced Pluripotent Stem cells) non vi è dubbio che la riprogrammazione è robusta ed efficace: se ne ha infatti la prova dal fatto che queste cellule sono capaci di crescere in coltura in modo illimitato ed il loro fenotipo è stabile nel tempo. Con la riprogrammazione diretta risulta invece più difficile assicurarsi che la espressione dei geni riprogrammati si mantenga permanente; è bene ricordare però che, sebbene raramente, *in vivo* accadono eventi di trasformazione cellulare (si pensi alla trasformazione neoplastica) e dunque la abilità nel riprodurre artificialmente questi eventi offre un potente mezzo per pensare nuove strategie terapeutiche.

Uno dei più promettenti campi di ricerca della funzione staminalità è quello rivolto a identificare le molecole che nel citoplasma dell'oocita assicurano la riprogrammazione genetica dei nuclei terminalmente differenziati: in altre parole un promettente campo di ricerca è la dissezione molecolare del citoplasto animale. I risultati di queste ricerche saranno capaci di avanzare le nostre conoscenze sulle primissime fasi di sviluppo embrionale (transizione materno - zigote e zigote - morula) e di assicurare tecniche per la produzione di cellule embrionali staminali (ES) senza incorrere nelle problematiche di tipo etico - normativo - proibitive. Questa previsione deriva da alcuni lavori pubblicati in questi ultimi anni. E dunque è ancora una volta necessario procedere lungo l'asse temporale e riprendere la riflessione dalla produzione di cellule staminali paziente-specifiche grazie alla tecnica della clonazione terapeutica: esattamente la stessa tecnica di trasferimento di nuclei alla base della clonazione riproduttiva con la sola differenza che lo sviluppo dell'embrione ricostituito viene bloccato nelle fasi preimpianto per poter derivare cellule staminali paziente-specifiche. Questa proposizione teorica è oggi vicina al raggiungimento del traguardo paradossalmente proprio quando è ragionevole ritenere che sarà ben presto superata. L'ottenere cellule staminali paziente-specifiche pare infatti ben più agevole, e privo di implicazioni etiche, seguendo due linee di ricerca che portano al medesimo risultato. L'una si declina nel tentativo di trovare citoplasti naturali di specie ad alta produzione di oociti (coniglio, mucca, maiale e altri animali da macello) o citoplasti artificiali e sintetizzati a

partire dalle conoscenze su quelli naturali, citoplasti basati sull'utilizzo di singole molecole capaci di revertire il programma genetico. L'altra linea si identifica con la possibilità di trasferire cellule somatiche con quei pochissimi fattori che sappiamo sostenere la pluripotenza delle cellule staminali.

Per quello che riguarda l'impiego dei citoplasti naturali è di interesse ricordare quanto già scritto nel rapporto Dulbecco (28 dicembre 2000, ministero della Sanità): *Relazione della Commissione di Studio sull'utilizzo di Cellule Staminali per Finalità Terapeutiche*.

Nell'esaminare le tecniche di derivazione di cellule ES autologhe assumiamo quale scopo finale esclusivo quello di sviluppare metodologie per l'ottenimento di cellule per il trattamento di pazienti. In breve, si tratta di riprogrammare il nucleo di cellule somatiche prelevate dal paziente, tramite il contatto con il citoplasma di un oocita. Nella pubblicistica contemporanea questa procedura è stata chiamata clonazione terapeutica, un termine, di fatto, chiaramente opinabile. Infatti, un oocita ricostituito con il nucleo di una cellula somatica adulta non può considerarsi uno zigote in senso classico, in quanto non deriva dall'unione di due gameti. A riprova di ciò sta il fatto che l'oocita così ricostituito non dà spontaneamente luogo allo sviluppo embrionale, poiché ciò può avvenire solo grazie a stimolazioni artificiali che lo forzano a svilupparsi in blastocisti. Solo poche tra queste blastocisti hanno l'effettiva capacità di formare un embrione e quindi un feto se trasferite in utero. Si noti che l'oocita ricostituito può, invece, essere indotto a proliferare ed incanalarsi verso la formazione delle sfere embrioidi (non di blastocisti) la cui differenziazione può essere indirizzata verso specifici stadi cellulari. Quindi, in ultima analisi, l'oocita ricostituito con il nucleo di una cellula somatica del paziente è assai più simile ad una potenziale forma di espansione cellulare (per via asessuata) del paziente stesso, analoga a quella già oggi praticata quando prelievi biotici di derma vengono amplificati per la produzione di "cute artificiale", tecnica preziosa nella terapia dei grandi ustionati. Infatti, il processo per cui il nucleo di una cellula somatica, trovandosi nel citoplasma dell'oocita, riacquista le capacità di cellula staminale non è molto dissimile da quelli che si attuano quando cellule normalmente quiescenti prelevate dal corpo di un paziente adulto vengono indotte a proliferare *in vitro* stimolandole con "fattori di crescita". È perciò prevedibile ed auspicabile che la attuale dipendenza dagli oociti di donna possa venire rimpiazzata da tecniche che prevedono l'impiego di estratti citoplasmatici di altre specie animali, o citoplasti prodotti artificialmente, così da poter effettuare in provetta la riprogrammazione genetica dei nuclei delle cellule somatiche. Prevenendo possibili pressioni sulla salute della donna (come ricordato dal recente documento europeo *Ethical Aspects of Human Stem Cell Research and Use*), tale approccio risulta particolarmente interessante.

Purtroppo le auspiccate ricerche sui citoplasti non sono mai state finanziate.

La rimozione della memoria epigenetica al fine di ottenere riprogrammazioni genetiche in modo altamente efficiente è il campo di intense ricerche. Diverse sono le strategie impiegate, dall'analisi comparata della costituzione del citoplasma di oociti di diverse specie (Byrne, Awe, 2013) alla ricerca di fattori oocitari candidati alla riprogrammazione (CORF, *Candidate Oocyte Reprogramming Factors*) sino

all'uso di piccole molecole proteiche (per una review, Federation et al., 2014). Di recente il "padre" di *Oct4*, Hans Schöler (Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Münster, Germania) con il gruppo di Shoukhrat Mitalipov (Division of Reproductive and Developmental Sciences, Oregon National Primate Research Center, Oregon Health & Science University, Beaverton, Oregon, usa) ha dimostrato che i citoplasti degli embrioni a due cellule nella fase di interfase mitotica si comportano come un potente riprogrammatore genetico (Kang et al., 2014). In accordo con la letteratura scientifica già ricordata (Chan et al., 2012; Yan et al., 2013) questi fattori materni citoplasmatici sono ancora poco conosciuti e probabilmente si eclissano poco dopo la fecondazione nella transizione 2-4, 4-8 blastomeri. Inoltre debbono essere assai labili poiché risulta di particolare rilievo per innalzare l'efficienza dei successi di riprogrammazione genetica il portare in registro il nucleo della cellula donatrice ed il citoplasma della cellula ricevente il nucleo, in altre parole debbono trovarsi nella medesima fase del ciclo cellulare, debbono essere nucleo (del donatore) e citoplasma (del ricevente) sincronizzati per le fasi del ciclo cellulare.

La concezione classica dello sviluppo embrionale viene rappresentata come una progressiva restrizione del destino differenziativo della cellula, da una condizione di totipotenza, qual è quella dello zigote, ad una situazione altamente specializzata e differenziata dei tessuti dell'organismo adulto. Le cellule staminali delle prime fasi dello sviluppo sono considerate pluripotenti, in grado cioè di dare origine ai tre foglietti embrionali, mentre le cellule staminali di tessuti specifici delle fasi terminali dello sviluppo o dell'individuo adulto (cellule staminali unipotenti) sono considerate ristrette nelle loro potenzialità differenziative in dipendenza del tessuto da cui sono state isolate. Questo paradigma è stato recentemente messo in discussione da almeno tre linee di evidenze:

1. la scoperta che alcune cellule staminali adulte possono differenziarsi in altri tipi cellulari, se esposte alle condizioni ambientali appropriate (Jopling et al., 2011; si legga in particolare questo lavoro per il chiaro inquadramento concettuale dei concetti di dedifferenziazione, transdifferenziazione e riprogrammazione genetica);
2. esperimenti di trasferimento nucleare hanno dimostrato che il genoma di nuclei di cellule somatiche terminalmente differenziate può essere geneticamente riprogrammato quando trasferito all'interno di cellule uovo enucleate: il trasferimento nucleare può essere ottenuto per fusione della cellula somatica con quella uovo, come nel caso di Dolly (Wilmut et al., 1997) o per chirurgia cellulare grazie a sottilissimi aghi, come nel caso di Cumulina (Wakayama et al., 1998). Il processo di riprogrammazione genetica è tale per cui all'interno dell'ooplasma il genoma riacquista la totipotenzialità dello zigote;
3. eleganti esperimenti hanno dimostrato la capacità di ibridi cellulari (Tada et al., 2001) e di estratti cellulari isolati da cellule somatiche di diversa natura (Hakelien, Collas, 2002) di riprogrammare l'espressione genica di altri tipi di cellule somatiche o dei loro nuclei isolati. Quando linfociti di timo sono stati fusi con cellule embrionali germinali (staminali eg) o con ES, i nuclei di questi hanno acquisito proprietà di tipo pluripotente staminale, con la riattivazione di

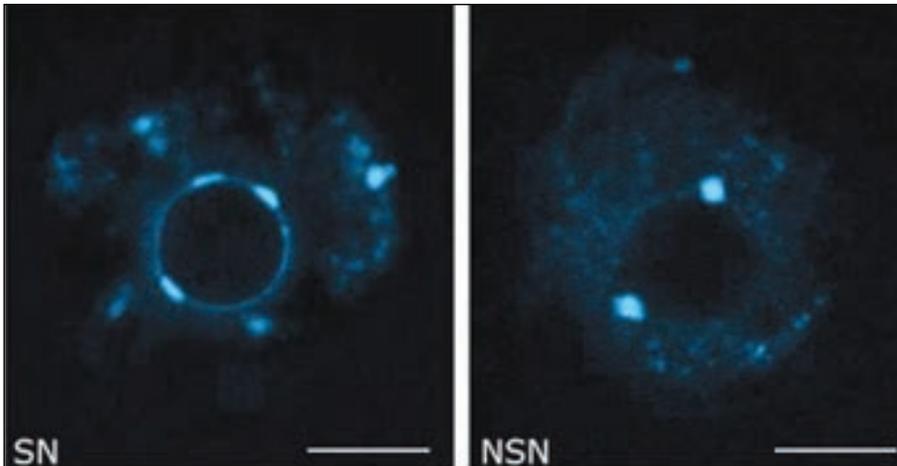


Fig. 1 - Nucleolo di oocita SN e oocita NSN colorato con fluorocromo Hoechst 33342. Barra: 10 μ m.

un transgene represso (il transgene Oct4 specifico delle cellule ES; Tada et al., 2001).

In altri esperimenti, cellule somatiche (o i loro nuclei isolati) in coltura sono state esposte all'azione di estratti cellulari di altre cellule somatiche con il risultato che all'interno delle cellule trattate è stato messo in evidenza l'assorbimento di fattori di trascrizione, un successivo aumento dell'attività trascrizionale e l'espressione di geni specifici delle cellule da cui sono stati preparati gli estratti cellulari. Il livello di espressione dei geni regolatori è risultato inalterato, ad indicare che i cambiamenti dello stato trascrizionale sono dipesi dal processo di riprogrammazione (Hakelien, Collas, 2002). Ad oggi sono ancora sconosciuti i meccanismi e le molecole coinvolte nei processi di riprogrammazione nucleare e cellulare.

Un aiuto alla loro comprensione potrebbe venire dal confronto tra l'attività di riprogrammazione di estratti cellulari ottenuti da oociti competenti o non competenti allo sviluppo embrionale. Studi recenti hanno evidenziato la presenza nel compartimento antrale dell'ovario di topo di due tipi di oociti riconoscibili per una diversa organizzazione della cromatina. Un oocita che presenta un anello di cromatina positiva al fluorocromo Hoechst 33342 attorno al nucleolo (denominato Surrounded Nucleolus - oocita SN) ed una cromatina filiforme e fortemente compatta; ed un altro tipo di oocita con cromatina finemente dispersa e senza un anello attorno al nucleolo (Not Surrounded Nucleolus - oocita NSN; Mattson, Albertini, 1990). La differenza morfologica di questi due oociti ha un significato biologico in quanto solo l'oocita SN è in grado di sostenere lo sviluppo embrionale *in vitro* fino allo stadio di blastocisti, mentre l'oocita NSN si ferma allo stadio di 2 cellule (Monti et al., 2013: Fig. 1).

Lo studio degli eventi citologici e molecolari che, ci si attende, possano avvenire in cellule somatiche coltivate in presenza di estratti cellulari isolati da oociti SN o NSN, permetterebbe la messa a punto di un sistema *in vitro* in grado, attraverso la comparazione, di identificare i tempi, le modalità ed i meccanismi coinvolti nel

processo di riprogrammazione cellulare. Per poter attuare con successo una simile analisi comparativa è necessario studiare in dettaglio i meccanismi molecolari in grado di regolare l'espressione del genoma di mammifero e che oggi conosciamo per grande approssimazione.

La rilevanza dello studio della riprogrammazione genetica di cellule somatiche è testimoniata dal continuo interesse che la comunità scientifica dedica a questo tema: di estremo aggiornamento è il sito dedicato dalla famiglia delle riviste "Nature" al tema (www.nature.com/nature/focus/reprogramming).

Bibliografia

1. Byrne A, Awe J. Identifying candidate oocyte reprogramming factors using cross-species global transcriptional analysis. *Cellular Reprogramming*. 2013; 15: 126-133.
2. Chan M, Guerry A, Balvanera P, et al. Mouse ooplasm confers context-specific reprogramming capacity. *Nature Genetics*. 2012; 44: 978-980.
3. Federation A, Bradner J, Meissner A. The use of small molecules in somatic-cell reprogramming. *Trends in Cell Biology*. 2014; 24: 179-187.
4. Hakelien A, Collas P. Novel approaches to transdifferentiation. *Cloning Stem Cells*. 2002; 4: 379-387.
5. Hanna J, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*. 2010; 143: 508-525.
6. Jopling C, Boue S, Izpisua Belmonte J. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12: 79-89.
7. Kang E, Wu G, Ma H, Li Y et al. Nuclear reprogramming by interphase cytoplasm of two-cell mouse embryos. *Nature*. 2014; 10.1038/nature13134.
8. Mattson B, Albertini D. Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Molecular Reproduction and Development*. 1990; 25: 374-383.
9. Monti M, Zanoni M, Calligaro A, et al. Developmental arrest and mouse antral not-surrounded Nucleolus Oocytes. *Biology of Reproduction*. 2013; 88: 1-7.
10. Tada M, Takahama Y, Abe K, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology*. 2001; 11: 1553-1558.
11. Wakayama T, Perry A, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*. 1998; 394: 369-374.
12. Weintraub H, Tapscott S, Davis R, et al. Activation of Muscle-Specific Genes in Pigment, Nerve, Fat, Liver, and Fibroblast Cell-Lines by Forced Expression of MyoD. *PNA*. 1989; 86: 5434-5438.
13. Wilmut I, Schnieke A, McWhir J, Kind A, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 385: 810-813.
14. Yan I, Yang M, Guo H. Single-cell RNA-seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nature Structural Molecular Biology*. 2013; 20: 1131-1139.

Selezione immunomagnetica del graft: nuove prospettive in oncoematologia

Claudia Del Fante

Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Aferesi Terapeutica e Produttiva,
Laboratorio di Manipolazione Cellulare, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Razionale del trapianto aploidentico

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatori HLA compatibili è curativo nella maggioranza di pazienti con malattie onco-ematologiche o ereditarie come le emoglobinopatie e le sindromi da insufficienza midollare.

Un donatore HLA identico familiare è disponibile per circa il 30% dei pazienti. Per quei pazienti per cui non è disponibile la possibilità di identificare un donatore volontario HLA compatibile tipizzato per i loci HLA-A, -B, -C e DRB1 è specifico per etnia: rappresenta circa il 79% per i pazienti Europei di etnia Caucasica e circa il 20-50% per le rimanenti. Qualora, poi, un donatore volontario non familiare (MUD) sia identificato, la possibilità di eseguire il trapianto è di circa il 50%, prevalentemente a causa della progressione di malattia durante il lungo processo di ricerca. Infine, poichè la differenza etnica è in incremento nei paesi occidentali, si impone una strategia che permetta di identificare una fonte alternativa di cellule staminali qualora un donatore MUD non sia disponibile.

La possibilità di eseguire il trapianto per questo nutrito gruppo di pazienti è legato tre fonti alternative: donatori familiari aploidentici, (mismatch completo di 3/6 o 4/8 antigeni HLA), sangue placentare da banca o ai donatori volontari HLA mismatch per almeno un antigene o allele. L'impiego di tecniche di tipizzazione HLA ad alta risoluzione ha consentito di evidenziare che non tutti i mismatch HLA sono uguali, poichè esistono mismatch allelici "permissivi" o "non permissivi" che, influenzano la capacità dei linfociti T a riconoscere le differenze nelle sequenze HLA, rendendo conto dei differenti andamenti del trapianto in presenza di graft apparentemente simili. I donatori familiari aploidentici sono facilmente contattabili consentendo di eseguire velocemente il trapianto e di richiamare il donatore se necessità di terapia cellulare post trapianto. Inoltre i costi legati alla raccolta di cellule staminali sono generalmente contenuti. Il maggior svantaggio nella scelta del donatore aploidentico è la disparità HLA. I vantaggi del sangue placentare sono rappresentati da: pronta disponibilità, relativo basso rischio di GvHD legato al basso numero di linfociti T contenuti nel graft, minor rischio di recidiva. Gli svantaggi sono legati ai costi elevati di ciascuna unità per recuperare

i costi di tipizzazione e criopreservazione, al relativamente basso contenuto in cellule staminali condizionante un rischio più elevato di mancato attecchimento rispetto alle altre fonti, il lento recupero immunologico post trapianto che contribuisce all'aumento del rischio infettivo ed alla più elevata mortalità ed infine l'impossibilità a richiamare il donatore. Per tali motivi negli ultimi anni l'impiego del sangue placentare per le procedure trapiantologiche è diminuito.

Le cellule staminali emopoietiche da sangue periferico (PBSC) raccolte mediante leucaferesi dopo opportuna stimolazione del donatore con fattore di crescita granulocitario rappresentano attualmente la fonte preferita per il trapianto per la facilità di raccolta (procedura leucaferetica vs espianto di midollo osseo), il più elevato numero di cellule staminali CD34+, il più veloce attecchimento e, nel caso di trapianti da donatore familiare, la maggior sopravvivenza a breve e lungo termine. Tuttavia, l'incidenza di graft versus host disease (GvHD) acuta e cronica post trapianto è maggiore rispetto ai pazienti trapiantati con midollo osseo a causa del contenuto mediamente 5-10 volte superiore, di linfociti T CD3+. Inoltre il maggior contenuto di linfociti B CD19+ aumenta il rischio di patologia linfoproliferativa associata a virus di Epstein Barr. Nel caso di trapianti aploidentici, l'elevata quantità di linfociti presenti nel graft compatibile solo a metà con il ricevente, impone la manipolazione delle cellule per permetterne l'attecchimento e limitare l'insorgenza di GvHD. A partire dagli anni ottanta si sono sviluppati programmi di trapianto aploidentico con manipolazione *ex vivo* (selezione immunomagnetica) o *in vivo* (trapianti T repleti mediante somministrazione di anticorpi monoclonali e immunosoppressori) del graft con l'intento di ridurre drasticamente il numero di linfociti T. La manipolazione *ex vivo* del graft necessita di personale specializzato, non consente la riproducibilità delle procedure (ogni raccolta di PBSC è peculiare) e spesso è legata a problemi di ricostituzione immunologica.

Manipolazione *ex vivo* del graft

Immunoselezione positiva

I primi tentativi di trapianto aploidentico non manipolato risalgono agli anni '80 e furono gravati da un'elevata incidenza di GvHD di grado severo. Successivamente si modificò il regime di condizionamento con nuovi farmaci mieloablativi ed anticorpi monoclonali anti linfociti T (ATG) per limitare la risposta del sistema immunitario residuo dell'ospite. Inoltre si adottarono metodi di deplezione estensiva dei linfociti T dal graft mediante tecniche di rosettazione con anticorpi monoclonali. I trapianti estensivamente T depleti furono però gravati da un'elevata incidenza di rigetto. Per limitare il rigetto, superando la barriera HLA ed eludendo la residua attività dei linfociti T citotossici del ricevente contro il donatore, all'inizio degli anni 90' il gruppo di Perugia introdusse l'infusione di un'elevata dose di cellule staminali CD34+ (*stem cell megadose*) ottenute dopo immunoselezione positiva di cellule staminali emopoietiche ed estensiva T deplezione nel tentativo di ridurre il rischio di mancato attecchimento/rigetto. La media di cellule infuse era di $13.8 \times 10^6/\text{kg}$. Il regime di condizionamento mieloablativo al trapianto non era seguito da immunosoppressione post trapianto.

L'immunoselezione positiva si basa sull'impiego di anticorpi anti-CD34 legati a biglie di ferrodestrano che, dopo il legame alle cellule esprimenti l'antigene CD34+ vengono catturati da un magnete e deviati in una sacca. In tal modo si ottiene un prodotto estremamente puro (>95%) in cellule staminali e si depletano estensivamente i linfociti T (mediamente 3-4 log) e moderatamente i linfociti B (mediamente 2-3 log). (Fig. 1). Le PBSC sono ritenute la miglior fonte di cellule staminali per l'immunoselezione poichè, considerando una perdita media pari a circa il 50% durante la manipolazione, si può programmare adeguatamente la procedura di aferesi assicurando un elevato carico di cellule infuse ed allo stesso tempo, la deplezione dei linfociti T.

Il protocollo di Perugia evidenziò come l'attecchimento fosse promosso dall'elevato numero di cellule staminali CD34+, in grado di sopprimere i precursori dei linfociti T citotossici diretti contro i propri antigeni (effetto veto). Inoltre, un'importante effetto anti-leucemia (graft versus leukemia-GvL) in assenza di GvHD veniva indotto dalla generazione di cellule Natural Killer (NK) alloreattive del donatore verso il ricevente. Le cellule NK umane, differenti rispetto ad altre specie, rappresentano circa il 10% dei linfociti circolanti e sono regolate dai recettori inibitori chiamati "killer cells immunoglobulin like receptors" (KIRs) i quali riconoscono i gruppi allelici HLA di classe I (KIR ligands). Solo le cellule NK che esprimono i KIRs inibitori per i ligandi HLA propri diventano funzionali. I ligandi sono espressi o amplificati in tessuti di differenti istotipi solo in presenza di stress cellulare, trasformazione tumorale o infezione virale. Questo spiegherebbe perchè le cellule NK sono incapaci di attaccare i tessuti normali. Quando le cellule NK

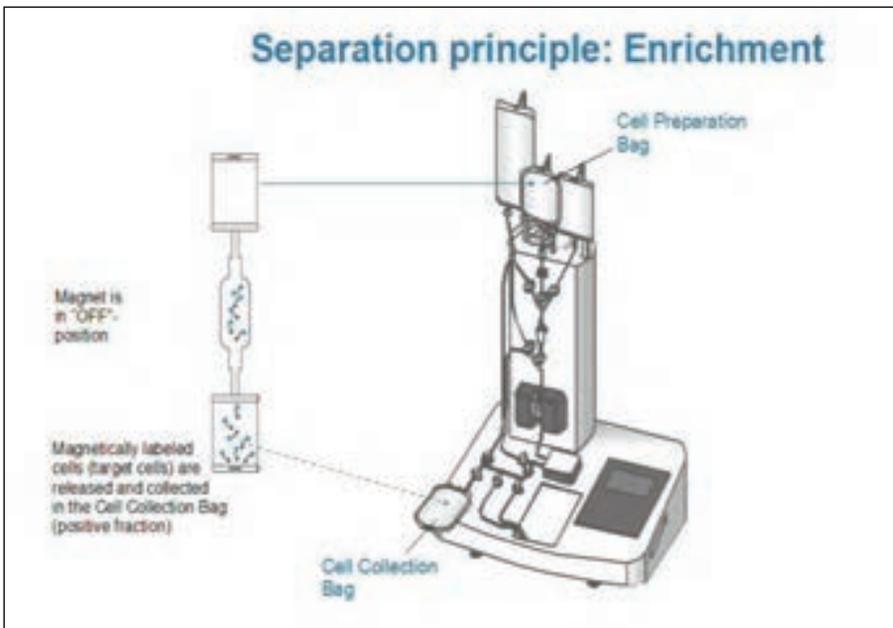


Fig. 1 - Immunoselezione CD34+.

del donatore sono presenti nel contesto di un trapianto aploidentico, “avvertono” la mancata espressione del ligando KIR e mediano l’alloreattività (mancanza del riconoscimento del self). La scelta del donatore NK alloreattivo (potenzialmente disponibile per circa il 50% dei pazienti) ha dimostrato di ridurre significativamente il rischio di recidiva (3% vs 47%) in pazienti affetti da leucemia acuta mieloide (LAM) adulti e pediatrici. Simili risultati sono stati ottenuti nei pazienti pediatrici affetti da leucemia linfatica acuta (LLA) ma non negli adulti. Nonostante gli incoraggianti risultati del protocollo Perugia in termini di riduzione di GvHD acuta e cronica (rispettivamente 8% e 3%) e di mancato attecchimento (circa 9%), i limiti di tale approccio sono rappresentati dalla tardiva ricostituzione immunologica condizionante l’elevata suscettibilità ad infezioni virali e fungine e l’incidenza di recidiva (>30%) in pazienti affetti da LLA ad alto rischio o LAM trapiantati da donatore non NK alloreattivo. Infine, l’immunoselezione positiva è associata alla rimozione di cellule accessorie che influenzano positivamente l’andamento del trapianto (monociti, cellule NK, cellule dendritiche, cellule staminali CD34 neg, linfociti Tregs).

Terapia cellulare mirata a migliorare il “graft”

Nel tentativo di migliorare la ricostituzione immunologica post trapianto e separare l’effetto GvHD dall’effetto GvL, il gruppo di Perugia ha impiegato un metodo di espansione *ex vivo* seguito da reinfusione dei linfociti Treg CD4+25+ FoxP3+, coinvolti nel mantenimento della tolleranza al self e nell’omeostasi del sistema immunitario. Essenziale per l’espansione in vivo dei linfociti Treg CD4+25+ FoxP3+ è il riconoscimento degli alloantigeni presentati dalle antigen presenting cells (APCs) del ricevente nel contesto delle molecole MHC classe II. Questo permette l’espansione e la migrazione dei linfociti T reg verso i tessuti target della GvHD riducendo l’alloreattività e “spegnendo” la GvHD. Uno dei maggiori dubbi nell’applicazione clinica di questo approccio è legato alla potenziale soppressione dell’effetto GvL, per l’evidenza che i Tregs potrebbero contribuire ad una risposta deficitaria del sistema immune contro i tumori solidi e le malattie oncoematologiche. Si è quindi sviluppato un metodo di immunoselezione dei linfociti Tregs e loro successiva espansione, seguito dalla loro infusione dopo il trapianto di megadose di cellule staminali CD34+ e successiva infusione di linfociti T. Questo approccio dovrebbe limitare l’insorgenza di GvHD e contemporaneamente promuovere l’effetto GvL. I risultati preliminari a breve termine sono stati incoraggianti ma il sistema non è stato per ora adottato in protocolli clinici su larga scala perchè troppo complesso e costoso.

Immunoselezione negativa TCR $\alpha\beta$ /CD19

In considerazione di numerosi studi che hanno dimostrato l’importanza delle cellule accessorie contenute nel graft nel mediare l’insorgenza della GvHD, aumentare l’effetto GvL e diminuire il rischio infettivo, il gruppo Tuebingen ha recentemente sviluppato un protocollo di deplezione dei linfociti esprimenti il T

cell receptor (TCR) α/β e l'antigene CD19 mediante selezione immunomagnetica *ex-vivo* (Clinimacs Miltenyi). Questo approccio è volto a mantenere le cellule effettrici NK e i linfociti T TCR γ/δ^+ , oltre alle cellule staminali CD34+.

Le cellule T γ/δ^+ rappresentano un subset di linfociti T che esprimono una variante del TCR composta da catene gamma e delta. Il γ/δ TCR è presente in circa il 2-10% delle cellule T circolanti. Al contrario, la maggioranza dei linfociti T esprime il TCR α/β , risiede nei linfonodi e nel timo ed è deputata al riconoscimento degli antigeni presentati dal sistema MHC. I linfociti T α/β^+ sono quindi direttamente coinvolti nello sviluppo della GvHD.

I linfociti γ/δ^+ , chiamati anche "innate like T cells", appartengono alla parte adattativa del sistema immune e svolgono molteplici funzioni effettrici come la rapida secrezione di chemochine e citochine in risposta ad uno stimolo. Sono in grado di riconoscere l'antigene indipendentemente dal sistema MHC; questo fa sì che i linfociti γ/δ^+ non siano coinvolti nello sviluppo della GvHD. I linfociti T γ/δ^+ svolgono un ruolo importante anche nella protezione contro patogeni intra ed extra cellulari, nello sviluppo di tumori (in particolare quelli oncoematologici), modulano la risposta immune e mantengono l'omeostasi tissutale. Nel contesto del trapianto allogenico partecipano alla risposta anti-CMV, particolarmente importante nella prima fase post trapianto, quando la risposta immune è assente o gravemente ridotta. Infine, dai numerosi studi condotti finora, emerge che i linfociti T γ/δ^+ nel contesto del trapianto allogenico, sarebbero in grado di reclutare i linfociti T α/β nei siti di invasione degli organismi patogeni, mediante la secrezione di citochine specifiche, e questo indurrebbe ulteriore amplificazione dei linfociti T α/β esprimenti i recettori specifici per i patogeni presenti. I dati disponibili circa la cinetica delle cellule NK mostrano come occorrono molte settimane dopo il trapianto perchè dalle cellule staminali CD34+ si generino cellule NK pienamente funzionanti in grado di esercitare una durevole risposta immunitaria anche di tipo antivirale, oltre a contribuire alla prevenzione della GvHD attraverso l'eliminazione delle cellule dendritiche del ricevente. Nell'ambito di un trapianto TCR γ/δ^+ /CD19+ la possibilità di infondere un elevato numero di cellule NK alloreattive mature del donatore eserciterebbe un effetto GvL nell'immediato post trapianto e contribuirebbe a cooperare nella protezione contro le infezioni. Inoltre, la deplezione dei linfociti B CD19+ è volta a prevenire lo sviluppo di patologie linfoproliferative Epstein virus correlate.

L'immunoselezione negativa dei linfociti T TCR α/β^+ e CD19+ a scopo clinico consiste nell'impiego di un anticorpo biotinilato anti TCR α/β legato ad un anticorpo anti-biotina coniugato a microbiglie magnetiche. Analogamente, la deplezione B avviene attraverso il legame con un anticorpo anti-CD19 legato ad una microbiglia. Il sistema è chiuso ed è dotato di un campo magnetico che cattura le cellule legate alle microbiglie deviandole in una sacca apposita (Fig. 2). Il recupero medio delle cellule CD34+ è pari a circa il 75%, simile a quello della immunoselezione positiva. La deplezione dei linfociti α/β , CD19 è pressochè totale.

I risultati clinici preliminari condotti dai gruppi di Tuebingen e di Roma-Bambin Gesù sui bambini affetti da leucemia acuta sottoposti a terapia di condizionamento differente appaiono estremamente incoraggianti: rapido attecchimento, bassis-

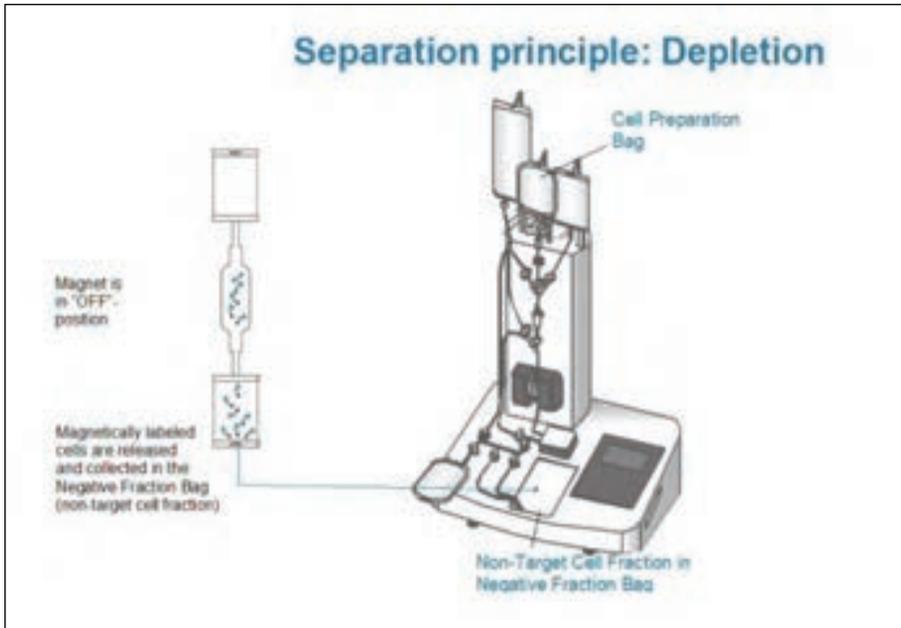


Fig. 2 - Immunoselezione TCRab/CD19 negativa.

sima incidenza di GvHD acuta di grado I e II, assenza di GvHD cronica, rapida ricostituzione immunologica. Un più lungo follow-up dei pazienti sarà necessario per valutare la reale incidenza di recidiva.

Conclusioni

Il trapianto aploidentico rappresenta una reale alternativa per i pazienti che non dispongono di un donatore familiare HLA identico. Attualmente l'immunoselezione negativa TCR $\alpha\beta$ /CD19 rappresenta la più avanzata tecnica di manipolazione *ex vivo* del graft. Questo tipo di deplezione potrebbe avere potenziali applicazioni nella selezione dei linfociti ed essere per esempio impiegata nell'immunoselezione dei linfociti TCR γ/δ^+ destinati a DLI al fine di limitare l'insorgenza di GvHD mantenendo al contempo l'effetto GvL.

Bibliografia essenziale

1. Ballen KK, et al. Selection of optimal alternative graft source: mismatched unrelated donor, umbilical cord blood, or haploidentical transplant. *Blood*. 2012; 119: 1972-1980.
2. N. Kekre JH. Antin. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood*. 2014; 124: 334-343.
3. Aversa F, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted

- stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med.* 1998; 339: 1186-1193.
4. Aversa F, et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical “three loci” incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony stimulating factor mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood.* 1994; 84: 3948-3955.
 5. Aversa F, et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3447-3454.
 6. Handgretinger R, et al. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 27: 777-783.
 7. Di Ianni M, et al. HLA Haploidentical stem cell transplantation with T reg and T con adoptive immunotherapy promotes a strong graft-versus-leukemia effect. *ASH Annual meeting abstracts.* 2013; 122: Abstract 907.
 8. Hayday R. Tigelaar. Immunoregulation in the tissues by T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 233-242.
 9. Martelli MF, et al. “Designed” grafts for HLA-haploidentical stem cell transplantation. *Blood.* 2014; 123: 967-973.
 10. Keever-Taylor CA, et al. Comparison of immune recovery in recipients of unmanipulated vs T-cell-depleted grafts from unrelated donors in a multi-center randomized phases II and III trial (T-cell depletion trial). *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45: 587-589.
 11. Schumm M, et al. Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. *Cytotherapy*, 2013; 15: 1253-1258
 12. Daniele N, et al. Transplantation in the onco-hematology field: focus on the manipulation of ab and gd T cells. *Pathology-Research and Practice* 2012; 208: 67-73.

What statisticians want: How to make an impact factor (migliorare la qualità della ricerca clinica)

Luigia Scudeller

MD, MScEpid

Direzione Scientifica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia
Telefono 0382501676 - Fax 0382502505 - E-mail: l.scudeller@smatteo.pv.it

FARE RICERCA in medicina è interesse comune di tutti gli esseri umani: degli scienziati (per la loro curiosità intellettuale nel comprendere cause e storia naturale delle malattie, fattori che determinano il successo o meno di un trattamento, scelta ottimale tra più di un trattamento, etc), dei clinici (per la loro onestà professionale nel scegliere che cosa è meglio per ciascuno dei loro pazienti) e per tutti noi, potenziali pazienti (per interesse personale, affinché le terapie che ci verranno proposte quando saremo malati siano le migliori possibili).

Tuttavia, la qualità attuale media della ricerca in ambito biomedico reperibile pubblicamente sulle riviste biomediche è tendenzialmente bassa (1, 2). Le cause di questo “spreco” appartengono a quattro fondamentali categorie: la scarsa rilevanza delle “domande” di ricerca che vengono poste, l’inappropriatezza dei metodi utilizzati, la mancata pubblicazione dei risultati, e la scarsa chiarezza e utilità anche dei (pochi) dati pubblicati (1). All’inizio di quest’anno Lancet ha dedicato un’intera serie di articoli a questo argomento, analizzando il fenomeno da tutti i possibili punti di intervento (3-8). Infatti, tra i pilastri fondamentali del valore anche etico di uno studio, c’è la sua validità scientifica (9).

Il punto di vista dello statistico

Immaginate di essere un rocciatore professionale e di ricevere la seguente email: “Gent. Guida, vorremmo scalare una montagna nel gruppo dell’Himalaya, sicuramente una degli 8000. Sappiamo dalla letteratura che è importante portare delle bombole di ossigeno e ci domandavamo quale marca Lei consiglierebbe. Grazie per l’aiuto, ecc.”. È evidentemente una esagerazione: nessuno si sognerebbe di scalare l’Himalaya senza una guida esperta... (10).

Nella ricerca clinica, accade il contrario. A noi statistici capita di ricevere telefonate del tipo: “Gent. Statistico, vorrei fare uno studio sull’efficacia del massaggio. Sappiamo dalla letteratura che è necessario scegliere una misura di outcome e mi

domandavo quale Lei consiglierebbe. Grazie per l'aiuto ecc.” L'unica risposta possibile è: “hai bisogno di uno statistico” (11). Statistica, in biomedicina, non indica solo l'analisi dei dati, ma in modo più ampio la metodologia della ricerca in ambito biomedico: in altre parole l'epidemiologia clinica (12). Contrariamente a quanto spesso si pensa, la statistica non è uno strumento rigido al quale è obbligatorio conformarsi per poter condurre uno studio, ma è al servizio del ricercatore che ha avuto un'idea e vuole dimostrarla in modo rigoroso. Infatti, la statistica adatta i propri metodi in base allo specifico contesto in cui si vuole condurre lo studio (13). In altri termini, la metodologia della ricerca è “solo” lo strumento (imprescindibile) per testare e vagliare le nostre idee nuove.

La ricerca

L'idea

Ogni ricerca parte da una “idea”: è la parte più creativa e per così dire “artistica” del nostro lavoro. Senza “idee nuove” non ci può essere “ricerca” (14). Nell'ambito biomedico le “idee” per nuove ricerche nascono principalmente da due fonti: l'osservazione quotidiana dei nostri pazienti, con la necessità di risolvere dei nuovi problemi, e la lettura di articoli scientifici di altri autori, che mettiamo in relazione con la nostra esperienza. Il fine ultimo è di aumentare la nostra conoscenza nell'ambito di interesse nostro e, soprattutto, dei pazienti stessi (15).

Il problema

Il secondo passaggio è quello di convertire un'idea in un “problema” da risolvere: comprendere e spiegare il problema, cosa intendo studiare? Perché? Come? Il problema costituisce la cornice di riferimento per lo studio, e definirlo aiuta a chiarirsi le idee su qual è il problema, cosa la ricerca deve risolvere o qual è il risultato atteso. In pratica occorre approfondire il rationale per la ricerca, arrivare al problema (interesse, mancanza, necessità, cambiamento educativo/medico/strategico...), raccogliendo informazioni preliminari, parlando con altri ricercatori, scrivendo una sezione specifica sul progetto di ricerca o tesi (può essere una frase sola fino a varie pagine), e giustificare il problema (16).

Un espediente mentale utile per compiere questo passaggio è immaginare (spesso è la realtà!) di dover ottenere un finanziamento per il proprio studio, e con le proprie argomentazioni convincere lo sponsor che lo studio è fattibile, interessante, innovativo, etico e importante (in inglese FINER: Feasible, interesting, novel, ethical, relevant). Per così dire, bisogna VENDERE il proprio PRODOTTO (studio).

Il quesito

Una volta problematizzata la nostra idea, occorre formularla come “quesito” cui rispondere in modo scientifico, cioè con i risultati di uno studio (17). È un passaggio fondamentale, che spesso viene trascurato o compiuto in modo superficiale. Invece, una formulazione corretta (pur impegnativa e complessa) porta una lunga serie di vantaggi: consente di valutare se lo studio è applicabile alla propria (e

altrui) pratica clinica, chiarisce il problema dei dettagli, facilita i passi successivi del processo di ricerca, aiuta a selezionare la letteratura rilevante, anticipa potenziali problemi e quantifica le risorse necessarie, migliora l'efficienza riducendo sprechi di risorse.

Una delle prime decisioni da prendere è dove situare la vostra domanda lungo il continuum speculativo/pragmatico. Uno studio pragmatico riflette meglio le condizioni di vita reale; ma se dovesse dare esito "negativo" non ci permette di concludere che l'intervento proposto sia inefficace, ma solo che in condizioni non ottimali non ha funzionato: al contrario, uno studio speculativo, svolto in condizioni ideali (quasi "in laboratorio") consente di comprendere se un intervento è efficace (efficacy), ma la reale efficacia pratica (effectiveness) va poi testata in uno studio più "pragmatico" per valutarne la generalizzabilità esterna (18). La generalizzabilità dei risultati di studio ad altre popolazioni non può essere data per scontata, ma deve essere soppesata in fase di disegno dello studio e talvolta sottoposta a indagine empirica; d'altra parte, se tale generalizzazione fosse mai possibile non ci sarebbe motivo di svolgere uno studio (19).

Ovviamente, non esiste uno studio puramente speculativo in tutti i suoi aspetti (non sarebbe fattibile, se non altro per il fatto di arruolare esseri umani, con tutti i loro problemi!) e neanche uno studio puramente pragmatico (si conduce uno studio per risolvere un vuoto di conoscenze); piuttosto, gli elementi che hanno un impatto sulla generalizzabilità sono numerosi (per una trattazione completa si rimanda a Thorpe, 2009) (20).

Il modo formale di rendere esplicito il quesito dello studio è di includere nella formulazione cinque elementi (17):

- P=Popolazione (persone rilevanti): i pazienti futuri che ci interessano, quelli a cui intendiamo applicare i risultati dello studio, una volta ottenuti
- I=Intervento: il tipo di trattamento sperimentale, il nuovo farmaco, la nuova strategia gestionale di cui ci interessa valutare l'efficacia...
- C=Controllo: il trattamento che fungerà da confronto: il trattamento standard, l'attuale pratica clinica, in alcuni casi il placebo...
- O=Outcome (o endpoint) principale dello studio: cioè la misura in base a cui effettueremo il confronto tra i gruppi dello studio: mortalità, sviluppo di complicanze, tempo alla stabilizzazione clinica, tempo alla "guarigione", livelli di linfociti CD4 positivi a 12 mesi dall'inizio della terapia...
- T=Tipo di studio: studio randomizzato o controllato a bracci paralleli o cross over (di superiorità, di equivalenza, di non inferiorità?).

A questa lista potremmo anteporre la revisione della letteratura (cosa già si conosce: E=Evidence nella terminologia anglosassone) e finire con T=Tempo: l'arco temporale in cui intendiamo osservare il verificarsi dell'outcome (21).

È importante considerare l'impatto del quesito in ciascun passo successivo; infatti tutti gli elementi del quesito determinano i metodi da utilizzare in ciascun passo successivo del disegno, esecuzione, analisi ed interpretazione dello studio. Ad esempio, la scelta della popolazione di pazienti "obiettivo" della ricerca determinerà i criteri di inclusione, la scelta dell'intervento e del controllo determinerà il disegno dello studio, la scelta della misura di outcome determinerà (oltre a una

serie di aspetti pratici e logistici) la numerosità campionaria e la durata dello studio, e così via.

Ipotesi di ricerca

L'ipotesi formale della ricerca, che dipende dal quesito, è semplicemente la formulazione "statistica" dell'ipotesi nulla e dell'ipotesi alternativa; questa formulazione è alla base della determinazione della numerosità campionaria e necessità di trattazione approfondita (ma separata!).

Insieme all'ipotesi principale, occorre chiarire anche tutte le eventuali domande secondarie a cui intendiamo rispondere con lo studio; tuttavia, la potenza di uno studio per queste analisi secondarie è sempre inferiore a quella per l'ipotesi principale; per limitare i danni (cioè la perdita di potenza) occorre specificare già nel protocollo di studio (e non a posteriori, una volta raccolti i dati!) le ipotesi secondarie che intendiamo testare, evitando quelle che vengono chiamate "data fishing" (22). È infatti celebre l'aforisma: "torturati sufficientemente a lungo, i dati prima o poi confesseranno".

Studio

Interi libri sono stati scritti sugli aspetti pratici della conduzione di uno studio. Qui mi limiterò a menzionare l'importanza della qualità dei dati raccolti, e in particolare di evitare i dati mancanti, come evidenziato da un recente articolo pubblicato sul *New England Journal of Medicine* (23). Chi fosse interessato troverà molti esempi pratici e suggerimenti per migliorare la qualità dei dati sia in fase di disegno dello studio sia in fase di conduzione vera e propria dello studio. Voglio però almeno citare queste parole: "una quantità sostanziale di dati mancanti costituisce un problema grave che mina la credibilità scientifica delle conclusioni causali degli studi clinici. **L'assunzione che i metodi di analisi in grado di compensare tali dati mancanti non è giustificata**, pertanto gli aspetti del disegno degli studio che limitino il rischio di avere dati mancanti dovrebbero essere un obiettivo importante".

Conclusioni

Non posso concludere questa lunga trattazione senza prendere in considerazione la pubblicazione dei risultati, citando Madame de Staël (1766-1817): "la ricerca della verità è la più nobile delle occupazioni, e la sua pubblicazione è un dovere". Il network EQUATOR (Enhancing the QUALity and Transparency Of health Research, Migliorare la qualità e la trasparenza della ricerca sanitaria) è una iniziativa internazionale (<http://www.equator-network.org/>) che ha l'obiettivo di migliorare l'affidabilità e il valore della letteratura biomedica attraverso la promozione di pubblicazioni scientifiche trasparenti ed accurate, e un più ampio uso di linee guida sulla stesura dei lavori scientifici. È il primo tentativo coordinato per affrontare sistematicamente i problemi delle pubblicazioni inadeguate e su scala globale; è un'evoluzione del lavoro svolto da singoli gruppi negli ultimi 15 anni (1-8). Tali documenti, raccolti in un database dotato di motore di ricerca, sono molto utili

non solo e non tanto in fase di pubblicazione dei risultati, ma anche e soprattutto in fase di disegno dello studio.

Senza pubblicazioni scientifiche accessibili e utilizzabili, la ricerca biomedica non può svolgere il proprio ruolo originario: essere di aiuto ai pazienti e ai loro medici.

Bibliografia

1. Chalmers I, Glasziou P. Avoidable waste in the production and reporting of research evidence. *Lancet*. 2009; 374: 86-89.
2. Ioannidis JP. Why most published research findings are false. *PLoS Med*. 2005; 2: e124.
3. Macleod MR, Michie S, Roberts I, Dirnagl U, Chalmers I, Ioannidis JP, et al. Biomedical research: increasing value, reducing waste. *Lancet*. 2014; 383: 101-104.
4. Ioannidis JP, Greenland S, Hlatky MA, Khoury MJ, Macleod MR, Moher D, et al. Increasing value and reducing waste in research design, conduct, and analysis. *Lancet*. 2014; 383: 166-175.
5. Glasziou P, Altman DG, Bossuyt P, Boutron I, Clarke M, Julious S, et al. Reducing waste from incomplete or unusable reports of biomedical research. *Lancet*. 2014; 383: 267-276.
6. Chan AW, Song F, Vickers A, Jefferson T, Dickersin K, Gotzsche PC, et al. Increasing value and reducing waste: addressing inaccessible research. *Lancet*. 2014; 383: 257-266.
7. Chalmers I, Bracken MB, Djulbegovic B, Garattini S, Grant J, Gulmezoglu AM, et al. How to increase value and reduce waste when research priorities are set. *Lancet*. 2014; 383: 156-165.
8. Al-Shahi Salman R, Beller E, Kagan J, Hemminki E, Phillips RS, Savulescu J, et al. Increasing value and reducing waste in biomedical research regulation and management. *Lancet*. 2014; 383: 176-185.
9. Emanuel EJ, Wendler D, Grady C. What makes clinical research ethical? *JAMA*. 2000; 283: 2701-111.
10. Vickers AJ. Basic introduction to research: how not to do research. *J Soc Integr Oncol*. 2008; 6: 82-85.
11. Gerlinger C, Edler L, Friede T, Kieser M, Nakas CT, Schumacher M, et al. Considerations on what constitutes a 'qualified statistician' in regulatory guidelines. *Stat Med*. 2012; 31: 1303-135.
12. Haynes RB SD, Guyatt GH, Tugwell P. *Clinical Epidemiology: How to Do Clinical Practice Research*. 3th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins (LWW). 2010.
13. Rubio DM, Del Junco DJ, Bhore R, Lindsell CJ, Oster RA, Wittkowski KM, et al. Evaluation metrics for biostatistical and epidemiological collaborations. *Stat Med*. 2011; 30: 2767-277.
14. Loehle C. A guide to increased creativity in research: inspiration or perspiration? *BioScience*. 1990; 40: 123-129.

15. Knottnerus JA, Tugwell P. Improving the clinical significance of medical research. *J Clin Epidemiol.* 2014; 67: 607-608.
16. Lipowski EE. Developing great research questions. *Am J Health Syst Pharm.* 2008; 65: 1667-1670.
17. Brian Haynes R. Forming research questions. *J Clin Epidemiol.* 2006; 59: 881-886.
18. Karanicolas PJ, Montori VM, Devereaux PJ, Schunemann H, Guyatt GH. A new 'mechanistic-practical' framework for designing and interpreting randomized trials. *J Clin Epidemiol.* 2009; 62: 479-484.
19. Cornfield J. Principles of research: 1959. *Stat Med.* 2012; 31: 2760-2768.
20. Thorpe KE, Zwarenstein M, Oxman AD, Treweek S, Furberg CD, Altman DG, et al. A pragmatic-explanatory continuum indicator summary (PRECIS): a tool to help trial designers. *J Clin Epidemiol.* 2009; 62: 464-475.
21. Brown P, Brunnhuber K, Chalkidou K, Chalmers I, Clarke M, Fenton M, et al. How to formulate research recommendations. *BMJ.* 2006; 333: 804-806.
22. Sun X, Ioannidis JP, Agoritsas T, Alba AC, Guyatt G. How to use a subgroup analysis: users' guide to the medical literature. *JAMA.* 2014; 311: 405-411.
23. Little RJ, D'Agostino R, Cohen ML, Dickersin K, Emerson SS, Farrar JT, et al. The prevention and treatment of missing data in clinical trials. *N Engl J Med.* 2012; 367: 1355-1360.

La ricerca ed i limiti del possibile

Salvatore Veca

Istituto Universitario di Studi Superiori, Pavia

In un capitolo de *I modi del paradosso e altri saggi* il grande logico ed epistemologo W.V.O. Quine ha osservato: “Ci sono parecchi operatori strettamente correlati, detti operatori *modali*, che sono caratteristici della logica modale. Ci sono gli operatori di *necessità*, *possibilità*, *impossibilità*, *non-necessità*. Ci sono anche gli operatori binari, o connettivi, di *implicazione stretta* e di *equivalenza stretta*. Tutti questi operatori sono facilmente definibili l’uno in termini dell’altro. Così l’impossibilità è la necessità della negazione; la possibilità e la non-necessità sono le negazioni dell’impossibilità e della necessità; e l’implicazione stretta e l’equivalenza stretta sono la necessità del condizionale e del bicondizionale materiali. In un esame filosofico della logica modale possiamo quindi limitarci convenientemente per la maggior parte ad un unico operatore modale, quello di *necessità*. Tutto ciò che si può dire della necessità si può dire anche, con modifiche facili e ovvie, degli altri modi”.

Per gettar luce sulla questione della necessità e delle modalità dell’attualità e della possibilità, possiamo riferirci alla filosofia della scienza e ai suoi sviluppi. Dopo tutto, a prima vista, le candidate più promettenti al ruolo di verità o proprietà necessarie sono quelle proposizioni che occorrono nel dominio della logica, della matematica, della fisica o della biologia. Ed è a questa famiglia di proposizioni e alle teorie soggiacenti che mi riferisco nell’esplorazione dei mutevoli limiti del *possibile* nella ricerca scientifica.

Ora, noi sappiamo che nella prima metà del secolo scorso la migliore filosofia della scienza ha assunto la *fisica* come modello di discorso scientifico rigoroso e ha cercato di definire le regole del gioco e il metodo scientifico. Il Circolo di Vienna e il neo-empirismo o neo-positivismo logico sono stati i cantieri dell’impresa epistemologica.

A dire il vero, conviene fare un passo indietro, e riferirci alla grande stagione - tra fine Ottocento e primi anni del Novecento - della cosiddetta crisi dei fondamenti della *matematica*, della nascita dei programmi del logicismo, dell’intuizionismo e del formalismo. In quel caso, la filosofia si misurava con il modello della matematica, considerata la base del metodo scientifico. L’idea centrale qui era la *deduzione*. Goedel la fece finita, come ho mostrato nella quarta lezione di *L’idea di incompletezza*. E aprì un campo straordinario di ricerca con i suoi teoremi li-

mitativi. (Cfr. Gregory Chaitin e l'estensione dei teoremi limitativi entro la teoria dell'informazione di Shannon, connessi alla teoria della computabilità di Alan Turing.)

L'idea centrale del neo-positivismo fu l'*induzione*. Con essa era coerente il principio di verificazione. Ciascuna proposizione doveva poter essere ridotta a una proposizione empirica fattualmente verificabile (Schlick, Carnap). Il *Tractatus* di Wittgenstein esercitò una profonda influenza sui membri del Circolo (ma c'erano anche strani tipi come Goedel e Popper che erano infiltrati eterodossi). Fu in quel contesto che il grande Otto Neurath si inventò la superba immagine della barca da riparare in navigazione, per mostrare che in realtà la verità scientifica è data dalla coerenza fra un'asserzione e l'insieme delle asserzioni scientifiche a un tempo dato (olismo alla Duhem-Quine). In questo modo le teorie scientifiche si mettono alla prova nel loro insieme con il mondo.

L'impresa scientifica non funziona così. Questo è il credo di K.R. Popper che propone il principio di falsificazione nella sua *Logica della scoperta scientifica*. Sembra che l'idea gli fosse venuta, ascoltando una conferenza di Einstein, in cui il grande fisico sosteneva che tutte le verità scientifiche sono tali, *sino a prova contraria*. Il falsificazionismo di Popper, che è drasticamente anti-induttivistico, riformula l'ideale della deduzione in forma ipotetica o congetturale. Congetture e confutazioni, la ricerca non ha fine. Einstein aveva scritto in un breve articolo nel 1919: "I progressi veramente grandi della conoscenza della natura si sono avuti da una via quasi diametralmente opposta a quella dell'*induzione*."

Una comprensione intuitiva dell'essenziale di un grosso complesso di fatti induce il ricercatore alla costituzione di un principio fondamentale *ipotetico* o di più principi di tal genere. Dal principio fondamentale (sistema degli assiomi) egli deduce in via puramente logico-deduttiva le conseguenze nella maniera più completa possibile. Queste conseguenze derivabili dal principio fondamentale, spesso attraverso sviluppi e calcoli complicati, vengono poi poste a confronto con le esperienze e forniscono così un criterio per la giustificazione del principio fondamentale ammesso. Tale principio (assiomi) e le conseguenze formano insieme quella che si dice una 'Teoria'./ Una teoria può quindi essere riconosciuta come sbagliata, quando c'è un errore logico nelle sue deduzioni, o come inesatta quando un fatto non si accorda con una delle sue conseguenze. Ma non si può mai dimostrare la verità di una teoria. Perché non si sa mai che anche nel futuro non si avrà un'esperienza che contraddica le sue conseguenze; e perché sono sempre pensabili altri sistemi teorici che siano in grado di connettere i medesimi dati fatti".

Qui, potremmo dire, il dominio del possibile è ampio, e la necessità appare essenzialmente condizionata.

Una necessità, possiamo dire, fino a *prova contraria*. Come ha scritto Robert Nozick nel terzo capitolo di *Invarianze*, "in che modo possiamo sapere che certe asserzioni sono necessariamente vere? Una maniera potrebbe sembrare quella seguente, che si adegua a una metodologia filosofica corrente. Un'asserzione generale *A* sarà un candidato al ruolo di verità necessaria quando essa è vera, per quanto ne sappiamo, e non vediamo come potrebbe essere falsa. Mettiamo alla prova la sua candidatura al ruolo di verità necessaria tentando di escogitare con-

troesempi ad *A*, casi possibili in cui sarebbe falsa. Se sforzi strenui, da parte nostra e altrui, di trovare possibili controesempi di tal genere falliscono, concludiamo in via provvisoria che *A* è una verità necessaria”.

È nel terzo capitolo di *Invarianze* che Nozick ha osservato, a proposito della necessità metafisica come necessità incondizionata che resiste a qualsiasi controesempio a un tempo dato, connessa alla verità di qualcosa in tutti i mondi possibili: “una volta, la necessità metafisica era una categoria fiera di sé, che comprendeva una vasta gamma di importanti verità interconnesse. Ora essa è stata ridotta, nella migliore delle ipotesi, a una congerie di bizzarre affermazioni. Richiamiamo alla mente le sue gloriose giornate di una volta. *Ogni evento ha una causa* - spazzato via con la formulazione della meccanica quantistica. *Lo spazio è euclideo* - via con la formulazione di geometrie non euclidee coerenti e la loro adozione nella fisica contemporanea. *Lo spazio ha una curvatura costante* - via con la relatività generale. *Lo spazio ha tre dimensioni* - messo in questione dalla teoria di Klein-Kaluza dei primi anni Venti del secolo scorso e abbandonata nella formulazione della teoria delle superstringhe delle ventisei dimensioni e dei dieci spazi dimensionali, con molte dimensioni ripiegate.

Per ogni coppia di eventi, l'uno segue l'altro temporalmente, o viceversa, o i due eventi sono simultanei - modificato dalla relatività speciale. *Niente viaggia all'indietro nel tempo* - ma nell'elettrodinamica quantistica, l'antimateria che va avanti nel tempo è equivalente a materia (ordinaria) che va indietro nel tempo. *Il mondo esiste in uno stato indipendentemente dalle nostre osservazioni* - fatto vacillare dalla meccanica quantistica e dal principio di indeterminazione di Heisenberg. *Un oggetto solido non può muoversi passando attraverso un altro oggetto* - tuttavia l'effetto tunnel quantistico rende ammissibile questa possibilità. *Lo spazio è connesso in maniera semplice* - ma non in certe soluzioni delle equazioni della relatività generale”. Il punto potrebbe essere questo: “Spinti dal bisogno di spiegare dati strani, i fisici formulano teorie che ammettono ciò che prima era ritenuto metafisicamente impossibile. Quando queste teorie hanno successo nel fornire spiegazioni dei dati, esse vengono candidate al rango di descrizione vera della realtà fisica e *ipso facto* sono considerate come metafisicamente possibili. La coda fisica agita il cane metafisico”.

Le osservazioni di Nozick corroborano la mia tesi sulla natura *condizionata* della necessità sino a prova contraria. Così come della possibilità, connessa al nostro atteggiamento del reputare possibile qualcosa, a un tempo dato e alla luce della migliore informazione disponibile. Come ha sostenuto Giulio Preti in *Praxis ed empirismo*, il possibile non è possibile *ab aeterno*, ma è sempre e solo “possibile nelle circostanze date”.

Il neopositivismo aveva, per così dire, una prospettiva statica nella sua opera di rigorizzazione dei linguaggi e dei metodi della scienza. Anche grazie al falsificazionismo popperiano, fu negli anni Cinquanta e Sessanta del secolo scorso, che si cominciò a guardare alla dinamica e al cambiamento concettuale nell'impresa scientifica. La filosofia della scienza mise a fuoco la dimensione storica della scienza stessa. Dopo il celebre lavoro di Thomas Kuhn sulla struttura delle rivoluzioni scientifiche, i post-popperiani Lakatos e Musgrave, Hanson e Feyerabend

insistero sulle discontinuità e sulle rotture piuttosto che sulla linearità di un processo cumulativo della conoscenza scientifica. Feyerabend concluse con le posizioni del cosiddetto anarchismo metodologico: *Anything goes*, rispetto alle pretese normative delle teorie filosofiche che dettavano le regole del metodo scientifico. Negli anni Ottanta la percezione dei profondi cambiamenti delle pratiche sociali della ricerca scientifica, della big Science, indirizzarono alcuni programmi di ricerca filosofici nella direzione di una sorta di sociologia della scienza (Scuola di Edimburgo, l'opera di epistemologi come Bruno Latour).

La dinamica dell'impresa scientifica mette sotto pressione le categorie di possibile e impossibile, di necessario. Come ci ha suggerito Nozick, lo mostrano casi come quelle della geometrie non euclidee o della tensione fra relatività generale e fisica quantistica. Dio gioca o non gioca a dadi? Inoltre, come ha mostrato Ian Hacking nel suo *Representing and Intervening*, uscito nel 1983 e divenuto ormai un classico, la fallacia della migliore epistemologia del secolo scorso è consistita nell'immagine della scienza con cui essa operava. Un'immagine interna alla riflessione filosofica, ma inesorabilmente estranea alle *pratiche* della ricerca scientifica nel tempo. Quelle pratiche che mettono alla prova necessità già date e saggiamo i mutevoli limiti del possibile, nei persistenti giochi di ricerca e ritrovamento a proposito di come sono fatte le cose.

Credo che la lezione da trarre oggi sia la matura consapevolezza del carattere intrinsecamente inadempito e insaturo della ricerca scientifica e, *a fortiori*, filosofica. Nel mio gergo, sui molti volti dell'incompletezza considerata come *virtù* della conoscenza. Il che, nella prospettiva della modalità da cui abbiamo preso le mosse, dà una qualche priorità alla categoria della possibilità, *in ogni caso* tributaria del mondo attuale. Come ci aveva suggerito il grande illuminista tedesco Lessing, l'autore di *Nathan il saggio*: in una mano Dio ha tutte le verità *necessarie*, nell'altra tutta la ricerca delle verità *possibili*, tutte le strade, le promesse, i metodi che possono condurre alla verità. Voi, che siete alle prese con i mutevoli limiti del possibile nelle vostre ricerche, quale scegliereste?

Bibliografia essenziale

1. Bartocci C. Una piramide di problemi. Storie di geometria da Gauss a Hilbert, Milano, Cortina 2012.
2. Bartocci C. Dimostrare l'impossibile. La scienza inventa il mondo, Milano, Cortina 2014.
3. Einstein A. Induzione e deduzione in fisica, "Berliner Tageblatt". 1919; 617: 25.12 (Suppl. 4).
4. Hacking. *Representing and Intervening*, Cambridge, Cambridge University Press. 1983.
5. Lessing GE, Sulla nozione di verità nell'illuminismo. tr. it. di E. Tetamo, in *Che cos'è l'illuminismo?*, a cura di A. Tagliapietra, Milano, Bruno Mondadori. 2000; 65-66.
6. Neurath O. Physikalismus. "Scientia". 50, 1931: 297-303: Protokollsätze, "Erkenntnis". 3, 1932-33, 204-214.

7. Nozick R. Invarianze. trad. it. di G. Pellegrino. Roma, Fazi 2003.
8. Popper KR. Logica della scoperta scientifica. tr. it. di M. Trincherò, Torino, Einaudi 1998.
9. Preti G. Praxis ed empirismo. Milano, Bruno Mondadori 2007.
10. Quine WVO. I modi del paradosso e altri saggi, trad. it. di M. Santambrogio. Milano, il Saggiatore 1975.
11. Veca S. L'idea di incompletezza. Milano, Feltrinelli 2011.
12. Veca S. La barca di Neurath. Sette saggi brevi. Edizioni della Scuola Normale Superiore di Pisa. 2015.

Citogenetica e lesioni molecolari delle cellule staminali in oncoematologia

Paolo Bernasconi, Marina Boni, Paola Maria Cavigliano, Irene Dambrosio, Barbara Rocca, Rita Zappatore, Celeste Calvello, Iaria Giardini, Antonella Orlando, Marilena Caresana, Francesco Ripamonti

Divisione di Ematologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia, Italy

Lesioni citogenetiche e molecolari nei disordini onco-ematologici

Negli ultimi quarant'anni la citogenetica e l'analisi molecolare hanno identificato mutazioni somatiche ricorrenti nelle neoplasie mieloidi (sindromi mieloproliferative croniche, sindromi mielodisplastiche, leucemie acute mieloidi) e nelle malattie linfoproliferative (linfomi non-Hodgkin e mieloma multiplo) (1). Queste mutazioni hanno permesso di chiarire le tappe patogenetiche di questi disordini onco-ematologici, di giungere ad una loro sempre più precisa definizione diagnostica e prognostica e di eseguire le scelte terapeutiche più opportune. Nella patologia mieloida studi genetici e funzionali hanno suggerito che la trasformazione neoplastica possa essere determinata dalla cooperazione di due classi di mutazioni, mutazioni di classe I e di classe II. Le mutazioni di classe I causano un vantaggio proliferativo grazie all'attivazione di vari effettori appartenenti a vie di segnale poste più a valle. In particolare, si verifica l'attivazione di membri della famiglia STAT ("Signal transducer and activator of trascrption"), PI3K ("Phosphatidylinositol-3-kinase) e RAS-MAPK. Le mutazioni di classe II alterano invece l'espressione di fattori trascrizionali che svolgono un ruolo chiave nella mielopoiesi normale. Tuttavia, non tutte le neoplasie mieloidi seguono questo schema patogenetico: mutazioni di classe I sono presenti solo nel 50% circa dei pazienti. Per di più, recenti studi molecolari e funzionali hanno dimostrato che anche i geni che codificano per proteine che regolano lo stato di metilazione del DNA e le modificazioni post-traslazionali degli istoni possono essere colpite da mutazione, suggerendo che un alterato funzionamento di questi regolatori epigenetici possa essere un ulteriore meccanismo di trasformazione neoplastica. In realtà, la rilevanza patogenetica di questi meccanismi era già stata sottolineata in passato dalla citogenetica convenzionale che aveva individuato traslocazioni cromosomiche bilanciate a carico di acetil-transferasi, enzimi capaci di trasferire residui di lisina a livello degli istoni (tra questi riarrangiamenti quello più comune

coinvolgeva la “lysine acetyltransferase 6A”, *KAT6A* o *MOZ* ed il “nuclear receptor co-attivator 2”, *NCOA2* o *TIF2* e determinava la creazione del gene di fusione *MOZ-TIF2*, e di metiltransferasi, enzimi capaci di trasferire gruppi metilici (tra questi riarrangiamenti quello più comune coinvolgeva la “nucleoporin 98”, *NUP98* ed il “nuclear receptor binding SEP domain protein 1”, *NSD1* e determinava la creazione del gene di fusione *NUP98-NSD1*). Studi condotti in modelli murini avevano poi dimostrato che i geni di fusione *MOZ-TIF2* e *NUP98-NSD1* come pure quelli prodotti dal riarrangiamento del gene “*Mixed Lineage Leukemia*” *MLL* e di altri geni codificanti per acetiltransferasi e metiltransferasi erano i soli ad essere singolarmente in grado di alterare il “self-renewal” ed i programmi differenziativi/proliferativi delle cellule ematopoietiche più primitive, di ricreare la gerarchia funzionale e fenotipica della popolazione leucemica e di garantire lo sviluppo di nuove lesioni geniche (2, 3). Oggigiorno, le tecnologie di “Genome Sequencing” e “ChIP-seq methylation” hanno permesso di identificare mutazioni a carico di un sempre maggior numero di geni che codificano per proteine che regolano i processi epigenetici.

Perciò, queste mutazioni alterano lo stato di metilazione del DNA e le modificazioni post-traslazionali degli istoni e possono essere associate a mutazioni di classe I e II. I geni più spesso mutati sono *tet methylcytosine dioxygenase 2* (*TET2*), *isocitrate dehydrogenase 1* (*IDH1*), *IDH2*, *additional sex-combs like 1* (*ASXL1*), *enhancer of zeste homologue 2* (*EZH2*) e *DNA methyltransferase 3A* (*DNM3A*). L'importanza di queste nuove lesioni geniche rende necessaria una revisione del modello patogenetico proposto per le LAM anche perché è stato recentemente dimostrato che anche le mutazioni di classe I e II oltre a promuovere la proliferazione cellulare e a determinare un blocco maturativo inducono modificazioni epigenetiche.

Pertanto, per il verificarsi dei cambiamenti fenotipici caratteristici della popolazione leucemica sono necessari tutti i tipi di mutazione. Dato il basso tasso di mutazione della CSE e l'assenza del fenotipo “hypermutator” nella maggior parte delle leucemie, è stato proposto che queste mutazioni abbiano bisogno di un intervallo di tempo relativamente lungo per svilupparsi (3). In questo periodo di tempo, definito fase preleucemica, le CSE normali possono acquisire un certo numero di mutazioni, solo alcune effettivamente responsabili della trasformazione leucemica.

È stato ipotizzato che la prima mutazione somatica possa insorgere in una cellula già dotata di “self-renewal” qual è quella staminale o possa invece conferire il “self-renewal” ad una cellula più differenziata. Infatti, se il progenitore ematopoietico non acquisisse il “self-renewal” la mutazione verrebbe persa o per un progressivo esaurimento o per una progressiva maturazione della popolazione clonale. Comunque sia, indipendentemente dal livello di staminalità le cellule dotate di questa mutazione iniziale essendo capaci di generare una progenie ancora in grado di differenziarsi in modo del tutto normale vengono definite CSE preleucemiche. Solo l'acquisizione di una nuova specifica mutazione in una di queste CSE preleucemiche o in un elemento della loro progenie potrebbe garantire l'effettiva trasformazione leucemica.

Lesione citogenetica/molecolare e frequenza di cellule staminali preleucemiche e leucemiche

Inizialmente, nelle LAM studi *in vitro* avevano dimostrato che solo una minoranza di blasti leucemici (1% circa) formava colonie in coltura in mezzo semisolido (“Colony-forming cells”, CFC) con una frequenza che variava da campione a campione. Successivamente, l’impiego di anticorpi monoclonali aveva indicato che queste cellule esprimevano HLA-DR e CD33 a livelli superiori e CD11b e CD14 a livelli inferiori rispetto alla restante popolazione leucemica. Perciò, era stato ipotizzato che la popolazione leucemica fosse eterogenea e fosse organizzata in modo gerarchico come quella normale (4). Questa ipotesi sembrava essere supportata anche dai primi studi di xenotrapianto condotti in modelli murini. Infatti, nel 1994 Lapidot et al. (5) avevano dimostrato che blasti leucemici CD34⁺CD38^{lo} ottenuti da pazienti con LAM generavano leucemia acuta se trapiantati in topi non-obesi con immunodeficienza severa combinata, mentre blasti CD34⁺CD38⁺ non erano in grado di generare leucemia. Esperimenti di progressiva diluizione avevano poi indicato che nel topo la frequenza di CFC leucemiche era considerevolmente più bassa rispetto a quella osservata nelle colonie in mezzo semisolido ed era compresa tra 1×10^4 e 1×10^7 . Questi dati avevano quindi suggerito che le cellule staminali leucemiche (CSL) fossero rare, presentassero un fenotipo immaturo e dovessero essere quiescenti essendo dotate di chemoresistenza. Queste conclusioni erano però strettamente dipendenti dalle metodiche sperimentali impiegate: un cambiamento della metodica sperimentale comportava un cambiamento del risultato.

Più recentemente, l’impiego di fattori di crescita, di sistemi di coltura cellulare più moderni, di blasti leucemici freschi e di più raffinati modelli di xenotrapianto ha indicato che nelle LAM marcate da traslocazioni cromosomiche che coinvolgono il gene *MLL* il 9% dei blasti leucemici è potenzialmente in grado di generare CFC leucemiche se coltivato in mezzo semisolido. Però, nonostante questi miglioramenti tecnici solo il 50% delle LAM di origine umana attecchisce nel topo generando bassi livelli di chimera uomo: topo e lo xenotrapianto di LAM marcate da t(15;17), t(8;21) o l’inv(16) fallisce nella maggior parte dei casi. Questi insuccessi oltre che dipendere dall’incapacità dei modelli murini di individuare CSL in alcuni particolari sottotipi molecolari di LAM, sono anche determinati da vere e proprie differenze nelle caratteristiche biologiche della malattia e da differenze tra le due specie animali. Il superamento di questi limiti grazie all’impiego di topi singenici ha indicato che il numero di CSL è molto superiore a quello sino ad ora stabilito. Esperimenti di diluizione hanno indicato che in una popolazione di blasti leucemici non sortati ottenuti da topi sottoposti a xenotrapianto di LAM umana marcata dalla traslocazione *MLL-AF9* sono contenute 0.3-1.0% CSL e che le CFC leucemiche di questi topi coltivate ed espanse *in vitro* generano sempre leucemia se trapiantate in altri topi (“secondary recipients”). La frequenza delle CSL varia in funzione della lesione molecolare osservata: è più alta nelle forme con trascritto di fusione *MLL-AF9* e *MLL-ENL* che in quelle con trascritto di fusione *MLL-AF10*, *MLL-AF1p* e *MLL-GAS7*, mentre nelle LAM prodotte dalla

sovra-espressione retrovirale di *Meis* e *Hoxa9* varia tra lo 0.3% ed il 71%. Inoltre, le CSL non sono esclusivamente contenute nella popolazione leucemica Lin⁻CD34⁺CD38⁻, ma invece presentano un assetto immunologico estremamente eterogeneo (possono non esprimere il CD34, essere CD38, CD45RA, CD32, CD25 positive e non esprimono mai il CD90) anche all'interno di uno stesso paziente. Una caratteristica fondamentale che differenzia le CSL dalle cellule staminali ematopoietiche (CSE) normali consiste proprio nel fatto che le CSL non esprimono il CD90. Questo dato indica che molto verosimilmente la trasformazione leucemica avviene a livello di progenitori situati a valle della CSE normalmente non dotati di "self-renewal", cioè di solito privi della capacità di proliferare senza differenziarsi. Queste cellule acquisiscono il "self-renewal" perché la mutazione, costituita ad esempio da trascritti di fusione MLL-ENL, MOZ-TIF2, MLL-AF9, induce una riprogrammazione genica dei progenitori granulocito/macrofagici.

Lesioni citogenetiche/molecolari per dimostrare l'esistenza di cellule staminali preleucemiche

Studi iniziali

Lo studio della clonalità nelle pazienti di sesso femminile che presentavano un'eterozigosi per le varianti del gene della glucosio-6-fosfato deidrogenasi è stato il primo a suggerire l'esistenza di cellule staminali preleucemiche. In queste pazienti l'espressione di un solo specifico allele della G6PD indicava la monoclonalità della popolazione leucemica e la presenza di questo stesso allele in progenitori eritroidi e megacariocitari indicava la capacità della popolazione leucemica di maturare in modo del tutto normale. Il fatto poi che alcuni pazienti mantenesero questo stesso allele in tutte o in una frazione delle cellule ematopoietiche anche al momento della remissione completa suggeriva l'esistenza di remissioni clonali. Veniva così dimostrato che le mutazioni responsabili della trasformazione leucemica si sviluppavano in cellule staminali ematopoietiche, garantivano un vantaggio proliferativo e non alteravano il programma differenziativo della cellula. Uno studio condotto in pazienti con LAM t(8;21) e RUNX1-RUNT positiva in persistente remissione completa aveva ulteriormente suggerito l'esistenza di cellule staminali preleucemiche capaci di sopravvivere alla chemioterapia e di determinare remissioni clonali (6).

Infatti, questi pazienti seppure in remissione completa continuavano ad esprimere il gene di fusione non solo a livello di progenitori mieloidi, ma anche in singole colonie eritroidi e mieloidi prodotte *in vitro* a partire da una singola cellula staminale ematopoietica. Negli anni successivi lo studio di coppie di gemelli affetti da LAM aveva permesso di dimostrare che le cellule leucemiche di entrambi presentavano la stessa traslocazione a carico del gene *MLL*, mentre lo studio di copie di gemelli, uno affetto da leucemia acuta linfoblastica *TEL/AML1* positiva ed uno apparentemente sano, aveva indicato che il trascritto di fusione era espresso sia dalle cellule leucemiche del gemello leucemico sia dalle cellule del gemello sano che mostravano un processo maturativo normale. Quest'ultimo presentava un'ematopoiesi preleucemica molto simile a quella prodotta nel topo dal trapianto di

cellule staminali cordonali in cui era stato inserito il trascritto di fusione *TEL/AML1*.

Anche nella leucemia mieloide cronica (LMC) e in altri disordini mieloproliferativi le CSE possono funzionare da serbatoio per lo sviluppo di ulteriori mutazioni. Nella LMC *BCR-ABL* positiva il trascritto di fusione è presente sia in cellule B che nella stessa CSE e i pazienti sottoposti a terapia con inibitori della tirosin kinasi *ABL1* possono sì raggiungere remissioni complete di lunga durata, ma possono continuare a presentare CSE apparentemente normo-funzionanti che, nonostante la “clearance” della popolazione leucemica, mostrano continue variazioni nei livelli di espressione del trascritto *BCR-ABL*. Proprio questa variabilità nell’espressione del trascritto di fusione fa sì che queste CSE apparentemente normo-funzionanti possano durante il decorso clinico sviluppare nuove mutazioni che le rendano resistenti ai vari inibitori delle tirosin kinasi. Anche nella leucemia linfatica cronica a cellule B la CSE potrebbe essere coinvolta nello sviluppo della malattia e potrebbe funzionare da serbatoio per lo sviluppo di ulteriori mutazioni. Infatti, in questo disordine onco-ematologico la tendenza a produrre popolazioni clonali B è una proprietà intrinseca della cellula, già acquisita a livello di CSE. Le CSE di questi pazienti esprimono geni necessari al commissionamento linfoide e, similmente quanto si osserva nella linfocitosi monoclonale, differenziano in popolazioni B monoclonali o oligoclonali (7).

Modelli murini

Questi modelli sperimentali hanno tentato di distinguere tra mutazioni somatiche che più alterano il “self-renewal” delle CSE e mutazioni che più ne alterano l’attività proliferativa. Inizialmente, uno studio aveva analizzato il fenotipo leucemico prodotto nel topo dall’“internal tandem duplication” (ITD) del gene *FLT3*. Era stato osservato che questi topi sviluppavano una malattia caratterizzata da un numero estremamente ridotto di CSE, dalla perdita di “spleen colony forming unit” e dalla presenza di un gran numero di monociti e granulociti maturi. Sul piano fenotipico si trattava di un disordine mieloproliferativo che molto somigliava alla leucemia mielomonocitica cronica. Un altro studio aveva poi osservato che la ITD del gene *FLT3* determinava un’iniziale espansione del compartimento staminale seguita da un suo progressivo esaurimento. In conclusione la ITD del gene *FLT3* alterava il “self-renewal” della CSE ed era molto verosimilmente un evento tardivo nel processo di leucemogenesi responsabile della progressione della malattia. Altri studi che avevano invece analizzato modelli murini in cui l’espressione del gene *TET2* era stata bloccata (*TET2*^{-/-}), avevano riportato progressive alterazioni del midollo osseo ed un’espansione dell’ematopoiesi extra-midollare. Le CSE di questi topi erano più numerose del normale e possedevano una capacità ricostitutiva dell’ematopoiesi superiore a quella dei topi con gene “wild-type”. Inoltre, esperimenti di co-trapianto avevano indicato che le cellule staminali di topi *TET2*^{-/-} possedevano un vantaggio proliferativo rispetto a quelle dei topi con gene “wild-type”. Questi dati suggerivano quindi che *TET2* fosse un gene molto importante per il mantenimento e l’espansione del compartimento staminale e che la sua mutazione potesse essere un evento iniziale nel processo di leucemogenesi.

Altri studi avevano indicato che la perdita del gene DNMT3A determinava dopo diverse procedure di trapianto un'importante aumento nel numero di CSE che però mostravano importanti difetti maturativi. Questi ultimi erano probabilmente causati dal fatto che la mutazione DNMT3A alterava lo stato di metilazione delle regioni CpG di molti geni che avevano un ruolo cruciale nel processo differenziativo della CSE. Il mancato silenziamento di questi geni impediva alla CSE di seguire il suo normale iter maturativo. Altri studi che avevano analizzato modelli murini con mutazione del gene IDH1 non avevano osservato alterazioni nel "self-renewal" della CSE. Invece, l'introduzione della mutazione IDH1 (R132H) nella linea mieloide determinava un'espansione dei progenitori mieloidi, una riduzione della cellularità midollare con sviluppo di ematopoiesi extra-midollare. Questi risultati dimostravano che la mutazione non alterava le funzioni della CSE, ma questo fatto non escludeva che questa mutazione potesse svolgere un ruolo chiave nei processi di leucemogenesi.

"Massively parallel sequencing"

Inizialmente, l'analisi dei "Single Nucleotide Polymorphism" (SNP) arrays in pazienti pediatriche affette da leucemia acuta linfoblastica aveva indicato che la recidiva leucemica era causata da una popolazione clonale preesistente a quella individuata alla diagnosi. Questa osservazione era basata sul fatto che la popolazione leucemica della recidiva presentava solo alcune delle mutazioni presenti nella popolazione leucemica dell'esordio clinico e suggeriva l'esistenza di CSE preleucemiche. Successivamente, l'analisi con "Whole Exome Sequencing" di colonie derivate da una singola CSE di soggetti sani aveva dimostrato che con il progredire dell'età la CSE acquisisce un sempre maggior numero di mutazioni, per la maggior parte "passenger mutations". Queste ultime, pur non avendo alcun impatto sulla trasformazione neoplastica, confermavano che le neoplasie sono malattie dell'anziano ed indicavano che per lo sviluppo di una neoplasia è richiesto un lungo intervallo di tempo necessario perché una data filiera cellulare non dotata di instabilità genica acquisisca diverse mutazioni, solo alcune responsabili della trasformazione neoplastica. Questo concetto era stato stressato anche da un altro studio che aveva individuato mutazioni ricorrenti a carico del gene TET2 in meno del 5% circa dei soggetti sani di sesso femminile con ematopoiesi clonale all'analisi del pattern di inattivazione del cromosoma X (8). Sebbene questi soggetti non mostrassero alcuna malattia ematologica, questa osservazione indicava che nel contesto di un'ematopoiesi clonale si possono sviluppare a livello delle CSE "driver mutations" che potrebbero determinare una trasformazione leucemica precoce.

Recentemente, questa ipotesi è stata confermata da studi che hanno impiegato antigeni leucemia-associati [gli antigeni mieloidi CD47 e CD99 e la "T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3" (TIM3)] per isolare al "Fluorescence Activated Cell Sorting" cellule staminali normali residue in pazienti affetti da LAM (9). Le cellule così ottenute generavano *in vitro* colonie mieloidi ed eritroidi ed *in vivo* nei modelli di xenotrapianto cellule mieloidi CD33+ e cellule linfoidi CD19+ e quindi si comportavano da vere e proprie CSE. Questo compor-

tamento faceva ritenere che questa frazione cellulare potesse effettivamente contenere cellule staminali preleucemiche. Tale possibilità venne successivamente confermata da uno studio che aveva isolato ed analizzato con “sequencing” le CSE normali residue di pazienti affetti da LAM FLT3 ITD positiva (10). Le CSE così isolate contenevano gran parte anche se non tutte le mutazioni presenti nella popolazione leucemica ed il “sequencing” delle singole colonie aveva addirittura permesso di determinare la sequenza temporale di sviluppo delle varie mutazioni. Studi ancora più recenti che hanno impiegato l’analisi fenotipica in combinazione con il “sequencing” hanno confermato che le CSE dotate di “self-renewal” possono acquisire un numero progressivo di mutazioni tra cui “drivers mutations”, hanno sottolineato il contributo fornito dalle cellule staminali preleucemiche alla linfopoiesi specie alla diagnosi, hanno stressato la capacità di queste cellule di mantenere inalterato il loro normale processo differenziativo nonostante la presenza di numerose e progressive “driver mutations” e hanno infine indicato la capacità di alcune mutazioni preleucemiche di garantire un vantaggio proliferativo. Questi studi hanno altresì sottolineato che le cellule preleucemiche possono sopravvivere alla citotossicità della chemioterapia, essere presenti al momento della remissione ed essere responsabili di una successiva recidiva (11, 12). In particolare, è stato osservato che le mutazioni contenute nelle cellule staminali preleucemiche isolate al momento della diagnosi erano le stesse presenti nelle CSE e nei progenitori ematopoietici isolati al momento della remissione. Mutazioni assenti alla diagnosi erano pure assenti in remissione, mentre mutazioni presenti alla diagnosi erano pure presenti alla recidiva.

Altri studi avevano analizzato la sequenza temporale di acquisizione delle varie mutazioni ed avevano proposto che le mutazioni dei geni che controllano lo stato di metilazione del DNA, le modificazioni degli istoni, la topologia della cromatina si sviluppano nelle fasi precoci della leucemogenesi, mentre quelle che causano l’attivazione del “signalling” e della proliferazione cellulare sono quasi sempre eventi tardivi. In particolare, l’analisi di quindici pazienti affetti da LAM aveva dimostrato che in dodici pazienti la mutazione del gene *DNMT3A* era un evento iniziale nel processo di leucemogenesi, mentre le mutazioni dei geni *NPM1* e *FLT3* non lo erano mai (12). Queste osservazioni erano state confermate da altri Autori che avevano anche osservato la stabilità di alcune mutazioni durante tutto il decorso clinico: alcune mutazioni erano presenti al momento della diagnosi ed in recidiva, mentre altre venivano acquisite o perse al momento della recidiva. Un’eccezione a questa regola era rappresentata dalla mutazione del gene *NPM1* presente sia al momento della diagnosi che in recidiva, ma assente nelle cellule staminali preleucemiche (13).

Rilevanza clinica e conclusioni

La presenza di mutazioni preleucemiche nella popolazione leucemica crea nuove problematiche per il trattamento di questi disordini onco-ematologici. Queste mutazioni potrebbero essere necessarie solo alla trasformazione neoplastica, ma non essere richieste per la persistenza della malattia. Recentemente, un modello muri-

no di xenotrapianto di cellule leucemiche umane marcate dalla ITD del gene *FLT3* e da una mutazione che poteva essere repressa del gene *IDH2* ha però dimostrato che il silenziamento della mutazione *IDH2* nelle cellule francamente leucemiche causava la scomparsa del fenotipo leucemico (14). Questo risultato indicava che il silenziamento di mutazioni preleucemiche può costituire un efficace procedura terapeutica nelle LAM perché garantendo l'eliminazione delle cellule staminali preleucemiche potrebbe evitare il problema delle remissioni clonali e mettere il paziente al riparo da eventuali recidive future. Viceversa, se questo obiettivo non fosse raggiungibile sarebbe necessario eseguire due tipi di terapia: una in grado di eradicare la popolazione francamente leucemica, l'altra in grado di eradicare le cellule staminali preleucemiche. D'altro canto, un'umentata efficacia della terapia anti-leucemica potrebbe rivelare se l'incidenza della recidiva causata dalla persistenza delle cellule staminali preleucemiche vari in funzione del tipo di lesione citogenetica/molecolare che esse presentano.

L'esistenza di mutazioni preleucemiche ha anche importanti implicazioni anche per quanto concerne la valutazione ed il monitoraggio di un'eventuale malattia minima residua (MMR), uno dei parametri più strettamente connesso con il rischio di recidiva. Di solito, questo tipo di monitoraggio viene eseguito impiegando la citometria a flusso o la reazione polimerasica a catena per specifiche mutazioni. Il monitoraggio di un'eventuale MMR basato sulla determinazione di una mutazione preleucemica in CSE e progenitori ematopoietici fornirebbe determinazioni sicuramente molto più elevate rispetto a quelle che vengono oggi usualmente ottenute dall'analisi delle cellule francamente leucemiche, ma forse garantirebbe una più precisa valutazione di un'eventuale MMR. Il superamento di questa problematica potrebbe essere ottenuto grazie alla quantificazione della mutazione del gene *NPM1*, ad oggi ritenuta un metodo di monitoraggio molto efficace (15).

Bibliografia

1. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nature Reviews*. 2012; 12: 599-612.
2. Welch JS, Ley TJ, Link DJ, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. 2012; 159: 264-278.
3. Wojiski S, Guibal FC, Kindler T, et al. PML-RAR α initiates leukemia by conferring properties of self-renewal to committed promyelocytic progenitors. *Leukemia*. 2009; 23: 1462-1471.
4. Wiseman DH, Greystoke BF, Somervaille TCF. The variety of leukemic stem cells in myeloid malignancies. *Oncogene*. 2014; 33: 3091-3098.
5. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute leukaemia after transplantation in SCID mice. *Nature*. 1994; 367: 645-648.
6. Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97: 7521-7526.
7. Corces-Zimmerman MR, Majeti R. Pre-leukemic evolution of hematopoietic

- stem cells: the importance of early mutations in leukemogenesis. *Leukemia*. 2014; 28: 2276-2282.
8. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat. Gen.* 2012; 44: 1179-1181.
 9. Jan M, Chao MP, Cha AC, et al. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108: 5008-5014.
 10. Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, et al. Clonal evolution of pre-leukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Sci Transl. Med.* 2012; 4: 140ra118.
 11. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 2014; 506: 328-333.
 12. Corces-Zimmerman MR, Hong WJ, Weissman IL, et al. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111: 2548-2563.
 13. Krönke J, Bullinger L, Teleanu V, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013; 122: 100-108.
 14. Kats LM, Reschke M, Taulli R, et al. Proto-oncogenic role of mutant IDH2 in leukemia initiation and maintenance. *Cell Stem Cell*. 2014; 14: 329-341.
 15. Krönke J, Schlenk RF, Jensen KO, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 2709-2716.

Secretomi: nuovi farmaci nella riparazione tissutale

Cesare G. Perotti

Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Responsabile Aferesi Terapeutica e Produttiva, Laboratorio di Manipolazione Cellulare, Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia

La terapia cellulare intesa come possibilità di rigenerare o meglio riparare tessuti e/o organi danneggiati è comunemente intesa come un'azione derivante dalla capacità replicativa e differenziativa delle cellule staminali siano esse ematopoietiche o mesenchimali.

Eleganti studi recenti hanno invece evidenziato come la riparazione tissutale possa avvenire in modo molto efficace attraverso il rilascio dalle cellule stesse di “sostanze” autocrine e paracrine relegando la differenziazione cellulare ad un ruolo più modesto. Alcuni autori addirittura ritengono che fino all'80% dell'effetto terapeutico esercitato dalle cellule staminali adulte debba essere messo in relazione all'effetto paracrino. Il moderno concetto che sta quindi emergendo nel campo della medicina rigenerativa tissutale è di comparare la cellula, staminale e matura, ad un vero e proprio farmaco, capace di liberare una notevole quantità di sostanze eterogenee biologicamente attive, a loro volta capaci di innescare a livello locale, una serie di meccanismi che portano alla riparazione del tessuto o dell'organo lesionato.

Definizione

Oggi, il termine “ secretoma” comprende quell'insieme di molecole biologicamente attive rilasciate dalle cellule staminali, in altri termini si può parlare di “stem cell released molecole (SMR)”. Questa definizione include proteine, microRNA, growth factors, esosomi e proteasomi. Tutte queste molecole attivano una gran quantità di pathways biologici che provvederanno in vario grado e modo a supportare i meccanismi riparativi nei vari organi e tessuti.

L'AIFA (Associazione Italiana del Farmaco) ha ben recepito questo nuovo concetto biologico ed ha provveduto a porre sotto la propria egida la terapia cellulare, con la conseguenza che oggi la cellula va modernamente intesa come un farmaco e deve sottostare a tutte le severe regolamentazioni che guidano l'impiego dei farmaci.

Azioni paracrine delle cellule staminali adulte

Come accennato precedentemente, le cellule staminali svolgono molteplici azioni attraverso le loro proprietà secretive, in particolare:

- Antimicrobica,
- switching back del differenziamento,
- wnt signalling (controllo dell'omeostasi della nicchia),
- costruzione di matrice extracellulare,
- azione immunomodulante sul sistema immunitario,
- riparazione ferite,
- rigenerazione ossea,
- azione a livello dei tessuti del sistema urinario,
- azione sull'epitelio intestinale,
- azione sul tessuto cerebrale lesionato,
- rilascio di piccole molecole come esosomi e proteasomi con multiple azioni terapeutiche.

La visione apparentemente riduzionistica della funzione delle cellule staminali deve essere sostituita da una visione comparabile a quella che Einstein, riferendosi al pensiero di Ernst Mach (Mach's Principle), aveva riguardo all'inerzia di ogni sistema che "non è altro che il risultato dell'interazione del sistema con il resto dell'universo".

Infatti, ogni molecola o piccolissima sostanza ha un significato biologico solo se integrata in un sistema fisicamente e biochimicamente interconnesso capace, nel nostro caso, di dare il giusto input al feto della cellula staminale che poi trasmette ai tessuti adiacenti le informazioni corrette per ripararsi. I vantaggi legati all'impiego di SRM con finalità terapeutiche invece che delle cellule staminali stesse sono molteplici. In primo luogo le cellule staminali possono morire precocemente e avere un homing diverso dal sito del danno, mentre le SRM possono essere veicolate e dosate con precisione prima del loro inoculo dove la loro funzione è necessaria.

La produzione controllata in condizioni GMP di molecole derivate da tipi cellulari diversi sarà di fatto assimilabile ad una vera e propria produzione farmaceutica, quindi sottoposta a rigidissimi controlli non solo qualitativi ma anche quantitativi.

Fonti cellulari

Le principali e più studiate fonti cellulari alle quali attingere per poter disporre delle cellule staminali e quindi del relativo secretoma sono il midollo osseo tramite aspirato midollare classico, il sangue del cordone ombelicale e le cellule staminali da sangue periferico dopo opportuna stimolazione con fattore di crescita. Naturalmente esistono in natura altre possibilità di "approvvigionamento" da tessuti come quello adiposo, quello placentare e la gelatina di Wharton. In questi casi la rarità delle cellule e le procedure più indaginose richieste per il loro isolamento e purificazione hanno per ora limitato gli studi soprattutto di ricerca clinica traslazionale.

Meccanismo d'azione e ruolo funzionale del secretoma

Angiogenesi e rivascularizzazione

Il grande interesse nel potenziale ruolo terapeutico del secretoma è legato al grande spettro di malattie (ischemia degli arti, malattia aterosclerotica, malattia coronarica) che potrebbero beneficiare dell'azione angiogenetica dei fattori rilasciati. Non solo, di tale azione pro-angiogenetica potrebbero beneficiare anche le patologie croniche del rene e del fegato nelle quali è vitale un aumento dell'apporto di ossigeno ai tessuti danneggiati e/o fibrotici.

Numerosi fattori angiogenetici sono stati identificati nel secretoma usando tecniche in ELISA, antibody based assays e tecniche di immunistochemica. Questi comprendono vascular endothelial growth factors (VEGF), interleuchina 6 (IL6), angiopoietina-1 e altri. È stato inoltre dimostrato che la secrezione di questi fattori può essere modificata da numerose citochine in condizioni di ipossia. Modelli animali di arteriopatia periferica, ischemia/stroke e di vescica neurogena hanno dimostrato la fattibilità e l'efficacia di questo approccio terapeutico

Modulazione dell'infiammazione e dell'immunità

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) e i loro relativi prodotti possiedono capacità immunomodulatorie e sono in grado di indurre tolleranza

Queste cellule esprimono sulla loro superficie l'MHC-I ma mancano dell'espressione di MHC-II, CD40, CD 80 e CD 86. La mancanza di molecole co-stimolatorie quindi spesso fallisce nell'indurre una risposta immune. Queste proprietà possono essere sfruttate nel tentativo di controllare malattie potenzialmente mortali come la GvHD post trapianto di midollo osseo, il rigetto del trapianto di organo solido o gravi malattie autoimmuni come il morbo di Crohn.

Proprietà anti-apoptotiche

Le MSC ed i loro prodotti sono capaci di ridurre l'espressione di numerosi fattori pro-apoptotici (Bax e clived caspase-3) e di aumentare di converso livelli di Bcl-2, un'importante proteina anti-apoptotica.

L'espressione esaltata di Akt da parte delle MSC è in grado di inibire il rimodellamento ventricolare e di ripristinarne la funzione in breve tempo. Il mezzo condizionato ottenuto dalle Akt-MS sottoposte ad ipossia inibisce marcatamente i processi di apoptosi proteggendo di fatto la cellula dal danno indotto.

A supportare ulteriormente l'ipotesi paracrina è la dimostrazione che diversi geni codificanti per mediatori anti-apoptosi (VEGF, FGF-2, IGF-1, HGF) sono up-regolati in risposta ad un ambiente ipossico.

Wound healing e riparazione tissutale

L'effetto favorente la guarigione delle ferite e della riparazione tissutale più in generale è stata testata con la diretta applicazione del secretoma ottenuto dalle colture delle MSC in vitro. I cosiddetti "mezzi condizionat" sono stati capaci di indurre la riparazione dei tessuti lesi in assenza delle cellule stesse (stem cell therapy without cells).

Studio del secretoma

Attualmente lo studio del secretoma nella sua variegata composizione è condotto essenzialmente con studi in vitro.

La prima fase consiste nell'individuazione della fonte cellulare seguita dall'isolamento delle cellule stesse. È fondamentale per condurre studi corretti ottenere una popolazione di cellule ad elevata purezza. La seconda fase consiste poi nell'eseguire colture cellulari in condizioni di sterilità e incubare le cellule in un "serum free media" per evitare la contaminazione del secretoma con le proteine dei comuni mezzi di coltura.

La proteomica è utilizzata in modo estensivo per studiare il secretoma insieme agli studi di genomica. Il primo studio in questo senso è del 2003 (Mangi et al.) seguito poi da numerosi altri con l'impiego di tecniche convenzionali (gel, cromatografia ecc.) e nuove metodologie come la spettrometria quantitativa di massa, protein microarrays e bioinformatica.

Con queste tecniche sono state identificate 187 proteine secrete e 118 di queste sono state prodotte in quantità elevate dopo l'esposizione delle MSC in particolare al tumor necrosis factor alfa (TNF α).

Prospettive future

Allo stato attuale esistono differenti approcci volti ad esaltare l'attività paracrina delle cellule staminali. Sostanzialmente si può intervenire attraverso:

- 1) il pre-condizionamento delle cellule staminali;
- 2) la modificazione della cellula staminali attraverso il transfer genico.

Il cosiddetto preconditionamento può essere ottenuto attraverso l'esposizione delle cellule ad un ambiente ipossico oppure a differenti cocktail di citochine. Le cellule esposte ad un ambiente a bassa tensione di ossigeno up-regolano l'espressione di molti fattori favorenti la protezione cellulare e liberano quantità importanti di fattori pro-angiogenici. Tutte queste proprietà potranno essere ben sfruttate in un prossimo futuro programmando vere e proprie "cell factories" dove produrre i fattori e le citochine richieste per la riparazione tissutale.

La modificazione genetica tramite l'inoculo nelle cellule staminali (via virale e non) di geni capaci di esaltare la produzione di fattori trofici specifici è un'altra possibilità prevista per un futuro prossimo anche se più complessa ed indaginosa rispetto alle tecniche di pre-condizionamento sopra menzionate.

Naturalmente esistono limitazioni all'utilizzo della terapia con secretoma che includono il loro trasporto tissutale, la farmacocinetica, la definizione della quantità idonea e la tempistica di somministrazione.

La scelta della fonte cellulare più idonea (midollo osseo, cordone ombelicale, ecc.) è ancora oggetto di ricerca e dibattito; attualmente infatti risulta difficile indicare con certezza la cellula staminale più idonea ad innescare i meccanismi di riparazione protezione cellulare. È anche possibile che risulti più efficace l'utilizzo dell'intero network delle cellule mononucleate ottenuto da ciascuna fonte piuttosto che la singola, specifica entità cellulare. Infatti non si può affatto esclu-

dere che sia proprio l'intera galassia delle citochine e dei fattori di crescita secreti sia da cellule francamente immature come le cellule staminali che da cellule mononucleate mature a rappresentare il cocktail vincente per la medicina ripartiva tissutale

Bibliografia essenziale

1. Tran C, Damaser MS. Stem cells as drug delivery methods: Application of stem cell secretome for regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014.
2. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine, *Biomed Res Int.* 2014.
3. Maguire G. Stem cell therapy without the cells. *Commun Integr Biol.* 2013.
4. Salgado AJ, Gimble JM. Secretome of mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine, *Biochimie.* 2013.
5. Pavo N, Zimmermann M, Pils D, Mildner M, Petrás Z, Petneházy Ö, Fuzik J, Jakab A, Gabriel C, Sipos W, Maurer G, Gyöngyösi M, Ankersmit HJ. Longacting beneficial effect of percutaneously intramyocardially delivered secretome of apoptotic peripheral blood cells on porcine chronic ischemic left ventricular dysfunction. *Biomaterials.* 2014.
6. El Omar R, Beroud J, Stoltz JF, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies?, *Tissue Eng Part B Rev.* 2014.
7. Lavoie JR, Rosu-Myles M. Uncovering the secretomes of mesenchymal stem cells. *Biochimie.* 2013.
8. Maumus M, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes, *Biochimie.* 2013.
9. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. 2013.
10. Mirotsov M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J, Gnecci M, Dzau VJ. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2011.

Mesenchymal stromal cells: characterization, production and therapeutic use

Mauro Krampera

Sezione di Ematologia, Laboratorio di Ricerca sulle Cellule Staminali,
Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Verona e Azienda Ospedaliera
Universitaria Integrata Verona (mauro.krampera@univr.it, www.stemcellreslab-verona.it)

Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) represent one of the most promising tools in cellular therapy and regenerative medicine. First described by Alexander Friedenstein, in the 1960s/70s (1), as mesodermic-derived nonhematopoietic bone marrow (BM) cells adhering to plastic that developed into colonies with a fibroblastic appearance, MSCs were called stem cells of skeletal tissues (e.g., bone, cartilage) (2), and the first clinical use was their combination with biomaterials to repair long bone fractures (3).

MSCs can be obtained from tissues originating from distinct development programs and containing distinct pools of endogenous progenitor cells. MSCs or MSC-like cells have been identified in almost all tissues of the fetus, neonate, and adult, such as bone marrow (1, 4), adipose tissue (5) and many other tissues and organs (6), including lymphoid tissues (7, 8). MSCs have been identified in vivo as peri-vascular cells expressing the STRO1, CD146 and 3G5 antigens (9-12). Despite a close relationship between these two cell types in terms of surface phenotype and qualitative in vitro assays (12, 13), MSCs in general lack the contractility of pericytes and may show marked differences in gene expression (13) and by the use of more rigorous in vivo assays (14). In addition, some authors have described a neuro-ectodermal origin of MSCs through either Sox1+ neuro-epithelial cells (15) or Nestin+ precursors (16). CFU-F-forming cells from bone marrow can be obtained through the prospective isolation of CD45-negative MSCs with anti-STRO1 (9), anti-CD271 (17) or anti-CD146 (18) antibodies or selection for nestin-expressing cells (16). Nevertheless, not enough data concerning purified MSCs are available to assume that MSC progenitors/pericytes have the same properties of ex vivo-expanded adherent MSCs. Therefore, almost the entire amount of data concerning MSCs refers to as adherent expanded MSCs.

The International Society for Cellular Therapy described the common minimal criteria for cells in the MSC category: cells adhering to plastic; able to form colony-forming unit fibroblasts (CFUFs); positive for membrane markers CD90, CD73, and CD105 but negative for the hematopoietic molecules CD45, CD34, and HLA-DR; and capable of differentiating via osteoblastic, chondrocytic, and adipocytic pathways (19). These main characteristics apply to cultured BM-MSCs, but some

differences appear depending on the tissue of origin (e.g., adipose tissue-derived MSC expression of CD34 and CD54) (20). As well, MSCs from different tissues are not equivalent in phenotype and function (21).

MSCs of different tissue sources (7, 8, 22), as well as their stromal progeny (23), can interact with, influence and even profoundly affect the *in vitro* functions of most effector cells involved in innate or adaptive immunity (24). These properties have been the subject of many reviews (25-28). However, some differences have been described among MSCs of different tissue origin (8, 12). Recently, MSC Committee of ISCT published a working proposal aimed at favoring the standardization of the MSC immunological characterization based on a critical view of literature data (29). Thereafter, a general debate has started, leading to different proposals (30). *Ex vivo*-expanded MSCs showing immunosuppressive properties were exploited in a wide range of phase 2 clinical trials from treatment of drug-resistant graft-versus-host disease (31) to organ transplantation (32). In addition, MSCs have trophic effects mediated by their released growth factors and cytokines (33). Cells referred to as MSCs originating from various tissues are now widely used in clinical trials to treat different conditions, including: hematopoietic stem cell (HSC) transplantation (for improvement of engraftment and GvHD treatment), bone and cartilage repair, cardiovascular disorders, and wound healing. Numerous clinical trials have started or will begin (see www.clinicaltrials.gov) (34); however, the efficacy and the mechanisms of action of MSCs are still matter of debate (35-39).

The translation of research-based protocols into clinical-grade MSC production requires specific procedures typically used by pharmaceutical industry for the production of injectable drugs in classified clean rooms, in accordance with Good Manufacturing Practice (GMP) rules, which were firstly promulgated by the U.S. Food and Drug Administration to guarantee that products are safe, pure and effective (40). MSCs are considered in the context of Human cells and tissues or Cellular and Tissue-based Products (HCT/Ps), and their production must comply with current Good Tissue Practice requirements, under the Code of Federal Regulations (CFR), as their use *in vivo* for trophic, immune regulatory and regenerative purposes occurs after profound *ex vivo* cell manipulation (i.e. expansion in culture). In Europe, MSCs are somatic cell-therapy products, referred to as advanced therapy medicinal products (ATMPs), and GMP rule were acknowledged and implemented by European Commission through the Directive 2003/94/EC and EC 1394/2007, according to which MSCs are considered as advanced therapy medicinal products (ATMPs). Thus, many aspects of MSC culture protocols need to be monitored, including batch records of production, quality controls, quality assurance management, contract manufacture, staff, equipment certifications and validations. Guideline on the risk-based approach was recently published by the Committee for Advanced Therapies (CAT) of EMA (Guideline on the risk-based approach according to annex I, part IV of directive 2001/83/EC for ATMPs: EMA/CAT/CPWP/686637/2011). The guideline defines risks, for example, unwanted targeting of cells/organs, unwanted tissue and tumor formation; risk factors, as qualitative or quantitative characteristics contributing to a specific risk

following administration of ATMPs. All available information on risks and risk factors should be integrated for building risk profiling, and bio-distribution is one of the main preclinical data giving information in different risks and risk factors. *Ex vivo* MSC expansion implies the potential risks of contamination by adventitial agents and xenogenic proteins, genomic instability and loss of MSC phenotype. Consequently, GMP-based procedures are aimed at releasing a batch of product with clear and measurable evidence of safety and cell identity. According to the World Health Organization (WHO) good practices for pharmaceutical quality control laboratories (WHO Technical Report Series, No. 957, Annex1, 2010), quality controls are defined as “all the measures taken, including the setting of specifications, sampling, testing and analytical clearance, to ensure that raw materials, intermediates, packaging materials and finished pharmaceutical products conform with established specifications for identity, strength, purity and other characteristics”. Thus, the quality controls for MSC batch release must include phenotypic analysis (absence of hematopoietic contamination, expression of mesenchymal markers), quantification of cell expansion (population doublings), assessment of clonogenicity (CFU-F quantification), mesodermic differentiation potential, genomic stability and immune regulatory properties (34-40).

Bibliografia

1. Friedenstein AJ, Gorskaja FJ, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematology*. 1976; 4: 267-274.
2. Caplan AI. The mesengenic process. *Clinics in Plastic Surgery*. 1994; 21: 429-435.
3. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *NEJM*. 2001; 344: 385-386.
4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284: 143-147.
5. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002; 13: 4279-4295.
6. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006; 119: 2204-13.
7. Ame-Thomas P, Maby-El Hajjami H, Monvoisin C, Jean R, Monnier D, Caulet-Maugendre S, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood*. 2007; 109: 693-702.
8. Krampera M, Sartoris S, Cosmi L, Pasini A, Angeli R, Liotta F, et al. Immune regulation by mesenchymal stem cells derived from adult spleen and thymus. *Stem Cells Dev*. 2007; 16: 797-810.

9. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994; 84: 4164-4173.
10. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003; 18: 694-704.
11. Brachvogel B, Moch H, Pausch F, Schlotzer-Schrehardt U, Hofmann C, von der Mark K, et al. Perivascular cells expressing annexin A5 define a novel mesenchymal stem cell-like population with the capacity to differentiate into multiple mesenchymal lineages. *Development*. 2005; 132: 2657-2668.
12. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 301-313.
13. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA Jr, Orellana MD, Freitas MC, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol*. 2008; 36: 642-654.
14. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2003; 2: 976-981.
15. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*. 2007; 129: 1377-1388.
16. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and hematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010; 466: 829-834.
17. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Delilieri GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol*. 2002; 30: 783-791.
18. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007; 131: 324-336.
19. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8: 315-317.
20. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003; 174: 101-109.
21. Phinney DG, Sensebé L. Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts. *Cytotherapy*. 2013; 15: 140-145.
22. Ricciardi M, Malpeli G, Bifari F, Bassi G, Pacelli L, Nwabo Kamdje AH, et al. Comparison of epithelial differentiation and immune regulatory properties of mesenchymal stromal cells derived from human lung and bone marrow. *PLoS One*. 2012; 7: e35639.
23. Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F. The antiproliferative effect of me-

- senchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol.* 2007; 179: 2824-2831.
24. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002; 99: 3838-3843.
 25. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 726-736.
 26. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007; 110: 3499-3506.
 27. Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia.* 2011; 25: 1408-14.
 28. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol.* 2014; 15: 1009-1016.
 29. Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L; MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy.* 2013; 15: 1054-1061.
 30. Galipeau J, Krampera M. The challenge of defining mesenchymal stromal cell potency assays and their potential use as release criteria. *Cytotherapy.* 2015; 17: 125-127.
 31. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet.* 2004; 363: 1439-1441.
 32. Tan J, Wu W, Xu X, et al. Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2012; 307: 1169-1177.
 33. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells.* 2007; 25: 2896-2902.
 34. Sensebé L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* 2010; 98: 93-107.
 35. Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, Wang CY. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med.* 2013; 19: 35-42.
 36. Phinney DG, Galipeau J, Krampera M, Martin I, Shi Y, Sensebe L. MSCs: science and trials. *Nat Med.* 2013; 19: 812.
 37. Pittenger MF. MSCs: science and trials. *Nat Med.* 2013; 19: 811.
 38. Fibbe WE, Dazzi F, LeBlanc K. MSCs: science and trials. *Nat Med.* 2013; 19: 812-813.
 39. Bianco P. Reply to MSCs: science and trials. *Nat Med.* 2013; 19: 813-814.
 40. Sensebé L, Bourin P, Tarte K. Good manufacturing practice production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum Gene Ther.* 2011; 22: 19-26.

Cellule tumorali circolanti e cancro della mammella

Bianca Rovati, Sara Mariucci, Sara Delfanti, Paolo Pedrazzoli

SC Oncologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo

Nonostante importanti avanzamento nella diagnostica e nei trattamenti che hanno portato ad un significativo miglioramento della sopravvivenza, il tumore della mammella rimane la più comune neoplasia diagnosticata nelle donne ed è responsabile del 15% di tutte le morti per cancro (1). Sebbene al momento della diagnosi, la maggior parte delle pazienti non abbia evidenza di secondarismi, circa il 30%, svilupperà una malattia metastatica. Quest'ultima, tranne casi limitati, è considerata una malattia non più guaribile e pertanto il programma terapeutico è mirato principalmente a prolungare la sopravvivenza globale e a migliorare la qualità della vita (2). A tutt'oggi, l'imaging morfologica e funzionale standard non fornisce informazioni adeguate sulla biologia del tumore e sulla presenza di eventuali micrometastasi, limitando la possibilità di prevedere il potenziale metastatico del tumore (3). Pertanto, vi è un urgente bisogno di trovare nuovi biomarcatori, in grado di monitorare l'efficacia delle terapie adiuvanti, rilevare lo sviluppo precoce di (micro) metastasi e valutare le risposte terapeutiche nella malattia avanzata.

Negli ultimi dieci anni, l'identificazione delle cellule tumorali disseminate (DTC) nel midollo osseo e delle cellule tumorali circolanti (CTC) nel sangue periferico, ha consentito di fornire informazioni utili per la gestione clinica del tumore della mammella prevedendo precocemente, rispetto ai metodi di radiodiagnostica tradizionali, un potenziale beneficio terapeutico.

La presenza di cellule tumorali nel sangue periferico è stato ipotizzato per la prima volta nel 1869 da Thomas Ashworth (4). Da allora, l'esistenza, l'origine e il loro significato clinico sono oggetto di ricerca e di ampia discussione nella comunità scientifica. Alla fine degli anni '70, l'introduzione di tecniche di immunocitochimica sensibili e specifiche ha portato ad un rinnovato interesse per l'identificazione delle CTC e la loro possibile associazione con la metastatizzazione precoce nei tumori solidi. Evidenze sperimentali e cliniche nel carcinoma mammario hanno inoltre suggerito che il profilo immunocitochimico del tumore, in particolare l'assetto ormonale, e il profilo delle CTC del tumore primario potrebbe cambiare nel corso della malattia (5), determinando una discordanza sostanziale tra lo stato dei recettori del tumore primario e quello del sito secondario (6).

Un aspetto di particolare interesse nello studio delle CTC riguarda la valutazione della cosiddetta transizione epitelio-mesenchimale (EMT), processo complesso secondo cui le cellule tumorali perdono la morfologia epiteliale e acquisiscono caratteristiche mesenchimali; tale evento è fondamentale per la progressione tumorale e correla con la capacità invasiva e il potenziale metastatico del tumore. Le cellule sottoposte a questa transizione mostrano ridotte proprietà di adesione cellula-cellula, alterata morfologia e la perdita dell'espressione di markers epiteliali come l'EpCAM, rendendo estremamente difficile la loro identificazione con le tecniche che adottano questo marker per identificare le CTC. Inoltre, le cellule che vanno incontro a tale EMT presentano caratteristiche di staminalità (Cellule Staminali Circolanti - CSC) e pertanto necessitano di opportuni marcatori per la loro rilevazione. La staminalità permette loro di attecchire in una sede diversa da quella di origine e di diffondere il tumore, attraverso la successiva MerT (Mesenchymal Epithelial re-Transition).

Considerando la centralità di questo sottogruppo di CTC nel processo di metastatizzazione, molti studi si sono focalizzati su informazioni biologiche in grado di chiarire i meccanismi di resistenza alle terapie oncologiche e definire approcci terapeutici mirati al controllo di questi fenomeni.

Infine, dal momento che le biopsie tumorali sono invasive, soprattutto in aree non facilmente accessibili, la possibilità di valutare le caratteristiche del tumore attraverso le CTC prelevate da un campione di sangue periferico ('biopsia liquida') rappresenta un maggiore vantaggio per il paziente.

Strategie di analisi delle CTC

Le CTC sono presenti nel sangue periferico in un numero estremamente basso, e sono costituite da una popolazione eterogenea con caratteristiche biologiche e molecolari spesso diverse rispetto a quelle della lesione neoplastica primitiva. Pertanto la loro individuazione e caratterizzazione richiedono metodi molto sensibili e specifici, che consistono di strategie combinate di arricchimento (isolamento) e di rilevamento (identificazione) (7).

Le strategie di arricchimento sono basate su tecnologie in grado di distinguere le CTC dalle cellule ematopoietiche circostanti, in base ai loro parametri fisici e biologici (8). L'identificazione e il conteggio delle CTC sono effettuati mediante l'utilizzo di varie tecnologie automatizzate o semi-automatizzate, che possono essere in generale suddivise in tecniche citometriche e tecniche molecolari. Il CellSearch[®], una tecnologia automatizzata di arricchimento e analisi immunocitochimica, è oggi l'unica metodica ad aver ottenuto l'approvazione della Food and Drug Administration statunitense come test per il conteggio di queste cellule. In questo caso, il processo d'identificazione delle CTC sfrutta la cattura immunomagnetica e l'arricchimento cellulare tramite il legame con un anticorpo anti-EpCAM (CD326), una glicoproteina espressa nella maggior parte dei carcinomi. Le cellule così isolate vengono ulteriormente caratterizzate tramite l'impiego di anticorpi anti-citocheratina (CK) e anti-CD45 associati ad una marcatura nucleare

per mezzo del 4'6'-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI). Un evento viene classificato come cellula tumorale quando, oltre a possedere caratteristiche morfologiche di malignità citologica, presenta il fenotipo EpCAM+, CK+, DAPI+ e CD45-.

Sebbene standardizzata, la metodica del CellSearch[®], presenta un grosso limite e cioè la selezione a monte delle cellule sulla base dell'espressione dell'EpCAM; ciò può sottostimare le CTCs in quanto tale marcatore sembra essere meno espresso in alcuni sottotipi istologici di tumore.

Nell'ambito delle tecniche citometriche, appare promettente anche l'analisi in citometria a flusso (FCM), sulla base di esperienze recenti effettuate nel tumore della mammella, ove la filtrazione cellulare è stata combinata con la citometria, permettendo una migliore selezione delle CTCs utilizzando marcatori di superficie, intracellulari e nucleari specifici.

Le tecniche molecolari sono l'alternativa più utilizzata rispetto ai saggi citometrici. Le principali limitazioni di queste tecniche sono dovute ai marcatori utilizzati, i quali possono essere presenti anche a basse concentrazioni nel sangue normale, nelle cellule del midollo osseo e in altre cellule non tumorali.

In sintesi, negli ultimi due decenni sono stati sviluppati diversi metodi per l'arricchimento e l'identificazione delle CTC (9). Le principali tecniche, secondo Toss et al., del 2014 (10), ciascuna con le relative caratteristiche, sono elencate in Tabella 1.

Tab. 1 - Principali tecniche di arricchimento e di rilevamento delle CTC (Toss et al., 2014). ISET, l'isolamento in base alla dimensione delle cellule tumorali epiteliali; CTC, cellule tumorali circolanti; EpiSpot, immunospot epiteliale; EMT, transizione epiteliale mesenchimale; EpCAM, molecola di adesione delle cellule epiteliali.

Tecnica	Vantaggi	Svantaggi
Dispositivi CTC-filtraggio per dimensione (ISET)	Cattura e analisi della piattaforma; immagini multiplex e analisi genetiche; facile e veloce; fattibile per le CTC EpCAM-negativo	Bassa specificità (perde le CTC più piccole e mantiene i leucociti più grandi)
Centrifugazione in gradiente di densità (Ficoll-Hypaque o OncoQuick)	Facile e poco costoso; fattibile per le CTC EpCAM-negativo	Bassa specificità; contaminazione incrociata dei diversi strati (OncoQuick può risolvere il problema)
CellSearch [®] sistema	Approvati dalla FDA; conferma visiva delle CTC; rilevanza clinica; automatizzato, quantitativo; altamente riproducibile	EpCAM-positività dipendente; senza ulteriori test di espressione genica potrebbe essere aggiunto per l'analisi di CTC; valutazione soggettiva dell'immagine; strumentazione costosa
CTC-chip	Alto tasso di rilevamento; conferma visiva delle CTC; potenziale di raccogliere le CTC per ulteriori analisi molecolari e genetiche	EpCAM-positività dipendente; analisi soggettiva delle CTC; ulteriori indagini su test di specificità

Immunocitochimica (ICC)	Quantificazione e analisi morfologica delle CTC; facilita la classica recensione citopatologica	Richiede tempo; valutazione soggettiva
Saggi di proteine (Epi-Spot)	Rileva cellule solo vitali; numero limitato di marcatori	Rilevanza clinica non dimostrata; le proteine devono essere secrete attivamente; nessuna ulteriore identificazione e l'isolamento di CTC
Tecnologie basate su immunofluorescenza (DyLight)	Multimarker analisi delle immagini	Applicazione in linee cellulari
RT-PCR (CTCscope)	Alta sensibilità; rileva solo le cellule vitali	Nessuna analisi morfologica; la visualizzazione e la conta delle CTC non è possibile
Multiplex RT-PCR (AdnaTest)	Alta sensibilità; rileva solo le cellule vitali; salva campione e il tempo, riduce i costi; l'isolamento e l'individuazione di cellule staminali e marcatori EMT	Nessuna analisi morfologica; EpCAM e MUC1 positività del test a carico; nessuna quantificazione

Applicazioni cliniche

Nell'ambito del tumore avanzato, di fondamentale importanza è stato il lavoro di Cristofanilli et al. del 2004 (11), nel quale si è dimostrato che il conteggio delle CTC rilevato mediante il CellSearch® System, è un fattore prognostico indipendente per la sopravvivenza libera da progressione (PFS) e per l'OS nel tumore della mammella metastatico. Il cut-off di 5 CTC/7,5 ml di sangue è stato identificato in grado di distinguere i pazienti con prognosi più favorevole. Studi successivi utilizzando lo stesso cut-off hanno confermato il valore prognostico della CTC (12-16). I risultati dello studio di Cristofanilli et al. (10) hanno consentito l'approvazione da parte di FDA del CellSearch® per la prognosi e il monitoraggio delle pazienti con tumore della mammella metastatico. In studi successivi, gli stessi autori (12, 13), hanno constatato che il rilevamento delle CTC prima di iniziare la terapia di prima linea è altamente predittivo della PFS e dell'OS, ancor più delle tecniche di imaging tradizionali (basati su criteri RECIST) e che il rilevamento di un numero elevato di CTC nel corso del trattamento, a partire dal primo ciclo di terapia, è indice della successiva rapida progressione della malattia. Il monitoraggio del livello delle CTC consente di prevedere anche l'efficacia del trattamento (14, 17, 18).

Infine, in un recente studio retrospettivo di Giuliano et al. (19), è stato dimostrato che la conta delle CTC, valutato prima di iniziare il trattamento sistemico, è utile in particolar modo nei pazienti con limitata diffusione metastatica e potenzialmente eleggibili a trattamenti locoregionali con intento curativo.

Considerando il tumore della mammella non metastatico, in un ampio studio pro-

spettico che ha incluso oltre duemila pazienti, le CTC sono state rilevate nel sangue periferico di circa il 22% delle pazienti dopo l'intervento chirurgico e prima della terapia adiuvante (20). In particolare, le CTC sono state evidenziate in modo significativo ($p < 0.001$), nelle pazienti con linfonodi positivi (22,4%) rispetto a quelle con linfonodi negativi (19,6%) mentre, nessuna associazione è stata riscontrata con le dimensioni del tumore o lo stato dei recettori ormonali. Alcuni autori hanno dimostrato che l'evidenza e in particolare la numerosità delle CTC prima della chemioterapia adiuvante è un indicatore indipendente della sopravvivenza libera da malattia (DFS) e della OS ed è associata a una prognosi peggiore. Inoltre, la persistenza di CTC dopo il trattamento adiuvante correla significativamente con una diminuzione della DFS (20, 21). Questo dato è stato recentemente aggiornato e confermato da Rack et al. in un lavoro successivo (22). Tale studio ha fornito una forte evidenza che il livello delle CTC prima della chemioterapia adiuvante rappresenta un marcatore prognostico negativo di DFS e la OS, nonché di DFS se valutate al termine del trattamento. In un recente studio (23) si è evidenziato che solo il 7% di tutte le pazienti è rimasto CTC positivo dopo la terapia adiuvante, e non è stata trovata nessuna associazione tra la loro presenza, le dimensioni, il grado istologico del tumore e lo stato dei recettori.

Per quanto concerne il setting neoadiuvante, la risposta sistemica al trattamento sembra essere indipendente dalle caratteristiche clinico-patologiche e dalla risposta locale del tumore primario. Pertanto, il monitoraggio delle CTC nel corso della terapia neoadiuvante potrebbe essere un valido aiuto nel processo di decisione delle strategie terapeutiche da adottare per meglio definire l'efficacia del trattamento sistemico sulla diffusione delle cellule tumorali (24). Nei pazienti sottoposti a chemioterapia neoadiuvante, le CTC sono state rilevate nel 22-23% dei pazienti prima e nel 10-17% dopo il trattamento sistemico. La persistenza di CTC dopo questo tipo di terapia non appare correlato alla risposta del tumore primario, ma sembra identificare una sottopopolazione di pazienti con un aumentato rischio di recidiva precoce e OS peggiore (25, 26).

Una menzione particolare merita il carcinoma infiammatorio (IBC), una delle forme più aggressive di cancro della mammella, la cui incidenza è in aumento. La prognosi di questi pazienti è spesso infausta: il tasso di sopravvivenza libera da malattia a 10 anni è solo del 20-25%, nonostante un approccio terapeutico multimodale. In un recente studio retrospettivo, Mego et al. (27) hanno osservato che le pazienti con IBC non metastatico alla diagnosi, hanno una prevalenza di CTC inferiore rispetto a quelle con malattia metastatica, ipotizzando un valore prognostico della presenza delle CTC in queste pazienti.

Conclusioni

Le valutazioni delle CTC nel sangue periferico in pazienti con tumore della mammella hanno una vasta gamma di potenziali applicazioni, tra cui la possibilità di definire criteri prognostici, il monitoraggio della risposta al trattamento, l'individuazione precoce delle metastasi e la valutazione delle modalità e dei tempi del trattamento sistemico. È probabile una migliore caratterizzazione molecolare e

genomica delle CTC e studi clinici ben disegnati possano contribuire a migliorare la scelta del trattamento del carcinoma mammario nell'ottica di una "medicina di precisione".

Bibliografia

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics. 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014; 64: 9-29.
2. O'Shaughnessy J. Extending survival with chemotherapy in metastatic breast cancer. *Oncologist.* 2005; 10: (Suppl. 3), 20-29.
3. Vona G, Sabile A, Louha M, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol.* 2000; 156: 57-63.
4. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aus Med J.* 1869; 14: 146-149.
5. Somlo G, Lau SK, Frankel P, et al. Multiple biomarker expression on circulating tumor cells in comparison to tumor tissues from primary and metastatic sites in patients with locally advanced/inflammatory, and stage IV breast cancer, using a novel detection technology. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 128: 155-163.
6. Amir E, Clemons M, Purdie CA, et al. Tissue confirmation of disease recurrence in breast cancer patients: pooled analysis of multi-centre, multi-disciplinary prospective studies. *Cancer Treat Rev.* 2012; 38: 708-714.
7. Sun YF, Yang XR, Zhou J, et al. Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011; 137: 1151-1173.
8. Broersen LH, van Pelt GW, Tollenaar RA, et al. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer. *Cell Oncol (Dordr).* 2014; 37: 9-15.
9. Harouaka R, Kang Z, Zheng SY, Cao L. Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications. *Pharmacol Ther.* 2014; 141: 209-221.
10. Toss A, Mu Z, Fernandez S, Cristofanilli M. CTC enumeration and characterization: moving toward personalized medicine. *Ann Transl Med.* 2014; 2: 108.
11. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004; 351: 781-791.
12. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 1420-1430.
13. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells versus imaging-predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 6403-6409.
14. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 4218-4224.

15. Nolé F, Munzone E, Zorzino L, et al. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol.* 2008; 19: 891-897.
16. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2014; 15: 406-414.
17. Smith BM, Slade MJ, English J, et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 1432-1439.
18. Liu MC, Shields PG, Warren RD, et al. Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 5153-5159.
19. Giuliano M, Giordano A, Jackson S, et al. Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination. *Breast Cancer Res.* 2014; 16: 440-449.
20. Rack B, Andergassen U, Janni W, et al. CTCs in primary breast cancer (I). *Recent Results Cancer Res.* 2012; 195: 179-185.
21. Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol.* 2012; 13: 688-695.
22. Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J, et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2014; 106.
23. Mikulová V, Cabiňáková M, Janatková I, et al. Detection of circulating tumor cells during follow-up of patients with early breast cancer: Clinical utility for monitoring of therapy efficacy. *Scand J Clin Lab Invest.* 2014; 74: 132-142.
24. Riethdorf S, Müller V, Zhang L, et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 2634-1645.
25. Serrano MJ, Rovira PS, Martínez-Zubiaurre I, et al. Dynamics of circulating tumor cells in early breast cancer under neoadjuvant therapy. *Exp Ther Med.* 2012; 4: 43-48.
26. Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, et al. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 7004-7010.
27. Mego M, Giordano A, De Giorgi U, et al. Circulating tumor cells in newly diagnosed inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2015; 17: 2. [Epub ahead of print].

Cellule T regolatrici: piccole cellule, molte funzioni

Chiara Vasco

Laboratorio di Patologia Clinica e Genetica Medica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common highly malignant and aggressive cerebral tumor in adults with an average survival time of 15 months. Despite recent advances in treatments, options are very poor and recurrence occurs invariably after surgical treatment and radio-chemotherapy (Behin et al., 2003; Wainwright et al., 2012; Vasco et al., 2013; Ooi et al., 2014). In the last years, immunotherapy has been suggested as a powerful approach to prevent tumor recurrence in a number of neoplasms by eliminating tumor cells while sparing normal surrounding healthy cells (Curtin et al., 2008). In fact the lack of response to treatment in GBM patients may be attributed to the immunosuppressed micro-environment that is characteristic of invasive glioma (Ooi et al., 2014). Efforts to improve immunotherapy, supported by the work of Donson 2012, confirm the importance of the expression of local immune-related genes on the survival of patients with high-grade glioma (Donson et al., 2012).

T regulatory lymphocytes are a subset of T-cells which play an important role in maintaining peripheral self tolerance and preventing immunopathologies (Crane et al., 2012). The subpopulation of CD4⁺CD25^{bright} immunoregulatory T cells (Tregs) constitutes 5 to 10% of peripheral CD4⁺ cells in humans. Tregs are immunosuppressive T-cells that normally prevent autoimmunity when the human immune response is evoked; however, there have been strong correlations between glioma-induced immunosuppression and Tregs: In fact, induction of Treg activity has been correlated with glioma development in both murine models and patients (Vasco et al., 2013). A marker which is specific of this subpopulation that permits to discriminate between activated regulatory T cells and Treg is the presence of the transcriptional forkhead boxP3 repressor (FOXP3) (Andaloussi et al., 2006). Tregs express different superficial and intracitoplasmatic markers which let us understand something about their functions; they can prevent autoimmunity through the cell surface ligand glucocorticoid- induced tumor necrosis factor receptor (GITR), cytotoxic T-lymphocyte antigen (CTLA-4) and through the production of immunosuppressive cytokines. It has been shown that tumor growth produces generation of immunosuppressor T-cells (Fujimoto et al., 1976, Ha et al., 1995;

2009; Chen et al., 2011) which, residing at the tumor site, have been demonstrated to be relevant in progression of systemic diseases in peripheral blood or lymphoid organs (Wang et al., 2006; Fietta et al., 2009; Liu et al., 2009).

The relevance of Treg in the pathogenesis of GBM has been first suggested by histological studies showing that high grade gliomas are much more infiltrated by Tregs than Low grade oligodendrogliomas or brain tissue from non-tumoral central nervous system (CNS) (El Andaloussi, 2006; Heimberg et al., 2008), moreover Jacobs and colleagues (Jacobs et al., 2010) demonstrated that Treg infiltration correlates with the WHO grade of the tumor, with GBM showing the largest infiltration. This further supports the role for these cells in GBM pathogenesis (Vasco et al., 2013).

Tregs segregate into two primary categories: thymus-derived natural Tregs (nTregs) that develop from the interaction between immature T cells and thymic epithelial stromal cells and that express a transcription factor called Helios; and inducible Tregs (iTregs) that arise from the conversion of CD4⁺FoxP3⁻ T cells into FoxP3 expressing cells. Normally, these Treg subsets complement one another's actions by maintaining tolerance of self-antigens, thereby suppressing autoimmunity, while also enabling effective immune responses toward non-self-antigens, thus promoting infectious protection.

As previously shown, one of the hallmark features of GBM, the most common adult primary brain tumor with a very dismal prognosis, is the accumulation of CD4⁺/CD25^{bright}/FOXP3⁺ regulatory T cells (Tregs) (Ooi et al., 2014). Moreover, in a context of reduced number of circulating CD4⁺ lymphocytes, an increased proportion of Treg has been reported in peripheral blood of patients with malignant glioma (Fecci et al., 2006). It is still unknown the exact mechanisms by which regulatory T-cells interacts with GBM microenvironment and are recruited at the tumor site but it is evident that various cytokines such as interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor- β (TFG- β) are implicated in these processes (Vasco et al., 2013). Although glioblastoma-produced soluble factors may attract Treg lymphocytes in the tumor microenvironment, it is not clear whether circulating Treg in GBM patients behave abnormally or display abnormal characteristics (Crane et al., 2012).

Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) also known as monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) has been shown to be secreted by a wide variety of cancer cells *in vitro*, promoting tumor angiogenesis and monocyte attraction to the tumor microenvironment. Its action is mediated by two receptors CCR2 and CCR4 (C-C chemokine receptor type 2 and 4) (Zhang et al., 2010). This chemokine is one of the most important one involved in the recruitment of blood cells, especially macrophages, into the tissues (Deshmane et al., 2009) and a recent work showed that the extravasation of lymphocytes is mediated by CCL2-expressing astrocytes (Carillo et al., 2012). All these receptors are known to be involved in mechanism of tumor cell migration but are still not known all the molecular mechanisms (Crane et al., 2012; Vasco et al., 2013).

In the setting of GBM, nTregs appear to be primary players that contribute to immunotherapeutic failure, ultimately leading to tumor progression. Most Tregs

in human GBM and mouse brain tumors expressed the nTreg transcription factor, Helios. Several attempts have been made to therapeutically target these cells with variable levels of success. The blood brain barrier-crossing chemotherapeutics, temozolomide, and cyclophosphamide (CTX), vaccination against the Treg transcriptional regulator, FoxP3, as well as mAbs against Treg-associated cell surface molecules CD25, CTLA-4, and GITR are all different therapeutic approaches under investigation. Contributing to the poor success of past approaches is the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO), a tryptophan catabolizing enzyme overexpressed in GBM, and critically involved in regulating tumor-infiltrating Treg levels. (Wainwright et al., 2013)

The data presented by Vasco and colleagues in 2013 further confirm that in vitro cultured glioblastoma cells release factors able to attract Treg lymphocytes. Overall, these results are in agreement with the long recognized idea that glioblastoma may induce an immunosuppressive microenvironment which contributes to the development and the survival of the tumor. In addition, these data indicate that circulating Treg lymphocytes isolated from patients with GBM display similar characteristics compared to Treg of healthy subject, further suggesting that the migration of Treg is mainly due to tumor-released factors rather than to an altered function of circulating Treg (Crane et al., 2012; Vasco et al., 2013). Moreover it was demonstrated that the attractant effect exerted by GBM-conditioned media was greater in Treg subpopulation than in non-Treg.

Bibliografia

1. Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, et al. Primary brain tumors in adults. *Lancet*. 2003; 361: 323-331.
2. Carrillo-de Sauvage MA, Gómez A, Ros CM. CCL2- expressing astrocytes mediate the extravasation of T lymphocytes in the brain. Evidence from patients with glioma and experimental models in vivo. *PLoS ONE*. 2012; 7: 30762.
3. Chen X, Oppenheim JJ. Resolving the identity myth: key markers of functional CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11: 1489-1496.
4. Crane CA, Ahn BJ, Han SJ, Parsa AT. Soluble factors secreted by glioblastoma cell lines facilitate recruitment, survival, and expansion of regulatory T cells: implications for immunotherapy. *Neuro Oncol*. 2012; 14: 584-595.
5. Curtin JF, Candolfi M, Fakhouri TM, et al. Treg depletion inhibits efficacy of cancer immunotherapy: implications for clinical trials. *PLoS ONE*. 2008; 3: e1983.
6. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009; 29: 313-326.
7. Del Pozo MA, Cabanas C, Montoya MC, et al. ICAMs redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T lymphocytes. *J Cell Biol*. 1997; 137: 493-508.
8. Donson AM, Birks DK, Schittone SA, et al. Increased immune gene expres-

- sion and immune cell infiltration in high grade astrocytoma distinguish long-term from short-term survivors. *J Immunol.* 2012; 189: 1920-1927.
9. El Andaloussi A, Lesniak MS. An increase in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol.* 2006; 8(3): 234-43. Epub 2006 May 24.
 10. Fecci PE, Mitchell DA, Whitesides JF, et al. Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res.* 2006; 66: 3294-3302.
 11. Fietta AM, Morosini M, Passadore I, et al. Systemic inflammatory response and downmodulation of peripheral CD25⁺ Foxp3⁺ T-regulatory cells in patients undergoing radiofrequency thermal ablation for lung cancer. *Human Immunol.* 2009; 70: 477-486.
 12. Fujimoto S, Greene MI, Sehon AH. Regulation of the immuneresponse to tumor antigens. II. The nature of immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts. *J Immunol.* 1976; 116: 800-806.
 13. Ha TY, Park HJ, On KK, et al. Potentiation of anti-tumor immunity by modulation of suppressor T cells. II. Regression of tumor by modulation of suppressor T cells. *Korean J Immunol.* 1995; 17: 101-118.
 14. Ha TY. The role of regulatory T cells in cancer. *Immune Netw.* 2009; 9: 209-235.
 15. Heimberger AB, Abou-Ghazal M, Reina-Ortiz C et al. Incidence and prognostic impact of FoxP3⁺ regulatory T cells in human gliomas. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 5166-5172.
 16. Jacobs JF, Idema AJ, Bol KF, et al. Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors. *J Neuroimmunol.* 2010; 225: 195-199.
 17. Liu Z, Kim JH, Falo LD et al. Tumor regulatory T cells potentially abrogate antitumor immunity. *J Immunol.* 2009; 182: 6160-6167.
 18. Ooi YC, Tran P, Ung N, Thill K, Trang A, Fong BM, Nagasawa DT, Lim M, Yang I. The role of regulatory T-cells in glioma immunology. *Clin Neurol Neurosurg.* 2014; 119: 125-132.
 19. Vasco C, Canazza A, Rizzo A, Mossa A, Corsini E, Silvani A, Fariselli L, Salmaggi A, Ciusani E. Circulating T regulatory cells migration and phenotype in glioblastoma patients: an in vitro study. *J Neurooncol.* 2013; 115: 353-363.
 20. Wainwright DA, Dey M, Chang A, Lesniak MS. Targeting Tregs in Malignant Brain Cancer: Overcoming IDO. *Front Immunol.* 2013; 4: 116.
 21. Wainwright DA, Sengupta S, Han Y, Lesniak MS. Thymus-derived rather than tumor-induced regulatory T cells predominate in brain tumors. *Neuro Oncol.* 2011; 13: 1308-1323.
 22. Wainwright DA, Nigam P, Thaci B, et al. Recent developments on immunotherapy for brain cancer. *Expert Opin Emerg. Drugs.* 2012; 17: 181-202.
 23. Wang RF. Regulatory T cells and innate immune regulation in tumor immunity. *Springer Semin Immunopathol* 2006; 28: 17-23.
 24. Zhang J, Patel L, Pienta KJ. Targeting chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) as an example of translation of cancer molecular biology to the clinic. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010; 95: 31-53.

Il trapianto aploidentico T-repleto

Luca Castagna

Unità Operativa di Ematologia, Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (MI)

L'importanza di poter utilizzare un donatore alternativo al donatore identico (HLAid), familiare o volontario, è insita nell'analisi delle cifre seguenti: la probabilità di avere un donatore HLAid familiare è di circa 25%; la probabilità di trovare un donatore HLAid nei registri mondiali (in cui sono disponibili circa 20 milioni di donatori) è variabile in funzione dell'etnia, e per i caucasici è di circa 50%. Di conseguenza almeno 30% dei pazienti per i quali c'è un'indicazione trapiantologica, non ha un donatore ideale. In questi casi entrano in gioco i cosiddetti donatori alternativi: aploidentico, cordone ombelicale e donatori volontari non identici (\leq di 7/8).

La storia del trapianto allogenico con un donatore familiare non compatibile (2 o più differenze sui loci HLA di classe I e II) è molto lunga. Infatti, negli anni 80, è diventato rapidamente chiaro che utilizzare un condizionamento ed una profilassi della graft versus host disease (GVHD) standard, era gravato da un'incidenza proibitiva di GVHD e reazione di tipo host versus graft (HVG) (Anasetti).

Lo scenario è profondamente cambiato con lo sviluppo di strategie specifiche basate su un condizionamento mielo-immunoablativo con mega-dose di cellule staminali selezionate CD34 (T deplezione positiva), senza immunosoppressione post-trapianto. Quest'approccio è stato sviluppato dal gruppo di Perugia, ottenendo dei risultati particolarmente interessanti nella leucemia mieloide acuta. Questa esperienza ha permesso di comprendere al meglio l'importanza antitumorale delle cellule NK in situazione KIR-mismatch (Ruggeri). Tuttavia, questa modalità è complessa da attuare ed è gravata da una mortalità legata al trapianto (no relapse mortality, NRM) piuttosto consistente.

In letteratura, sono state riportate una serie di altre modalità di T-deplezione ex vivo, basate su tecniche differenti ed ancora in corso di valutazione clinica (Bethge, Federmann, Doder, Guinan).

Negli ultimi anni, sono emersi dei dati da diversi gruppi, per cui il "dogma" aploidentico uguale T-deplezione, è stato messo in profonda discussione. Infatti, gruppi cinesi, coreani, giapponesi, americani e italiani (Huang 2005, Lee, Di Bartolomeo, Peccatori, Tamaki) hanno riportato diverse modalità di trapianto aploidentico senza manipolazione ex vivo e che vengono definiti T-repleti. In particolare, la nostra esperienza è maturata con lo sviluppo di una di queste piattaforme, che prevede l'uso della ciclofosfamide post-trapianto.

Il trapianto aploidentico con l'uso della ciclofosfamide ad alte dosi, somministrata dopo l'infusione delle cellule staminali, è stata sviluppata presso l'Università John Hopkins di Baltimora (Luznik 2002). In studi con modelli murini, in situazione di mismatch, l'attecchimento senza GVHD poteva essere ottenuto somministrando la ciclofosfamide con un timing ben preciso.

Il presupposto biologico per spiegare l'effetto protettivo della ciclofosfamide è che dopo l'infusione di cellule staminali non manipolate (T-repleto) si evidenzia un'intensa proliferazione dei linfociti T alloreattivi (del donatore contro il ricevente e dei linfociti T ancora presenti del ricevente contro il donatore) che risultano molto sensibili all'attività citolitica del farmaco. Al contrario, i linfociti T non alloreattivi, grazie alla presenza dell'enzima aldeide deidrogenasi (Kanakry 2013), sono resistenti al farmaco, e sono quelli che probabilmente sono responsabili del recupero immunologico post-trapianto (Fig. 1). Altrettanto resistenti alla

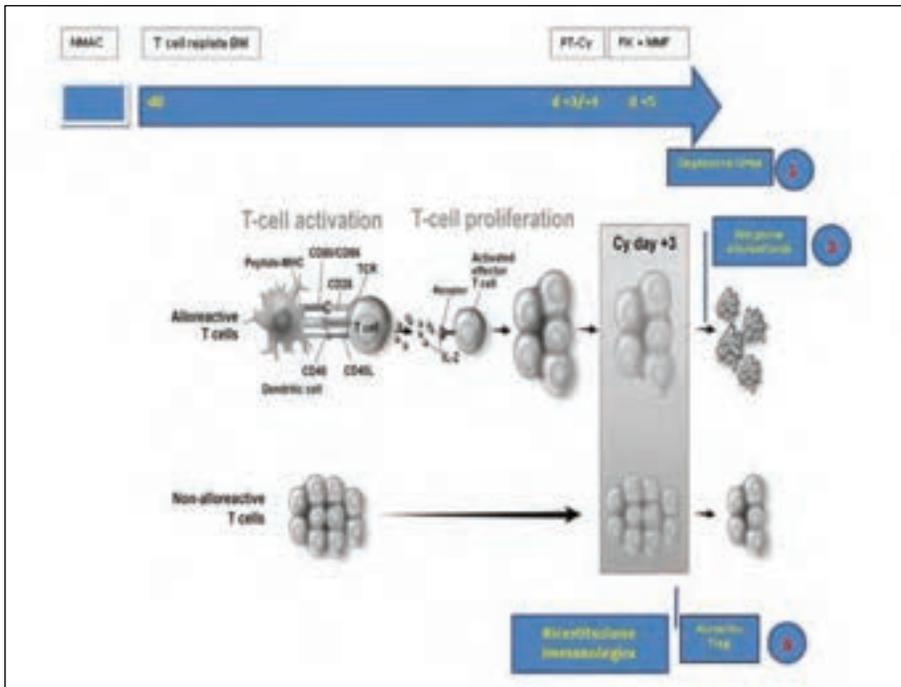


Fig. 1 - Schema generale del trapianto aploidentico con l'uso della ciclofosfamide post-trapianto (schema Baltimora). Dopo il regime di condizionamento (nonmieloablativo, NMAC), si infondono le cellule staminali midollari non manipolate. Il paziente non riceve alcun trattamento immunosoppressivo fino al g +3 e +4, quando vengono somministrate 2 dosi di ciclofosfamide ad alte dosi (50 mg/kg/die). Dal g +5, viene iniziata l'immunosoppressione con tacrolimus e micofenolato mofetil (fino al g +35). Nei giorni successivi all'infusione del midollo, si assiste ad una intensa proliferazione dei cloni linfocitari alloreattivi del donatore contro il ricevente e del ricevente contro il donatore. Questi cloni linfocitari attivati e proliferanti sono il target dell'attività citolitica ed immunosoppressiva della ciclofosfamide. Al contrario, i cloni non alloreattivi del donatore, non proliferando non vengono eliminati dal farmaco, e sono poi responsabile della ricostituzione immunologica. La ciclofosfamide post-trapianto modifica anche altri aspetti dell'immunità stimolando l'aumento dei linfociti Treg e inducendo la deplezione timica dei cloni alloreattivi, implicati nella GVHD e nel rigetto.

ciclofosfamide sono, grazie all'alta concentrazione di enzima, le cellule staminali e quindi l'uso di un chemioterapico post-infusione non impatta negativamente sull'attecchimento.

Nella tabella 1 sono riportate le diverse esperienze pubblicate di trapianto aploidentico in cui non è stata effettuata alcuna manipolazione ex vivo delle cellule staminali.

Le strategie di trapianto aploidentico sono diverse ma in modo schematico possono essere catalogate, in funzione della tipologia d'immunosoppressione, nel modo seguente:

- Trapianto aploidentico con immunosoppressione adattata (O'Donnell, Luznik 2008, Peccatori).
- Trapianto aploidentico con immunosoppressione standard (Rizzieri, Lee, Oga-wa).
- Trapianto aploidentico con immunosoppressione rinforzata, caratterizzato dall'uso di più farmaci (Huang 2005, Di Bartolomeo).

Trapianto aploidentico con immunosoppressione adattata

L'uso della ciclofosfamide post-trapianto è stato sviluppato nell'uomo una diecina di anni fa, dopo aver dimostrato nel topo che questo farmaco dato con un timing ben preciso post-infusione era in grado di permettere una chimera mista stabile nel tempo, senza che la GVH portasse al decesso dell'animale nonostante l'incompatibilità totale (Luznik 2001, 2002).

Nello studio di Luznik (2008), 68 pazienti con varie emopatie che ricevono il trapianto aploidentico preceduto da un condizionamento nonmieloablativo e seguito dalla ciclofosfamide post-trapianto.

I risultati più significativi sono riportati nella Tabella 1. Un punto da sottolineare è che utilizzare 2 dosi di ciclofosfamide previene in modo più efficace la GVHD cronica, rispetto ad 1 sola dose.

Questo studio quindi conferma l'efficacia della ciclofosfamide nella prevenzione della GVHD e del rigetto, nonché i buoni risultati in termini di outcome. In uno studio successivo, lo stesso gruppo ha dimostrato che la differenza antigenica su 3 o 4 loci HLA non si associa ad una riduzione della sopravvivenza ad un rischio maggiore di mortalità, GVHD o rigetto (Kasamon).

Questa tipologia di trapianto aploidentico presenta alcuni elementi che richiedono un commento:

- L'uso del midollo osseo come sorgente che potrebbe esporre ad un allungamento dei tempi di attecchimento. Negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi studi retrospettivi che hanno confrontato il midollo osseo con le cellule staminali periferiche (Castagna 2014, Raj, Bhamidipati), suggerendo che gli outcomes principali non sono influenzati dalla sorgente delle cellule staminali. In particolare, non si evidenzia un aumento dell'incidenza di GVHD acuta o cronica, ma non si evidenzia neanche una riduzione della durata dell'aplasia. Infine, non è possibile esprimersi se esiste una differenza in termini di effetto antitumorale a causa dell'eterogeneità delle patologie trattate.

Tab. 1 - Sintesi degli studi di trapianto aploidentico senza T deplezione ex vivo.

Autore (ref)	N	CTX	Profilassi GVHD	Sorgente CS	MNC/ CD34§ infused	GVHDa 2-4	GVHdc	OS	PFS	GF	NRM
Luznik 2008	68	FCyTBI NMA	Cy post, FK, MMF	MO	1.6/4.8	34%	5%	36%		13%	17% @ 1 anno
Rizzieri 2007	49	Fcy-Campath RIC	MMF	CSP	-/13	16%	14%	31%	43%	6%	10% @ 100 d
Ogawa 2006	26	F6B2ATG RIC	FK, MTX, MMF, MP	CSP	-/6.5	20%	25%	NE	55%	4%	15%
Ogawa 2008	30	TBI8-10CF MAC	FK, MTX, MMF, MP	MO	3.4/-	38%	29%	54%	/	0	23%
Lee 2011	83	FBATG RIC	CsA + MTX	CSP	8.1/7.5	20%	34%	NE	50-60%	0	17% @ 1 anno
Kasamon 2011	185	FCyTBI2 NMA	Cy post, FK, MMF	MO	-/3.9	31%	15%	NE	35%	16%	15% @ 1 anno
Di Bartolomeo	80	25	CsA, MTX, MMF, anti-IL2	MO stimolato GCSF	NE/	31%	17%	54%	NE	NE	32%
Peccatori	121	FTreoATG MAC	Rapa, MMF	CSP	-/	29%	25%	43%	NE	NE	44%
Solomon	20	MAC	Cy post, FK, MMF	CSP	-/5.2	30%	35%	69%	50%	0	10%
Huang 2012	820	MAC ATG	CsA, MTX, MMF	CSP + MO stimolato GCSF	-/	29%	12%	62%	67%	NE	26%
Raiola 2012	50	MAC	Cy post, CsA, MMF	MO	3.6/-	12%	10%	62%	CR 68% Active 37%		18%
Castagna* 2015	190	NMA + RIC	Cy post, FK/CsA MMF	MO/PBSC	3.8/3.3	32%	18%	51%	47%	5%	22% @ 2 anni

MO: midollo osseo, CSP: cellule staminali periferiche

CTX: condizionamento; CS cellule staminali; F: fludarabina; Cy: ciclofosfamide; B: bustulfano; ATG: siero anti-linfocitario; MAC: mieloablattivo; NMA: nonmieloablattivo; RIC: ridotta intensità; FK: tacrolimus; MMF: micofenolato mofetile; MTX: metotrexate; Rapa: rapamicina; NRM: not relapse mortality; MP: metil-prednisone; Cy post: ciclofosfamide post-trapianto

§ MNC: espresse in $\times 10^6/\text{kg}$

CD34: espresse in $\times 10^6/\text{Kg}$

GF: graft failure

NE: dato non esistente

*comunicazione personale (dati sui pazienti trapiantati in ICH e a Marsiglia).

- L'incidenza di recidiva post-aplo sembra essere rilevante in questo studio, soprattutto per i pazienti affetti da patologie mieloidi (soprattutto leucemia e mielodisplasia), mentre la ricaduta è inferiore nei pazienti con patologie linfoidi. Questo dato potrebbe essere spiegato dalle caratteristiche dei pazienti inclusi e dal condizionamento nonmieloablato che non ha alcuna attività anti-tumorale. Tuttavia è altrettanto evidente che i pazienti con patologie linfoidi recidivano meno, con un aumento della sopravvivenza, come riportato da Burroughs et al. in pazienti con linfoma di Hodgkin (LH). Per quanto riguarda i linfomi non Hodgkin (LNH) sembra esserci una differente sensibilità all'effetto immunomediato del trapianto aploidentico nelle varie istologie (ridotto nel linfoma mantellare) (Luznik 2010).
Di recente, Garzia et al. hanno riportato dei risultati interessanti nei LNH con malattia chemiosensibile prima del trapianto, non differente da quanto ottenuto con donatori HLA identici (Garzia). Per quanto riguarda il condizionamento, è stato dimostrato in vari studi che è possibile utilizzare un condizionamento mieloablato (myeloablative conditioning regimen, MAC), senza apparentemente aumentare la tossicità (Bashey, Raiola). L'uso di un MAC potrebbe contribuire alla riduzione dell'incidenza di ricadute soprattutto in caso di leucemie acute.
- Se confrontato con piattaforme di trapianto aploidentico T-deplete, l'uso del programma Baltimora sembra essere più efficace in termini di sopravvivenza e meno tossico, come recentemente riportato in un lavoro retrospettivo del MD Andersson (Ciurea 2012).

Peccatori et al. hanno pubblicato l'esperienza italiana di trapianto aploidentico T-repleto in 121 pazienti.

Le caratteristiche principali sono l'uso delle cellule staminali periferiche, un condizionamento basato sul treosulfano, una profilassi della GVHD con siero anti-linfocitario (Fresenius), rituximab, sirolimus e MMF. I risultati ottenuti sono incoraggianti, soprattutto dopo l'analisi delle caratteristiche dei pazienti inclusi molti dei quali hanno una malattia avanzata o attiva al momento del trapianto. L'incidenza di GVHD acuta e cronica era 35% e 47%, mentre la NRM a 3 anni era 31%, e la sopravvivenza globale a 3 anni 25%. Una correlazione interessante è che l'incidenza di GVHD è inversamente correlata con l'aumento delle cellule T-reg circolanti (Peccatori).

Trapianto aploidentico con immunosoppressione standard (Rizzieri, Lee, Ogawa)

Queste esperienze si basano sull'utilizzo di cellule staminali midollari o periferiche non manipolate ex vivo, e sull'utilizzo di siero anti-linfocitario a dosi elevate o di anticorpo monoclonale anti-CD52. In tutti i casi il condizionamento era RIC. Anche se interessanti, in questi studi l'immunosoppressione necessaria per ridurre l'incidenza di GVHD o di HVG è profonda, e quindi la riproducibilità deve essere confermata.

Trapianto aploidentico con immunosoppressione rinforzata (Huang 2005, Di Bartolomeo)

Il gruppo dell'Università di Pechino ha sviluppato un protocollo originale basato su diversi elementi: la sorgente di cellule staminali è mista con midollo osseo raccolto dopo stimolazione con GCSF e cellule staminali periferiche, senza manipolazione ex vivo; condizionamento MAC basato sul busulfano e con siero antilinfocitario; 3 farmaci immunosoppressivi post-infusione con diversi meccanismi d'azione: ciclosporina, metotrexato, MMF. L'interesse di questa esperienza è nel

Tab. 2 - Complicanze infettive dopo trapianto aploidentico.

Autore	N	CTX	Profilassi	Infezione fungina	Infezione CMV	Malattia CMV	Infezione EBV	LPD EBV	CE
Rizzieri	49	RIC Campath	F: NE V: NE B: NE	8%	86%	14%	NE	4%	0
Lee	83	RIC ATG	F: fluco/echino V: NE B: cipro, Ig	NE	81%	6.8%	61%	10%	0
Ogawa 2006	26	RIC ATG	F: nessuna V: ganciclovir B: cipro/vanco, Ig	3.8%	81%	4.7%	NE	3.8%	42%
Ogawa 2008	30	MAC ATG	F: aucune V: ganciclovir B: cipro/vanco, Ig	NE	77%	4%	NE	3%	37%
Sun	291	MAC ATG	F: fluco/itra V: aciclovir B: trimeton/sulfa, Ig	13%	NE	NE	NE	NE	NE
Cho	23	MAC ATG	F: itra/mica V: ganciclovir B: cipro	NE	91%	17%	NE	NE	NE
O'Donnell	18	NMA	F: fluco V: valaciclovir B: norfloxacina	5%	5%	0	NE	NE	0
Luznik 2008	68	NMA	F: NE V: NE B: NE	7%	38%	0	NE	NE	NE
Castagna (cp)	190	NMA	F: itra/echino/fluco V: aciclovir HD B: levo	9%	50%	6%	11%	0	7%
Solomon	20	MAC	F: echino/posa/vori V: aciclovir B: chinolonico	0	81%	7%	NE	NE	75%
Ciurea 2012	56	MAC	F: vori V: aciclovir B: nessuna	9%	46.8%	0	NE	NE	34%

LPD EBV: linfoproliferazione EBV; CE: cistite emorragica; F: funghi; V: virus; B: batteri; NE = non esistente.

Tab. 3 - Risultati dopo trapianto aploidentico nei pazienti con LAM e mielodisplasia.

Autore (ref)	N	CTX	Sorgente CS	GVHDa 2-4	GVHDe	OS	LFS	NRM
Chen 2009 (36) Haplo vs HLAid	56 vs 51	MAC	MO+CSP vs CSP	26.8% vs 13.7%	31.3% vs 23.2%	70% vs 80%	68% vs 76%	2.5% vs 7.8%
Lee 2011 (37)	83	RIC	CSP	20%	34%	60%	60%*	18%
Wang 2011 (38) Haplo vs HLAid	81 vs 36	MAC	MO+CSP	49% vs 24%	62% vs 39%	42% vs 20%	42% vs 15%	34% vs 38%
Huang 2012 (27) Haplo vs CT	58 vs 74	MAC	MO+CSP	/	/	77% vs 54%	73% vs 44%	12%
Cho 2012 (39) Haplo vs WM vs PM	23 vs 33 vs 13	MAC§	CSP	52% vs 48% vs 38%	47% vs 51% vs 38%	65% vs 83% vs 51%	63% vs 73% vs 51%	17% vs 6% vs 7%

*I risultati descritti si riferiscono per i pazienti in prima remissione completa. Per i pazienti in seconda o maggiore remissione completa, OS e EFS sono 53% e 41%, mentre per i pazienti con malattia attiva sono 9% e 9%. Per le MDS, la OS e EFS sono 53% e 53%.

§ utti i pazienti aplo sono condizionati MAC, e 14 pazienti nel gruppo MUD sono condizionati con RIC.

WM: well matched, PM : partially matched, CT: chemioterapia, HLAid: donatore identico, MO: midollo osseo, CSP: cellule staminali periferiche.

grande numero di pazienti trapiantati. Infatti, in un lavoro recente, Huang et al. hanno analizzato i dati di ben 820 pazienti con diverse patologie ematologiche primariamente leucemie acute. L'incidenza di GVD acuta e cronica è 43% e 53% rispettivamente, la NRM a 3 anni 18%, e la sopravvivenza senza leucemia (leukemia free survival, LFS), per i pazienti a rischio standard e ad alto rischio di 68% e 48%, rispettivamente.

Un aspetto su cui porre l'accento è la strategia di immunomodulazione post-trapianto con l'infusione di linfociti del donatore (DLI), raccolta con GCSF e somministrate con uno *short course* di ciclosporina, in pazienti con LA ad alto rischio, riducendo così l'incidenza di ricadute (Wang). Infine, l'outcome di pazienti con LAM sottoposti a trapianto aploidentico è stato confrontato con quello di pazienti trapiantati con un donatore HLA identico, senza ritrovare alcuna differenza negli outcomes principali (Lu).

Alcuni aspetti peculiari di questo programma sono la necessità di raccogliere 2 volte il donatore dopo stimolazione con GCSF, l'incidenza di GVHD acuta e cronica sembra piuttosto elevata anche per l'utilizzo di un MAC con farmaci specifici, ed infine una profonda immunosoppressione conseguente ai 4 farmaci utilizzati.

Di recente un gruppo italiano ha pubblicato uno studio in cui i pazienti sono trapiantati con il midollo osseo raccolto dopo stimolazione con GCSF e sono profilassati con diversi immunosoppressori: ATG, MTX, MMF, Ciclosporina e anticorpi anti-recettori dell'IL2. L'incidenza di GVHD acuta (grado 2-4) e cronica è 24% e 17%, mentre la TRM a 6 mesi è 32%, e l'OS per i pazienti a rischio standard è 54% a 3 anni, mentre è 33% per i pazienti ad alto rischio (Di Bartolomeo). In generale, questo tipo di piattaforma di trapianto aploidentico ha come punto debole la grande profondità di immunosoppressione che può rendere in decorso post-trapianto complesso dal punto di vista infettivo e aumentare il rischio di recidiva della emopatia.

Sebbene confrontare i vari tipi di piattaforme di trapianto aploidentico può essere rischioso e non scevro da imprecisioni, nella tabella 1 sono riportate le incidenze di GVHD acuta, cronica e la NRM osservate nelle diverse esperienze. Si può quindi notare che in termini di GVHD acuta, l'incidenza è molto simile anche quando si suddividono i lavori in funzione dell'utilizzo di ATG/Campath o PT-Cy (27% vs 25%, rispettivamente). Per quanto riguarda invece l'incidenza media di GVHD cronica, questa sembra essere più alta nei programmi ATG/Campath-based (22% vs 12%, rispettivamente). Per quanto riguarda le complicanze infettive, seguendo lo stesso criterio di suddivisione in funzione dell'uso o meno di ATG/Campath, si nota che l'incidenza di riattivazione CMV è più alta rispetto ai pazienti profilassati con la ciclofosfamida.

Naturalmente, non è possibile confrontare la sopravvivenza globale o la PFS, in quanto le variabili che impattano questi valori sono eterogenei nei vari studi.

Infine, nella Tabella 3 sono riportati i risultati ottenuti in quella che è considerata l'indicazione principale per un trapianto allogenico e cioè la leucemia acuta. Si nota che la OS e PFS nei pazienti sottoposti a trapianto aploidentico non è inferiore o addirittura è superiore a quella vista dopo trapianto HLA identico. Ovviamente si tratta di studi retrospettivi, non randomizzati per cui le conclusioni devono essere mitigate e confermate da studi prospettici.

Per quanto riguarda i dati in altre patologie, soprattutto linfoma di Hodgkin e non Hodgkin si può fare riferimento alle seguenti pubblicazioni: Burroughs 2008, Raiola 2012, Castagna 2014, Kanakry 2013, Garzia 2015.

Un punto importante che si è molto amplificato con lo sviluppo dei programmi di trapianto aploidentico T repleto, riguarda la scelta della tipologia di donatore, quando non è disponibile un donatore HLA identico familiare o volontario. Esistono, infatti, 3 tipi di cosiddetti donatori alternativi: donatore volontario non HLA identico, cordone ombelicale e donatore familiare aploidentico.

Ognuno di questi donatori alternativi ha vantaggi e svantaggi per cui al momento, in attesa degli studi randomizzati in corso, non è possibile definire il miglior donatore alternativo. D'altra parte, la questione non andrebbe posta in questi termini, ma andrebbe vista in modo paziente-orientato, in quanto con l'affermarsi in modo ampio del trapianto aploidentico, la probabilità di trapiantare un paziente è pressochè certa, rispettando anche i tempi giusti ed eliminando il problema del donatore.

Per la scelta del donatore si consigliano le seguenti pubblicazioni: Eapen 2014, Kekre 2014, Ciurea 2014.

Bibliografia

1. Anasetti C, Amos D, Beatty PG, et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med.* 1989; 320: 197-204.
2. Bashey A, Zhang X, Connie A, Sizemore CA, et al. T-Cell-Replete HLA-Haploidentical Hematopoietic Transplantation for Hematologic Malignancies Using Post-Transplantation Cyclophosphamide Results in Outcomes Equiva-

- lent to Those of Contemporaneous HLA-Matched related and Unrelated Donor Transplantation. *J Clin Oncol.* 2013; 31: 1310-1316.
3. Bethge AB, Faul C, Bornhäuser M, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: An update. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 2008; 40: 13-19.
 4. Bhamidipati PK, DiPersio JF, Stokerl-Goldstein K, et al. Haploidentical transplantation using G-CSF-mobilized T-cell replete PBSCs and post-transplantation CY after non-myeloablative conditioning is safe and is associated with favorable outcome Bone Marrow Transplantation. 2014; 49: 1124-1126.
 5. Burroughs LM, O'Donnell PV, Sandmaier BM, et al. Comparison of Outcomes of HLA-Matched Related, Unrelated, or HLA-Haploidentical Related Hematopoietic Cell Transplantation following Nonmyeloablative Conditioning for Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 1279-1287.
 6. Castagna L, Bramanti S, Furst S, et al. Nonmyeloablative conditioning, unmanipulated haploidentical SCT and post-infusion CY for advanced lymphomas. *Bone Marrow Transplantation* 2014; 49: 1475-1480.
 7. Castagna L, Crocchiolo R, Furst S, et al. Bone marrow compared with peripheral blood stem cells for haploidentical transplantation with a nonmyeloablative conditioning regimen and post-transplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014; 20: 724-729.
 8. Chen XH, Gao L, Zhang X, et al. HLA-haploidentical blood and bone marrow transplantation with anti-thymocyte globulin: Long-term comparison with HLA-identical sibling transplantation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 2009; 43: 98-104.
 9. Cho BS, Yoon JH, Shin SH, et al. Comparison of Allogeneic Stem Cell Transplantation from Familial-Mismatched/Haploidentical Donors and from Unrelated Donors in Adults with High-Risk Acute Myelogenous Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 Apr 16. [Epub ahead of print].
 10. Ciurea SO, Champlin RE. Donor Selection in T Cell Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Knowns, Unknowns, and Controversies. *Biol Blood Marrow Transplant* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2012.08.007>.
 11. Ciurea SO, Mulanovich V, Saliba RM, et al. Improved Early Outcomes Using a T-cell Replete Graft Compared with T-cell Depleted Haploidentical Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012; 18: 1835-1844.
 12. Di Bartolomeo P, Santarone S, De Angelis G, et al. Haploidentical, unmanipulated, G-CSF-primed bone marrow transplantation for patients with high-risk hematologic malignancies. *Blood.* 2013; 121: 849-857.
 13. Doderio A, Carniti C, Raganato A, et al. Haploidentical stem cell transplantation after a reduced-intensity conditioning regimen infusions for the treatment of advanced hematologic malignancies: posttransplantation CD8-depleted donor lymphocyte contribute to improve T-cell recovery. *Blood.* 2009; 113: 4771-4779.

14. Eapen M, O'Donnell P, Brunstein CG, et al. Mismatched Related and Unrelated Donors for Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Adults with Hematologic Malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014; 1e8.
15. Federmann B, Bornhauser M, Meisner C, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: a phase II study. *Haematologica.* doi:10.3324/haematol.2011.059378 Garzia 2015.
16. Guinan EC, Boussiotis V, Neuberg D, et al. Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allograft. *N Engl J Med.* 1999; 340: 1704-1714.
17. Huang XJ, Chang YJ, Zhao XY, et al. A direct comparison of immunological characteristics of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-primed bone marrow grafts and G-CSF mobilized peripheral blood grafts. *Hematologica.* 2005; 90: 715-716.
18. Huang XJ, Liu D-H, Liu K-Y, et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion for the treatment of hematological malignancies. *Bone Marrow Transplantation.* 2006, 38: 291-297.
19. Huang XJ, Zhu HH, Chang YJ, et al. The superiority of haploidentical related stem cell transplantation over chemotherapy alone as postremission treatment for patients with intermediate- or high-risk acute myeloid leukemia in first complete remission. *Blood.* 2012 119: 5584-5590.
20. Kanakry CG, Ganguly S, Zahurak M, et al. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. *Sci Transl Med.* 2013; 5: 211ra157.
21. Kanakry JA, Kasamon YL, Gocke CD, Outcomes of Related Donor HLA-Identical or HLA-Haploidentical Allogeneic Blood or Marrow Transplantation for Peripheral T Cell Lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013; 19: 602 e 606.
22. Kasamon YL, Luznik L, Leffell MS, et al. Nonmyeloablative HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation with High-Dose Posttransplantation Cyclophosphamide: Effect of HLA Disparity on Outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16: 482-489.
23. Kekre N, Antin JH. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood.* 2014; 124: 334-343.
24. Lee K-H, Lee J-H, Lee J-H, et al. Hematopoietic Cell Transplantation from an HLA-Mismatched Familial Donor Is Feasible Without Ex Vivo-T Cell Depletion after Reduced-Intensity Conditioning with Busulfan, Fludarabine, and Antithymocyte Globulin. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009; 15: 61-72.
25. Lee KH, Lee JH, Lee JH, et al. Reduced-intensity conditioning therapy with busulfan, fludarabine, and antithymocyte globulin for HLA-haploidentical hematopoietic cell transplantation in acute leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2011; 118: 2609-2617.
26. Lu D-P, Dong L, Gao Z-Y, et al. Conditioning including antithymocyte globulin followed by unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and marrow transplantation can achieve comparable outcomes with HLA-identical sibling transplantation. *Blood.* 2006; 107: 3065-3073.

27. Luznik L, Jalla S, Engstrom LW, et al. Durable engraftment of major histocompatibility complex-incompatible cells after nonmyeloablative conditioning with fludarabine, low-dose total body irradiation, and posttransplantation cyclophosphamide. *Blood*. 2001; 98: 3456-3464.
28. Luznik L, Jalla S, Engstrom LW, et al. Posttransplantation Cyclophosphamide Facilitates Engraftment of Major Histocompatibility Complex-Identical Allo-geneic Marrow in Mice Conditioned With Low-Dose Total Body Irradiation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002; 8: 131-138.
29. Luznik L, Jones RJ, Fuchs EJ. High-dose cyclophosphamide for graft-versus-host disease prevention. *Current Opinion in Hematology*. 2010; 17: 493-499.
30. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008; 14: 641-650.
31. O'Donnell PV, Luznik L, Jones RJ, et al. Nonmyeloablative Bone Marrow Transplantation from Partially HLA-Mismatched Related Donors Using Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplantation*. 2002; 8: 377-386.
32. Ogawa H, Ikegamec K, Yoshihara S, et al. Unmanipulated HLA 2-3 Antigen-Mismatched (Haploidentical) Stem Cell Transplantation Using Nonmyeloablative Conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006; 12: 1073-1084.
33. Ogawa H, Ikegamec K, Kaidac K, et al. Unmanipulated HLA 2-3 antigen-mismatched (haploidentical) bone marrow transplantation using only pharmacological GVHD prophylaxis. *Exp Hematol*. 2008; 36: 1-8.
34. Peccatori J, Forcina A, Clerici D, et al. Sirolimus-based graft-versus-host disease prophylaxis promotes the in vivo expansion of regulatory T cells and permits peripheral blood stem cell transplantation from haploidentical donors. *Leukemia*. 2015; 29: 396-405.
35. Raiola A, Dominiotto A, Varaldo R, et al. Unmanipulated haploidentical BMT following non-myeloablative conditioning and post-transplantation CY for advanced Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplantation*. 2013; 1-5.
36. Raj K, Pagliuca A, Bradstock K, et al. Peripheral Blood Hematopoietic Stem Cells for Transplantation of Hematological Diseases from Related, Haploidentical Donors after Reduced-Intensity Conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20: 881 e 903.
37. Rizzieri DA, Koh LP, Long GD, et al. Partially Matched, Nonmyeloablative Allogeneic Transplantation: Clinical Outcomes and Immune Reconstitution. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 690-697.
38. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Donor natural killer allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 2007; 110: 433-440.
39. Solomon SR, Sizemore CA, Sanacore M, et al. Haploidentical transplantation using T cell replete peripheral blood stem cells and myeloablative conditioning in patients with high-risk hematologic malignancies who lack conventional donors is well tolerated and produces excellent relapse-free survival:

- results of a prospective phase II trial. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012; 18: 1859-1866.
40. Sun YQ, Xu LP, Liu DH, et al. The incidence and risk factors of invasive fungal infection after haploidentical haematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 997-1003.
 41. Tamaki H, Ikegame K, Kawakami M, et al. Successful engraftment of HLA-haploidentical related transplants using nonmyeloablative conditioning with fludarabine, busulfan and anti-T lymphocyte globulin. *Leukemia.* 2003; 17: 2052-2054.
 42. Wang Y, Liu D-H, Xu L-P et al. Prevention of relapse using granulocyte CSF-primed PBPCs following HLA-mismatched/haploidentical, T-cell-replete hematopoietic SCT in patients with advanced-stage acute leukemia: a retrospective risk-factor analysis. *Bone Marrow Transplantation.* 2012; 47: 1099-1104.
 43. Wang Y, Liu DH, Xu LP, et al. Superior graft-versus-leukemia effect associated with transplantation of haploidentical compared with HLA-identical sibling donor grafts for high-risk acute leukemia: an historic comparison. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17: 821-830.

Regenerative medicine: something for the kidney?

Barbara Imberti

Unità di Biologia dello Sviluppo, Laboratorio di Biologia Cellulare e Medicina Rigenerativa,
IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Bergamo

Kidney stem and progenitor cells

The mammalian kidney is a highly complex organ composed of more than 20 different cell types in a precise structural arrangement which, while displaying a specialized role, work in concert to maintain organ function. The potential of the kidney to recover following renal injury has been widely confirmed in experimental animals and in humans (1, 2). While other animal species have during evolution maintained the capacity to generate new nephrons (nephron neogenesis) as a mean of providing new renal functional units (3-5), in mammals the regeneration process involves the repopulation of the injured nephrons with new epithelial cells that restore tissue integrity and function. The identification of the cells that during the reparative process may be the source of new functioning cells is of considerable interest as they could represent a therapeutic tool and target for treating patients with renal failure. Recent studies suggest that organ-specific stem and progenitor cells act as primary players in kidney regeneration. While stem cells can self-renew and replicate indefinitely, progenitor cells possess limited self-renewal potential or do not self-renew at all. Several approaches have been used to identify such cells within the kidney, including cell location, cell surface markers and functional properties (i.e. cell turnover). Stem cell niches have been proposed in different renal compartments, the renal corpuscle, the nephron tubule, and the renal papilla. A remarkable capacity to regenerate lost cells is observed in damaged tubuli. The cells that within the kidney represent the cell population that gives rise to new tubular cells have not been fully discovered. It is unclear whether any surviving tubular cells or a specialized progenitor cell population can regenerate the tubule. This issue has been a source of controversy for the last decade. Humphreys *et al.* showed that all the reparative epithelial cells originated from within the tubule and do not involve specialized progenitors (6, 7). Differently, a recently discovered subpopulation of tubular cells, scattered tubular cells, was proposed as the most likely candidate mediating cellular regeneration after acute kidney injury

(AKI) (8-10). These cells express high levels of CD133 and CD24, markers also found on glomerular parietal epithelial cells (PECs), and exhibit a transcriptional profile different from differentiated tubular cells. It has been suggested that in human kidneys a subset of renal progenitors is bipotent and displays the potential to differentiate into podocytes and proximal tubular cells (10-12). The existence of renal epithelial progenitors in the kidney may explain the regression of renal lesions that have been observed in experimental animals and even in humans (1). On the other hand, abnormal regenerative responses to podocyte injury passing through the activation of renal progenitors found in the Bowman's capsule can be responsible for the hyperplastic glomerular lesions.

Stem cell-based therapies

A promising approach for kidney regeneration is represented by a therapy based on the administration of exogenous cells. Although, renal progenitor cells represent an interesting option for cell-based therapy and have been shown working in AKI models due to their capacity to differentiate into new renal cells (12), their clinical translation is limited by the poor accessibility of the cell source in patients, limited expansion capacity and differentiation potential. Other type of cells potentially able to repair the kidney has been tested including cells of extrarenal origin such as mesenchymal stem cells (MSC) or renal progenitors obtained from the differentiation of pluripotent stem cells.

Mesenchymal stem cells

Cellular therapy for kidney disease has evolved rapidly over the last decade. Exogenous stem cells have been administered for treating acute kidney injury in animal models. Of all extra-renal cells, MSC are the most promising stem cell type for curing renal disease. MSC are located in the hematopoietic niche in the bone marrow (BM) where they locally release specific cytokines, chemokines and growth factors to regulate self-renewal, maturation and recruitment of hematopoietic stem cells (HSC) to the vascular compartment (13). Other tissues host MSC, including adipose tissue, skeletal muscle, peripheral blood, connective tissue, umbilical cord wall and blood, and amniotic fluid (14).

Our group documented that murine MSC exerted a protective effect in mice with AKI induced by the nephrotoxic drug cisplatin (15, 16). Administered MSC protected animals from renal function impairment and tubular injury. Renal tissue regeneration occurred through an increase in resident tubular cell proliferation via the release of paracrine factors (16). We also provided evidence that MSC obtained from human BM aspirates were effective in preserving renal function and tubular structure in the cisplatin model of AKI established in immunodeficient nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mice and prolonged life survival compared to mice given-saline (17). Treatment with BM-MSC helped to preserve microvascular integrity and ameliorated renal tissue oxygenation. Other sources for MSC have been tested as possible cell therapy for AKI, including umbilical cord blood (CB). Phenotypical analysis of these cells

revealed that CB-MSc had higher expression of genes involved in angiogenesis and matrix remodeling. When administered to NOD/SCID mice with cisplatin-induced AKI, CB-MSc exerted a stronger prolongation of animal survival compared to BM-MSc (18). Finally, we tested human amniotic fluid stem (AFS) cells, which represent a type of stem cell with high plasticity and expansion capacity. Cisplatin NOD/SCID mice receiving hAFS showed improvement in renal function and tubular damage (19).

Studies complementary to those on survival have tried to highlight the possible mechanisms involved in the regenerative processes activated by MSc treatment. The low engraftment of BM-MSc, in the site of renal injury of cisplatin-mice, in the proximity of peritubular areas and not within the tubular epithelium reasonably ruled out that administered cells regenerated renal structures via transdifferentiation into renal cells.

The release of soluble factors by MSc, acting in a paracrine manner, seems to be the most important pathway for exerting renal protection. Through silencing experiments it has been demonstrated that among growth factors, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) have an important role in mediating regenerative processes (16, 20). To explain the reno-protective effect the existence of additional mechanisms acting in concert with released growth factors has been suggested.

Microvesicles and exosomes are a new cell-to-cell communication mechanism that allows for the transfer of functional proteins or genetic material via mRNAs and microRNAs. MSc-released microvesicles have been shown to be efficacious in protecting mice with glycerol-induced AKI (21). Another report demonstrated that the repair of proximal tubular cells damaged with cisplatin took place through both the trophic effect of BM-MSc-released IGF-1 and the transfer of mRNA of the corresponding IGF-1 receptor via exosomes, increasing cell sensitivity to the growth factor (22). MSc-derived microvesicles have been considered a possible therapeutic strategy (23).

Reprogrammed mesenchymal stem cells

A recent publication by our group showed it is possible to obtain renal cells through reprogramming bone marrow-derived MScs (24). Specifically, human bone marrow-derived MScs have been reprogrammed into renal proximal tubular-like epithelial cells by using cell-free extracts. Indeed, when human bone marrow-derived MScs were exposed to cell extracts from HK2 (a proximal tubular cell line of human origin), human bone marrow-derived MScs changed morphology and acquired epithelial functional properties like transepithelial resistance, albumin-binding and uptake and specific markers E-cadherin and Aquaporin1. Brush border microvilli and tight intercellular contacts have been observed by transmission electron microscopy. Reprogrammed human bone marrow-derived MScs infused in immunodeficient mice with cisplatin-induced AKI were able to engraft into proximal tubuli, and improve renal function and injury. These data indicate that reprogrammed bone marrow-derived MScs can be a promising cell resource for future cell therapy.

Induced Pluripotent Stem Cells

The availability of cells that can efficiently replace cells from diverse compartments of the kidney is a crucial factor for cell-based therapy. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are pluripotent cells with high self-renewal capacity that can also be derived from human cells, providing the possibility of patient-specific treatments. In ischemia reperfusion-induced AKI, undifferentiated murine iPSCs administered via the intra-arterial route attenuated kidney injury via a paracrine mechanism (25). However, the employment of pluripotent cells that have not been pre-differentiated *in vitro* raises concerns about the high risk of teratoma formation. Therefore, the derivation of renal progenitors from iPSCs through *in vitro* exposure to differentiating conditions represents a crucial step for the applicability of iPSC-based cell therapy. Several studies have shown that murine embryonic stem cells (ESCs) and iPSCs can generate cells expressing intermediate mesoderm and metanephric mesenchymal markers through exposure to specific factors important for kidney development, including Activin A, retinoic acid, bone morphogenic proteins or glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF. Renal proximal tubular and podocyte lineages have been obtained from human ESCs and iPSCs (26, 27). Our group has recently reported the derivation of renal progenitor cells from two different cell lines from human iPSCs, one derived in our laboratory, through a stepwise inductive protocol able to drive the developmental progression of differentiating iPSCs through the intermediate mesoderm and metanephric mesenchyme phenotype, as confirmed by immunostaining and the analysis of gene expression profiles (28). *In vivo*, iPSC-derived renal progenitor cells functionally engrafted into renal tubuli, acquired a tubular epithelial phenotype and significantly protected renal function and structure from renal impairment in NOD/SCID mice with cisplatin-induced AKI. We have not observed signs of inappropriate differentiation and tumor formation in the renal tissues or other organs of animals receiving iPSC-derived renal progenitor cells after 8 weeks. These results highlight that iPSCs are a valuable source of engraftable cells with tissue regenerative potential for kidney disease and build the basis for new potential applications in stem cell-based renal therapy.

Kidney engineering

Tissue engineering technologies use scaffolds to grow cells and to obtain a new template for whole organs. However, the kidney is a structurally complex organ that is difficult to re-build *in vitro*. Due to this complexity, a natural scaffold obtained from decellularized kidneys can be a key step in this regenerative approach (29). Recently, several studies reported the decellularization of complex organs such as the heart, liver and lung, from rodents with preserved organ structural organization (30, 31). Indeed, it is critical that the organ-scaffold retains its intact three-dimensional (3D) structure, vasculature, and matrices. An acellular scaffold has been obtained from the decellularization of a rat kidney, maintaining intact renal matrices that are important for promoting adhesion, migration, proliferation, and differentiation of repopulating progenitor cells (32). To seed the whole-kid-

ney scaffold, murine ESC were infused via the renal artery and ureter. In a recent publication Bonandrini et al. reported an improved protocol for decellularizing rat renal ECM scaffolds and repopulating them with murine ESC under physiologic *in vitro* perfusion conditions (33). The whole-kidney scaffolds preserved the 3D structure of the vasculature, glomeruli and tubuli. Immunofluorescence analysis showed that renal matrices were well preserved, similar to those of native kidney tissues maintaining the expression of collagen IV, laminin and fibronectin. The decellularized kidney scaffold was then perfused with ESC cells through the renal artery, under pressure-controlled perfusion with recirculating cell medium for 24 and 72 hours. Analysis of the tissues showed that seeded cells populated the organ almost completely and distributed uniformly in the vascular network and in glomerular capillaries, whereas occasionally mES cells reached peritubular capillary and tubular compartment. No major signs of apoptosis were discovered. Adhered cells within the kidney scaffold showed a loss of pluripotency markers, and acquisition of phenotype referred to meso-endodermal lineage. The derivation of decellularized kidneys holds promise for the development of new strategies for organ replacement and may opening the possibility of repopulating tissue-engineered organs with pluripotent cells which can differentiate through contact with native organ matrices.

Embryonic kidneys

Engineering kidneys *de novo* to provide transplantable tissues represents an intriguing option for facing the problem of the shortage of transplantable organs. Studies have suggested the possibility of employing xenogeneic embryonic kidneys, the metanephroi, as a source of immature renal cells able to recreate *in vitro* an organotypic renal structure, the renal organoid. This is made possible by the capacity of single-cell suspensions dissociated from isolated metanephros to reaggregate to form the organotypic renal structure (34). However, *in vitro*, the formation of glomeruli is not possible. Recently, Xinaris et al. showed that murine renal organoids obtained *in vitro* from single-cell suspensions derived from E11.5 metanephroi, once transplanted beneath the renal capsule of living rat hosts, underwent maturation with the formation of vascularized glomeruli with fully differentiated capillary walls, including the slit diaphragm, and the appearance of erythropoietin-producing cells. Moreover, the transplanted renal tissue exhibited tubular reabsorption of macromolecules (35).

The transplantation of the embryonic kidney in the injured renal tissues has also been suggested as an interesting option for creating a microenvironment that activates regenerative processes (36). We have shown that metanephroi obtained from E15 rat embryos when transferred under the renal capsule are able to originate new renal structures in healthy animals and also in animals with spontaneous nephropathy (MWF rats) (36). Six weeks post-transplantation, renal anlagen developed glomeruli and tubuli able to filter blood and to produce urine in cyst-like structures. Moreover, metanephroi transplanted in MWF rats initiated a regenerative-like process in host renal tissues adjacent to the graft with an increase in

cell proliferation and vascular density, together with upregulation of mRNA and protein of VEGF, FGF2, HGF, IGF-1 and Pax-2. Also, oxidative stress and apoptosis associated with the chronic disease markedly decreased. This highlights the potential of embryonic kidneys on activating regenerative pathways within injured renal tissue. study

Bibliografia

1. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest.* 2006; 116: 288-296.
2. Remuzzi A, Gagliardini E, Sangalli F, Bonomelli M, Piccinelli M, et al. ACE inhibition reduces glomerulosclerosis and regenerates glomerular tissue in a model of progressive renal disease. *Kidney Int.* 2006; 69: 1124-1130.
3. Reimschuessel R, Bennett RO, May EB, Lipsky MM. Development of newly formed nephrons in the goldfish kidney following hexachlorobutadiene-induced nephrotoxicity. *Toxicol Pathol.* 1990; 18: 32-38.
4. Elger M, Hentschel H, Litteral J, Wellner M, Kirsch T, et al. Nephrogenesis is induced by partial nephrectomy in the elasmobranch *Leucoraja erinacea*. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 1506-1518.
5. Davidson AJ. Uncharted waters: nephrogenesis and renal regeneration in fish and mammals. *Pediatr Nephrol.* 2011; 26: 1435-1443.
6. Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, Mugford JW, Soeung S, et al. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell.* 2008; 2: 284-291.
7. Humphreys BD, Czerniak S, Di Rocco DP, Hasnain W, Cheema R, et al. Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 9226-9231.
8. Smeets B, Boor P, Dijkman H, Sharma SV, Jirak P, et al. Proximal tubular cells contain a phenotypically distinct, scattered cell population involved in tubular regeneration. *J Pathol.* 2013; 229: 645-659.
9. Romagnani P. Family portrait: renal progenitor of Bowman's capsule and its tubular brothers. *Am J Pathol.* 2011; 178: 490-493.
10. Lindgren D, Bostrom AK, Nilsson K, Hansson J, Sjolund J, et al. Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules. *Am J Pathol.* 2011; 178: 828-837.
11. Ronconi E, Sagrinati C, Angelotti ML, Lazzeri E, Mazzinghi B, et al. Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 322-332.
12. Angelotti ML, Ronconi E, Ballerini L, Peired A, Mazzinghi B, et al. Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury. *Stem Cells.* 2012; 30: 1714-1725.
13. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997; 276: 71-74.
14. Edwards RG, Hollands P. Will stem cells in cord blood, amniotic fluid, bone

- marrow and peripheral blood soon be unnecessary in transplantation? *Reprod Biomed Online*. 2007; 14: 396-401.
15. Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 1794-1804.
 16. Imberti B, Morigi M, Tomasoni S, Rota C, Corna D, et al. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 2921-2928.
 17. Morigi M, Introna M, Imberti B, Corna D, Abbate M, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells*. 2008; 26: 2075-2082.
 18. Morigi M, Rota C, Montemurro T, Montelatici E, Lo Cicero V, et al. Life-sparing effect of human cord blood-mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury. *Stem Cells*. 2010; 28: 513-522.
 19. Rota C, Imberti B, Pozzobon M, Piccoli M, De Coppi P, et al. Human amniotic fluid stem cell preconditioning improves their regenerative potential. *Stem Cells Dev*. 2012; 21: 1911-1923.
 20. Togel F, Cohen A, Zhang P, Yang Y, Hu Z, et al. Autologous and allogeneic marrow stromal cells are safe and effective for the treatment of acute kidney injury. *Stem Cells Dev*. 2009; 18: 475-485.
 21. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20: 1053-1067.
 22. Tomasoni S, Longaretti L, Rota C, Morigi M, Conti S, et al. Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2013; 22: 772-780.
 23. Biancone L, Bruno S, Deregibus MC, Tetta C, Camussi G. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; 27: 3037-3042.
 24. Papadimou E, Morigi M, Iatropoulos P, Xinaris C, Tomasoni S, et al. Direct reprogramming of human bone marrow stromal cells into functional renal cells using cell-free extracts. *Stem Cell Reports*. 2015; (in Press).
 25. Lee PY, Chien Y, Chiou GY, Lin CH, Chiou CH, et al. Induced pluripotent stem cells without c-Myc attenuate acute kidney injury via downregulating the signaling of oxidative stress and inflammation in ischemia-reperfusion rats. *Cell Transplant*. 2012; 21: 2569-2585.
 26. Batchelder CA, Lee CC, Matsell DG, Yoder MC, Tarantal AF. Renal ontogeny in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and directed differentiation of human embryonic stem cells towards kidney precursors. *Differentiation*. 2009; 78: 45-56.
 27. Song B, Smink AM, Jones CV, Callaghan JM, Firth SD, et al. The directed differentiation of human iPS cells into kidney podocytes. *PLoS One*. 2012; 7: e46453.
 28. Imberti B, Tomasoni S, Ciampi O, Pezzotta A, Derosas M, et al. Renal progenitors derived from human iPSCs engraft and restore function in a mouse model of acute kidney injury. *Scientific Reports*. (2015); (in Press).

29. Badylak SF, Weiss DJ, Caplan A, Macchiarini P. Engineered whole organs and complex tissues. *Lancet*. 2012; 379: 943-952.
30. Park KM, Woo HM. Systemic decellularization for multi-organ scaffolds in rats. *Transplant Proc*. 2012; 44: 1151-1154.
31. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 2008; 14: 213-221.
32. Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T, Terada N, Clapp WL, et al. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20: 2338-2347.
33. Bonandrini B, Figliuzzi M, Papadimou E, Morigi M, Perico N, et al. Recellularization of well-preserved acellular kidney scaffold using embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2014; 20: 1486-1498.
34. Unbekandt M, Davies JA. Dissociation of embryonic kidneys followed by re-aggregation allows the formation of renal tissues. *Kidney Int*. 2010; 77: 407-416.
35. Xinaris C, Benedetti V, Rizzo P, Abbate M, Corna D, et al. In vivo maturation of functional renal organoids formed from embryonic cell suspensions. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 1857-1868.
36. Imberti B, Corna D, Rizzo P, Xinaris C, Abbate M, et al. Renal primordia activate kidney regenerative events in a rat model of progressive renal disease. *Plos One*. 2015; (in press).

La verità sulle cellule staminali

Giuseppe Remuzzi

Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Parco Scientifico Tecnologico Kilometro Rosso, Bergamo

Un giorno le cellule staminali serviranno per curare diabete, Alzheimer, Parkinson, lesioni del midollo spinale, certe malattie rare e chissà forse con le cellule si potranno riparare i danni al cuore, al rene, al fegato. Ma che cosa si può davvero curare già oggi con le cellule staminali? Due cose: le malattie del sangue e certe malattie rare del sistema immune, le immunodeficienze primitive soprattutto, e questo si fa a Milano. E poi si possono riparare pelle e cornea. In Italia lo fa Michele De Luca a Modena. Presto lui e i suoi collaboratori sapranno rimediare anche alle lesioni della mucosa dell'uretra e quella del cavo orale. E c'è chi lavora per riparare il cuore dopo l'infarto in Germania, Inghilterra, Francia, Italia, Stati Uniti e Giappone. Per le altre malattie in Europa e negli Stati Uniti con le cellule si fa soprattutto ricerca non per curare per adesso ma piuttosto per capire (quali cellule usare per esempio e per quali malattie e poi quanto pure e quante devono essere e dove le si devono mettere).

Si tratta anche di stabilire se questi trattamenti sono abbastanza sicuri - safety dicono gli anglosassoni - da poter diventare una cura. Progetti così ce n'è tanti, per la sclerosi multipla per esempio lo stanno facendo a Chicago - hanno pubblicato un lavoro nel Lancet - e a Louisville negli Stati Uniti. Per la sclerosi laterale amiotrofica è già stato avviato uno studio in Spagna che impiega cellule del midollo osseo e altri gruppi anche in Italia hanno fatto esperimenti preliminari o si preparano a farlo. A Londra all'Imperial College c'è uno studio con le cellule staminali per le fratture della tibia, a Basilea c'è n'è uno per curare le piaghe da decubito e negli Stati Uniti l'FDA sta per approvare uno studio con cellule embrionali umane per i danni del midollo spinale. Bambini con distrofia muscolare sono già stati trattati con cellule staminali in studi preliminari a Milano. In Europa e negli Stati Uniti gli ammalati devono essere informati di tutti i dettagli del protocollo e del fatto che per adesso questi studi servono solo per capire, di efficacia se ne parlerà dopo. E serve l'approvazione di autorità regolatorie (per noi è l'Istituto Superiore di Sanità) che valutano tutto quello che si vuole fare in ogni dettaglio, dal disegno dello studio alla preparazione delle cellule (se non sono pure o non sono state manipolate a regola d'arte le cellule trasmettono infezioni e tumori). Ma nessuno può impedire agli ammalati di andare all'estero e farsi curare dove non ci sono regole. Lo chiamano "turismo delle cellule" (è il titolo di un World Report - notizie dal mondo - del Lancet) di solito sono medici che lavorano in paesi emergenti o addirittura

poveri dove la ricerca clinica non ha vincoli e si può fare più o meno quello che si vuole senza aspettare i risultati degli studi fatti con i criteri della scienza. Roberto Brenes lavora in una clinica di San Jose in Costa Rica. Lui e i suoi colleghi hanno trattato quasi 70 ammalati con sclerosi multipla con cellule staminali prese dal tessuto adiposo. Gli ammalati spendono fra 15.000 e 25.000 dollari ogni volta. E i risultati? Buoni a detta di Brenes che a chi gli chiede cita spesso il caso di un ammalato del Tennessee che dopo due mesi di cura ha potuto lasciare la sedia a rotelle e stare in piedi per un po', ma aveva fatto anche tanta fisioterapia. E c'è un altro caso, un bambino di 9 anni di Israele con una malattia rara del cervello, si chiama atassia telangettastica, l'hanno curato con cellule staminali fetali. I suoi dottori, quelli di Tel Aviv di quel trattamento non volevano sentir parlare ma i genitori insistevano e alla fine l'hanno fatto, contro il parere dei medici. Per farlo sono andati in una clinica di Mosca: nel 2001 le prime iniezioni, e poi ancora nel 2002 e nel 2004. Quattro anni dopo il bambino ha mal di testa, fa una TAC a Tel Aviv e vedono che ha un tumore al cervello e al midollo spinale. Le cellule di quel tumore non sono del bambino, vengono con ogni probabilità da quelle iniettate a Mosca. Questa storia i medici di Tel Aviv l'hanno scritta su Plos Medicine dello scorso febbraio, e così adesso si sa. Quanti ce ne saranno stati di casi così, mai pubblicati? I medici del "turismo delle cellule" ragionano così "per avere risultati da studi clinici fatti a regola d'arte - per la sclerosi multipla tanto per fare un esempio - ci vorranno 10-15 anni, ma da me vengono malati che vogliono guarire adesso e mi chiedono di fare tutto quello che si può, e allora perché non provare?" Mentre in qualche paese dell'Europa - ma soprattutto in Italia - si discute se le cellule debbano essere embrionali o adulte (quelle del bambino di Tel Aviv erano adulte) in Asia le cliniche che promettono miracoli con le cellule - scrivono Kiatpongsan e Sipp su Science - sono sempre di più.

C'è niente che si può fare per evitare che questi gruppi vadano troppo avanti? Giornali e televisione possono fare tanto. La BBC ha fatto un serie di documentari che hanno rivelato come ci sia un commercio di feti umani fra Ucraina e Caraibi a vantaggio del "turismo delle cliniche delle cellule". La cosa ha suscitato scandalo e l'Istituto per la Medicina Rigenerativa delle Barbados ha perso clienti e ha dovuto chiudere. Anche gli scienziati possono fare molto, preparare documenti sui requisiti minimi per l'impiego delle cellule da far conoscere ai governi, ai giornalisti e alla gente. Forse è venuto il momento che anche l'Organizzazione Mondiale della Sanità prenda una posizione chiara perché la gente sappia quali malattie si possono davvero curare oggi con le cellule e per quali invece ci sono prospettive interessanti ma niente che possa curare o guarire. Lo si deve fare subito per evitare il fai-da-te, si rischia che effetti negativi anche gravi e frodi finiscano per offuscare le grandi potenzialità di questi trattamenti. Anche gli ammalati devono fare la loro parte ma bisogna spiegargli bene come stanno le cose. Oggi con le cellule per riparare organi e tessuti e curare la sclerosi multipla o le lesioni del midollo spinale siamo al punto in cui si era quarant'anni fa col trapianto di midollo per la leucemia. Per quanto avanzatissime queste ricerche sono "in fasce" rispetto alle loro potenzialità, hanno bisogno di essere protette, proprio come si fa con un bambino appena nato.

Microfluidica e cellule tumorali circolanti: progressi tecnologici

Giuliano Mazzini

Istituto di Genetica Molecolare CNR e Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “Lazzaro Spallanzani”,
Università di Pavia

Il conteggio, l'analisi e la caratterizzazione di sottopopolazioni a bassa o bassissima numerosità (nel sangue o in altri fluidi biologici) è certamente una delle sfide tecnologiche più affascinanti dei nostri giorni. È comunque curioso evidenziare come negli ultimi decenni del secolo scorso la stessa tecnologia ha avuto come “mission” quella di analizzare migliaia di cellule in pochi secondi...

Background

L'analisi di grandi numeri di cellule ha da anni trovato nella citometria a flusso (CF) la strumentazione di elezione che consente in tempi brevissimi e con elevato valore statistico di ottenere informazioni molto dettagliate sia di contenuti quantitativi sia di caratteristiche morfo-funzionali. Sulla base di questi risultati analitici alcuni strumenti possono essere oltre che “analizzatori” anche “separatori” in grado cioè di separare fisicamente due o più popolazioni distinte appunto da differenti proprietà biologiche (evidenziate ad esempio attraverso specifiche marcature immunofluorescenti).

Le tecniche di citometria a flusso sono ormai considerate insostituibili in molte problematiche biomediche basate sull'analisi cellulare. Fra tutte la fenotipizzazione linfocitaria è sicuramente quella più strettamente legata a questa strategia analitica. Tuttavia anche la CF ha subito ed è tuttora coinvolta e soggetta a significative evoluzioni sia tecnologiche che applicative. Basti pensare al “sorting” convenzionale elettrostatico nato più o meno con la CF ed ora profondamente modificato per limitare i danni che il campo elettrico provoca alla vitalità delle cellule separate. È infatti noto che la “separazione fisica” delle cellule (ovvero la deflessione delle particelle liquide che le contengono) era tradizionalmente originata da elevate differenze di potenziale (dell'ordine delle decine di Kvolts) con effetti anche letali sulle cellule che avevano subito la deflessione cioè proprio quelle selezionate “attivamente”. Per ovviare a questi inconvenienti i “sorter citometrici” di ultima generazione utilizzano principi diversi dall'elettrostatico nell'intento di indurre meno stress elettromeccanici alla popolazione separata.

Una importante considerazione riguarda inoltre il numero delle cellule da analiz-

zare: la CF nasce per analizzare grandi numeri di cellule (decine di migliaia) in alternativa ai metodi di osservazione e conteggio attraverso il microscopio (conteggi manuali mediante camera di Burker) che sono certamente lenti, noiosi e laboriosi. Oggi molte delle applicazioni cliniche sono basate sul conteggio preciso di pochi elementi cellulari (conta assoluta ad esempio dei linfociti CD4+ nelle immunodeficienze o delle cellule CD34+ nelle problematiche di trapiantologia) se non addirittura alla ricerca e conteggio di elementi contaminanti o comunque presenti a frequenza molto bassa (eventi rari) in vari liquidi biologici. Ancora a proposito di “sorting”, fondamentale è stato il contributo della separazione basata su microparticelle ferromagnetiche che consentono una grandissima versatilità applicativa.

La strumentazione commercialmente disponibile (e la relativa metodologia di separazione basata su anticorpi legati a micro o nano-particelle magnetiche), ad oggi, è totalmente dedicata alle problematiche cliniche basate rispettivamente sull’arricchimento (detto anche separazione “positiva”) o sulla deplezione cellulare (o separazione negativa). La prima tecnica consente di ottenere una frazione arricchita degli elementi cellulari di interesse (es CD34+ da donatore, da trasferire in paziente o da espandere in vitro) mentre la seconda consente invece di eliminare elementi cellulari indesiderati (es. CD14+ prima di procedere alla conta dei CD4+). In entrambi i casi le cellule, “separate” grazie al campo magnetico, rimangono legate ad un supporto (ovvero, colonne “disposable” macro o micro) che viene eliminato nel caso della deplezione (infatti contiene le cellule indesiderate) e dal quale invece devono essere “eluite” (con resa più o meno elevata) le cellule di interesse nel caso della separazione “positiva”.

A questo secondo caso appartengono anche le problematiche analitiche basate sulla cattura e/o conteggio di elementi cellulari rari. Questi infatti una volta catturati devono essere recuperati per controllo/conteggio microscopico o per successive analisi di biologia molecolare. Ancora da sottolineare è il fatto che il rendimento finale di tale processo di conta dipende sia dalla efficienza della fase di cattura sulla colonna sia dalla efficienza di rilascio dalla colonna alla soluzione di raccolta. È evidente quindi che per problematiche riguardanti la separazione di eventi rari (dove sono coinvolte spesso poche decine di cellule) questo tipo di separazione magnetica, ancorché di grande interesse, si sta rivelando a volte poco efficace. Da qui l’esigenza di sviluppare nuovi sistemi di cattura e conta, sempre basati sul principio della separazione magnetica, che non richiedono però colonne da eluire al termine della separazione.

Nuove metodologie

Nei laboratori IGM-CNR Sez Istoch/Citometria sono in corso da alcuni anni ricerche di sviluppo tecnologico e metodologico mirate alla realizzazione di dispositivi di separazione e conta cellulare finalizzati a portare le cellule separate direttamente su un “supporto” (tipo vetrino) da microscopia per essere direttamente contate e/o analizzate con metodiche immunocitochimiche.

Recentemente tali ricerche hanno portato alla realizzazione pratica di un dispo-

sitivo (“Micro-count”) per separazione immunomagnetica di elementi cellulari presenti a bassa frequenza in liquidi biologici. Il sistema è stato sviluppato per trattare microvolumi di campione (50 μ l) che potrà contenere un numero di cellule (da separare “positivamente”) di 100-200 elementi. A fine procedimento le cellule separate rimangono adese alla superficie di un vetrino copri-oggetto, in aree predefinite, per una immediata osservazione/conta al microscopio. Il sistema realizzato (mostrato in Figura 1) è composto da una matrice di otto pozzetti per la gestione ad es. di quattro campioni e dei rispettivi controlli.

Più in dettaglio la cella di separazione è costituita da un “sandwich” di tre elementi: il blocco separatore, il supporto che raccoglie le cellule separate e il blocco dei pozzetti. Il blocco separatore è costituito da una lastrina di plexiglass che incorpora una matrice di otto mini-magneti di materiale super paramagnetico (neodimio) che hanno il compito di esercitare un forte campo magnetico necessario per la separazione (in questo caso in contro-gravità). Il supporto di raccolta delle cellule separate è costituito da un normale vetrino coprioggetto da microscopia (24x50 mm) che diventa “fondo” dei pozzetti destinati ad ospitare il campione (o i campioni) da analizzare. Il blocco dei pozzetti è anch’esso costituito da una piastrina di plexiglass forata in corrispondenza delle posizioni dei magneti della lastrina sovrastante. I tre elementi montati a sandwich realizzano un sistema multipozzetto (Fig. 1a).

Abbiamo sperimentato questo sistema in alternativa alla tecnica di CF per il conteggio dei linfociti CD4+ in pazienti affetti da immunodeficienze con l’intento di realizzare un approccio alternativo semplice orientato ad applicazioni massive nei paesi in via di sviluppo. Il metodo prevede l’utilizzo di un solo monoclonale

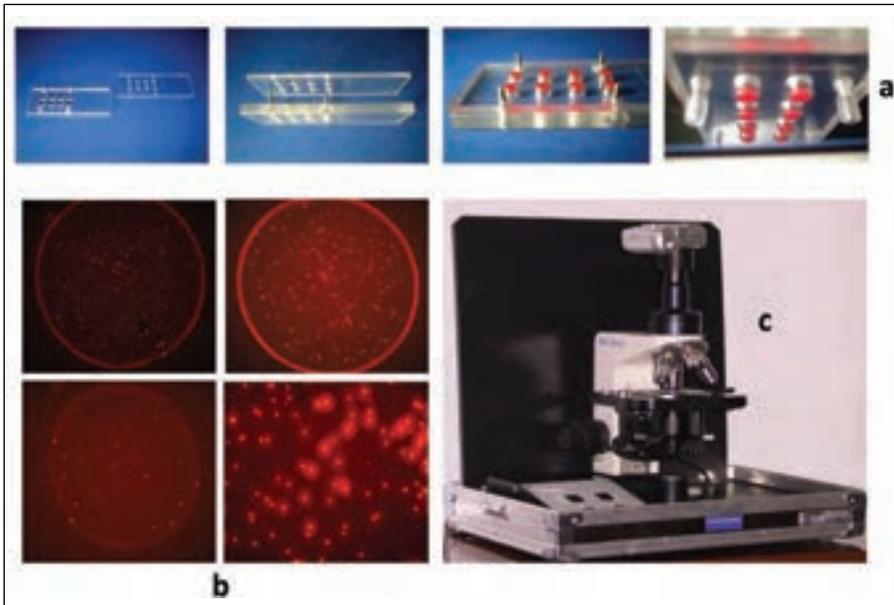


Fig. 1

specifico (nel nostro caso anti-CD4-MicroBeads Miltenyi Biotec 130-050-201) su microvolume di sangue intero senza necessità di successiva lisi dei rossi. Il sangue è deposto direttamente nei pozzetti (50 microL) e qui miscelato con il reagente. Si mantiene il sistema in agitazione (piastra a rivoluzione planetaria) per 10 minuti e quindi semplicemente si capovolge tutto il sistema (come si faceva un tempo con le tecniche dei “vetrini a goccia pendente”) sul banco di lavoro. Si viene così a realizzare (in ogni pozzetto) un sistema di separazione immunomagnetica in contro-gravità. In dettaglio avviene che tutti gli eritrociti e le cellule non marcate sedimentano verso il menisco inferiore del pozzetto, mentre quelle che hanno legato le particelle magnetiche (in questo caso i linfociti CD4+) risentono della forte attrazione del campo magnetico (ora nella parte alta del pozzetto) e quindi si “bloccano” sul vetrino coprioggetto. Dopo 1 h si appoggia il sistema su carta assorbente che in pratica svuota i pozzetti e consente quindi smontando il separatore di recuperare il vetrino con adese le cellule. Si lascia asciugare per non delocalizzare le cellule nelle rispettive “impronte”, si passa poi in etanolo 70 e quindi alla colorazione dei nuclei con un fluorocromo (ioduro di propidio) e quindi alla successiva osservazione e conteggio diretto al microscopio a fluorescenza (Fig. 1b). Per consentire di utilizzare questo sistema anche in condizioni estreme (laboratori mobili o da “campo”) presso i laboratori IGM-CNR è stato anche messo a punto (in collaborazione con FRAEN srl Milano) un primo prototipo di microscopio portatile a fluorescenza. Grazie all’impiego di LED (diodi luminescenti) di potenza è stato infatti possibile realizzare un illuminatore in grado di trasformare un microscopio classico in uno a fluorescenza “portatile” alimentato a batteria (Fig. 1c). Sempre in tema di identificazione e conteggio di “eventi rari” a livello clinico, sono diventate attuali numerose problematiche che hanno appunto come denominatore comune quello di coinvolgere pochissimi elementi cellulari cui però è legata una grande valenza analitica. L’ambito clinico è vasto e va dal trasfusionale (leucociti residui nelle sacche di emo-derivati) al trapiantologico (caratterizzazione delle cellule staminali) alla ricerca degli eritroblasti fetali nel circolo della madre fino ad emergenti problematiche di oncologia solida ed ematologica. Proprio in questi ultimi due distretti sono in atto grandi sfide tecnologiche e metodologiche per arrivare al miglior approccio possibile (che come spesso accade non è sempre facilmente raggiungibile). Anche su questi temi ci siamo attivati all’ IGM-CNR e sulla base dell’esperienza fatta con la tecnica “Micro-count” abbiamo messo a punto un secondo sistema di separazione immunomagnetica che ha dovuto tener conto del diverso contesto di tipologia e di preparazione del campione. Sul tema specifico della ricerca delle cellule tumorali circolanti (CTC), nel sangue periferico di pazienti oncologici, abbiamo fatto riferimento ad un approccio analitico commerciale (“Cell Search” della Veridex) che, nonostante varie validazioni (inclusa FDA-USA), per una serie di ragioni (costi principalmente, ma non solo) non ha trovato ad oggi larga diffusione. Dai dati disponibili in letteratura sulla frequenza di CTC nel periferico in varie tipologie e stadi di malattie oncologiche risulta un range di valori da poche unità (2-5) a centinaia (100-200) valutati in 7,5 ml di sangue periferico. Il sistema Veridex gestisce questo volume di sangue in due fasi ed in modo semiautomatico mediante l’impiego di appositi

“disposable” e reagenti dedicati per arrivare o al numero di cellule contate o a un supporto che contiene le cellule separate, per la loro successiva osservazione/controllo al microscopio. Con questa premessa abbiamo sperimentato una implementazione del sistema “Micro-count” per realizzare una strategia di separazione adatta a questa tipologia di campione e sempre con l’obiettivo finale di recuperare direttamente le cellule su vetrino da microscopio. Poiché è necessario partire da grandi volumi di sangue è indispensabile lavorare sulla frazione di cellule mononucleate ottenute da separazione in Ficoll del campione di sangue di partenza. È comunque noto dalla letteratura che le CTC si vanno a raccogliere in questa frazione di cellule. Altro punto critico è il marcatore di elezione che si decide di utilizzare: inizialmente il sistema Veridex era basato su selezione positiva realizzata mediante monoclonale anti-EpCam e successiva ulteriore caratterizzazione delle cellule con altre marcature specifiche (positività a DNA/nucleo e citocheratine ed assenza di marcatura CD45). Nel recente passato però una serie di lavori hanno dimostrato che la ben nota eterogeneità di espressione delle molecole di superficie delle cellule tumorali ha messo in discussione la “robustezza” del parametro EpCam quale cardine della immuno-cattura delle CTC. Nel nostro caso abbiamo utilizzato come marcatura primaria un mix di anticorpi (mouse) anti-EpCam e anti-PanCitocheratina (8-18-19) seguita da una marcatura secondaria con microparticelle magnetiche (Dynabeads® Goat anti-Mouse IgG, 4.5 micron). Il sistema utilizzato è mostrato in Figura 2a, ed è stato realizzato per operare con piastre multiwell standard da 6 pozzetti. Il blocco portamagneti (sul quale si appoggia la piastra a pozzetti) monta sei magneti al neodimio (intercambiabili) due dei quali grandi (circa un terzo del fondo del pozzetto) e quattro piccoli di 3 mm di diametro. Il campione incubato con i reagenti di cui sopra (volume di circa 2 ml)

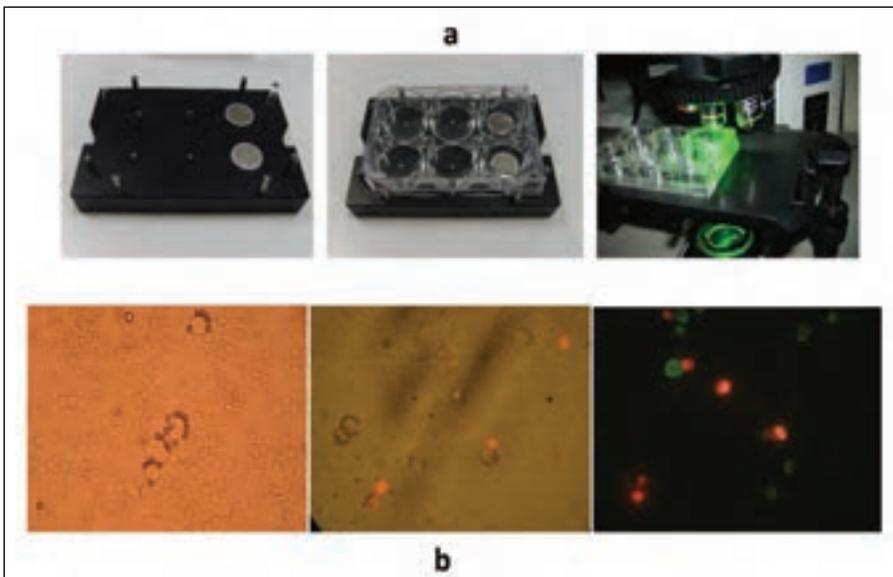


Fig. 2

è posto in uno dei pozzetti sovrastanti i magneti grandi e quindi il tutto è posto per 30 min su un piano basculante (planetario). In questo modo le cellule “positive” (epiteliali/tumorali) avranno legato le microsfeere e quindi saranno trattenute (dal campo magnetico) al fondo del pozzetto, mentre le “negative” (tutti i leucociti ed i rossi residui, essendo il campione non lisato) saranno flottanti nel mezzo liquido. Con una serie di lavaggi/agitazioni sarà possibile rimuovere tutte le cellule non marcate lasciando infine le cellule trattenute al fondo del pozzetto. Si può quindi togliere la piastra dal contatto dei magneti e aspirare con un po’ di terreno/PBS le cellule separate per trasferirle in un pozzetto adiacente che porta sul fondo un vetrino coprioggetto in corrispondenza di uno dei magneti piccoli. Un successivo passaggio per 15 min sul piano basculante farà in modo che le poche cellule catturate si vadano a localizzare al centro del vetrino dove è concentrata l’azione del magnete piccolo. Il vetrino potrà poi essere processato al microscopio (Fig. 2b) come precedentemente descritto nel sistema “Microcount”.

La frazione di cellule recuperata sarà quindi disponibile per ogni ulteriore caratterizzazione immunocitochimica così come per ogni parallela indagine di biologia molecolare. Se la quantità di cellule recuperate dovesse essere consistente (dell’ordine delle migliaia di elementi) questa frazione di campione potrà essere normalmente analizzata come “frazione arricchita” mediante citometria a flusso. Una ultima nota riguarda la possibilità di separare le cellule in condizioni di sterilità se ulteriori indagini di biologia molecolare richiedessero la necessità di espandere in vitro la sottopopolazione separata.

Nuovi orizzonti biotecnologici

L’evento biologico di “generazione di metastasi tumorale” è costituito da una complessa cascata, non ancora perfettamente chiarita, di fattori genetici ed ambientali che concorrono insieme ad eventi biofisici a stimolare determinate cellule ad abbandonare il tumore primario per dirigersi in sedi distali ove potranno dare luogo ad un tumore secondario. Dati recenti della letteratura testimoniano che gli aspetti biofisici, ovvero le proprietà bio-meccaniche della cellula (struttura più o meno rigida del suo citoscheletro, elasticità più o meno spiccata della sua membrana plasmatica) e la capacità del microambiente del tumore di modularle (nel senso di stimolarle) verso un comportamento più o meno “metastatico” sono punti chiave, al centro dell’attenzione di molti ricercatori di area biomedica. In un recente Progetto di ricerca ci siamo posti l’obiettivo di investigare le proprietà biofisiche e specificamente la “plasticità della membrana cellulare” per arrivare a definire (o potremmo dire prevedere) quello che potrà essere il comportamento di queste cellule in termini di mobilità e/o migrazione, fattori questi che sono strettamente connessi alla “capacità metastatica”. È noto che le cellule del tumore primario, per generare metastasi, devono subire una trasformazione morfologica nota come transizione epitelio-mesenchimale (EMT), ovvero devono acquisire una maggior plasticità, tipica di cellule mesenchimali, per riuscire a migrare, attraversando membrane basali e/o endoteli. È stato già sottolineato in letteratura che la differente plasticità cellulare può essere influenzata dal microambiente tri-

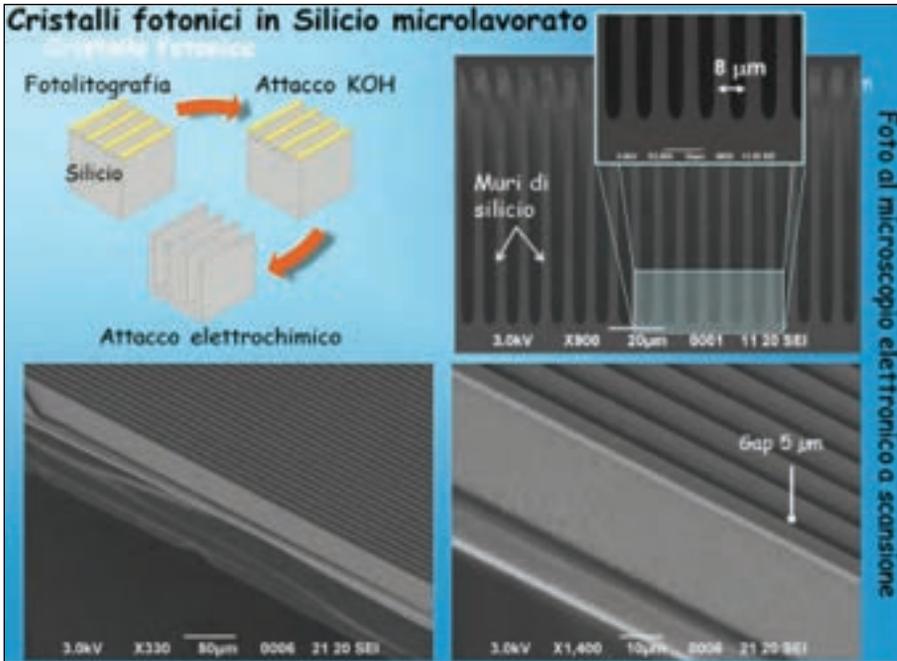


Fig. 3

dimensionale che circonda le cellule. Da qui l'esigenza di esplorare la coltura in 3D, anziché su supporti planari, per studiare gli effetti che questa può indurre sul citoscheletro e sugli aspetti morfofunzionali delle cellule.

Nell'ambito di una collaborazione interdisciplinare fra Dipartimenti diversi (IGM-CNR, Oncologia Osp. Vigevano, Mario Negri MI, Dip. Ing. Industriale & Informazione Uni PV e Ing. Informazione Uni PI) stiamo investigando l'applicazione di microchip in silicio quali microincubatori 3D per applicazioni biomediche (Fig. 3).

In questo progetto proponiamo l'utilizzo di microstrutture in silicio per la coltura di cellule tumorali umane in un microambiente tridimensionale, al fine di caratterizzarne il potenziale metastatico, che è ritenuto, oggi con grande consenso, un fattore prognostico (negativo) importante nell'evoluzione della malattia oncologica.

Le microstrutture che proponiamo di utilizzare consistono in schiere periodiche di muri di silicio alternati ad intercapedini vuote con dimensioni dell'ordine di pochi micrometri e con elevato rapporto d'aspetto, ricavate tramite microlavorazione di tessere di circa 1 cm^2 . Il nostro gruppo di ricerca ha già ottenuto risultati significativi nell'impiego di queste microstrutture in campo biomedico, dimostrando che esse possono svolgere la duplice funzione di incubatori e trasduttori ottici per lo studio del comportamento di biomolecole e cellule in ambiente tridimensionale. In particolare, abbiamo dimostrato la possibilità di usare questi supporti per differenziare linee cellulari con comportamento epiteliale da quelle mesenchimali,

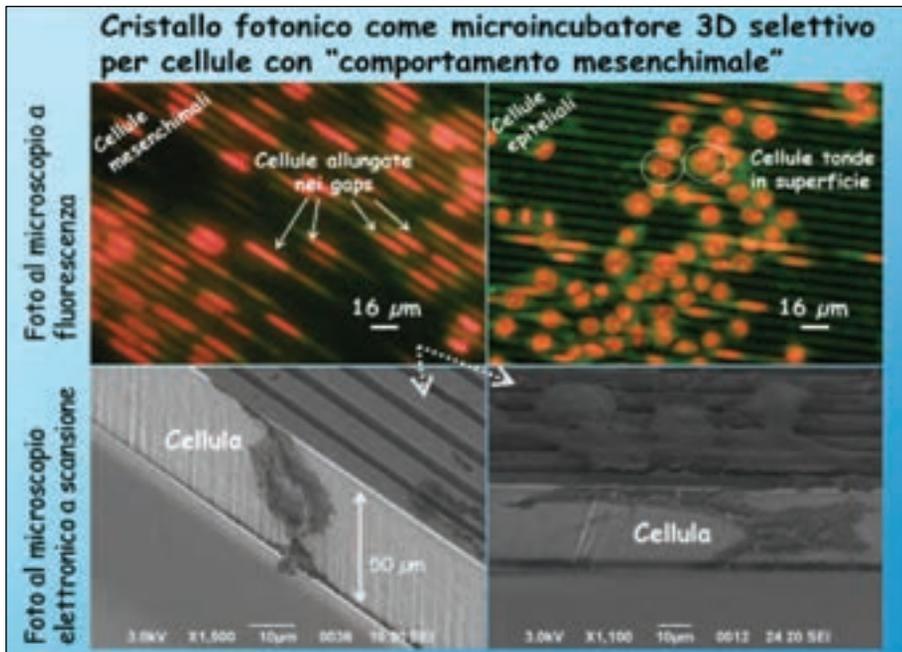


Fig. 4

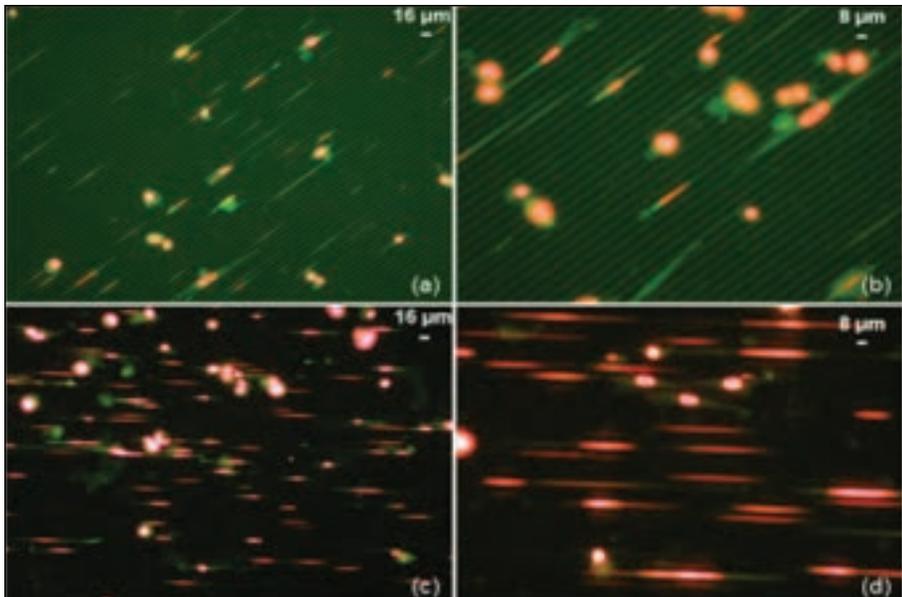


Fig. 5 - Cellule di Lewis Lung isolate dal tumore primario (a, b) e da una metastasi (c, d) e coltivate per 48h su MS8, fissate e colorate con miscela FITC/PI. L'osservazione in fluorescenza con eccitazione blu mostra la distribuzione delle cellule sopra e dentro il silicio. **Conclusion:** Si può notare come la maggior parte delle cellule sia dentro le intercapedini e questo fenomeno si osserva in percentuale maggiore nel caso delle cellule provenienti da metastasi.

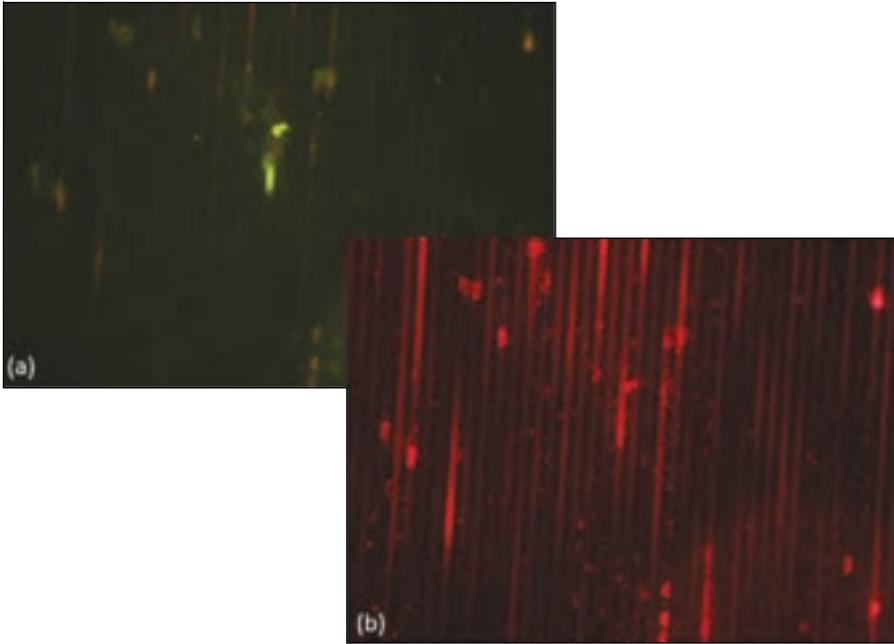


Fig. 6 - Particolare dello stesso campione CMP a maggiore ingrandimento (40x). Campioni fissati e marcati con anticorpo anti citocheratina-FITC (a) e con PI (b). È evidente la fluorescenza verde specifica di una sola cellula positiva a citocheratina mentre le altre mostrano solo fluorescenza aspecifica di fondo.

Conclusion: la cellula CK-positiva trovata inserita fra i muri di silicio testimonia che la microstruttura MS8 può funzionare da microincubatore tridimensionale selettivo per catturare le CTC nel sangue periferico di pazienti oncologici.

dato che solo queste ultime sono in grado di popolare attivamente le strette intercapedini tra i muri (Fig. 4). Nella fase iniziale abbiamo studiato varie linee cellulari stabilizzate derivate da tumori umani con differenti capacità metastatiche. Queste cellule sono state coltivate con tecniche standard sia su vetrini tradizionali che su tessere di silicio microlavorato. Per valutare il comportamento delle cellule su silicio 3D (non trasparente nel visibile, come i vetrini classici) è stato necessario ricorrere a procedimenti di marcatura citochimica e immunocitochimica con utilizzo di varie tecniche microscopiche, in particolare basate su rivelazione in fluorescenza in luce incidente in riflessione.

Utilizzando tecniche software di elaborazione delle immagini, acquisite al microscopio, abbiamo valutato la diversa capacità delle cellule di popolare attivamente le strette intercapedini della microstruttura in silicio e con analisi statistica abbiamo quantificato questa capacità e quindi la sua correlazione con il potenziale metastatico.

Abbiamo quindi verificato la validità di questo nuovo approccio analitico (che si pone come alternativa al test di Boiden) in un modello di tumore sperimentale quale il “Lewis lung” del topo (Fig. 5). I risultati dell’analisi quantitativa dimostrano l’efficienza della microstruttura come microincubatore selettivo in grado di monitorare il grado di aggressività biologica delle cellule che vi crescono, siano

esse rappresentate da linee cellulari tumorali di varia origine sia cellule derivate da tumori sperimentali (nel nostro caso carcinoma Lewis lung). Dal confronto fra il comportamento su silicio delle cellule del tumore primario, rispetto a quello delle cellule derivate dalla metastasi, abbiamo avuto la conferma della validità del metodo e siamo quindi passati alla valutazione di alcuni campioni clinici, ovvero il sangue periferico di pazienti oncologici. La soluzione che abbiamo sperimentato è quella della coltura a tempi lunghi (5 giorni) che vede il deperimento/morte delle cellule normali, verso la sopravvivenza delle sole cellule tumorali che rimangono vitali dentro/sopra il silicio. Con una metodica di rivelazione con anticorpo anti Citocheratina (CK) marcato con FITC in una serie di tre pazienti oncologici ed un controllo normale, abbiamo verificato in un paziente (in stadio clinico avanzato e con metastasi) la presenza (Fig. 6) di una quota significativa di cellule positive a CK, verosimilmente riferibili a CTC.

Sebbene questi dati siano ancora preliminari essi rappresentano un primo passo verso una caratterizzare cellulare non solo basata su parametri fenotipici o genotipici, ma mirata a studiarne il comportamento funzionale.

Bibliografia essenziale

1. Merlo S, Carpignano F, Silva G, Aredia F, Scovassi AI, Mazzini G, Surdo S, Barillaro G. Label-free optical detection of cells grown in 3D silicon microstructures, *Lab Chip*. 2013; 13: 3284-3292.
2. Carpignano F, Silva G, Surdo S, Leva V, Montecucco A, Aredia F, Scovassi AI, Merlo S, Barillaro G, Mazzini G. A new cell-selective three-dimensional microincubator based on silicon photonic crystals, *PLoS One*. 2012; 7: e48556.
3. Merlo S, Barillaro G, Carpignano F, Silva G, Surdo S, Strambini LM, Giorgetti S, Nichino D, Relini A, Mazzini G, Stoppini M, Bellotti V. Fibrillogenesis of human $\beta 2$ -microglobulin in three-dimensional silicon microstructures, *J Biophotonics*. 2012; 5: 785-92.
4. Danova M, Torchio M, Mazzini G. Isolation of rare circulating tumor cells in cancer patients: technical aspects and clinical implications, *Expert Rev Mol Diagn*. 2011; 11: 473-485.

Circulating Myeloma Plasma Cells

Lucia Nobili, Antonino Neri

Department of Clinical Sciences and Community Health, University of Milan and Hematology Unit, Fondazione IRCCS Cà Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, 20122, Italy

Multiple myeloma (MM) is a fatal malignancy of antibody-secreting bone marrow (BM) plasma cells (PCs) that accounts for 10% of all haematological malignancies with an incidence in Western countries of about 3-5 per 100.000. MM is characterized by a wide clinical spectrum ranging from the presumed pre-malignant condition called monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), to smoldering MM, truly overt and symptomatic MM, and extra-medullary myeloma/plasma cell leukaemia (PCL). Despite the remarkable improvement in treatment and patient care, MM remains an incurable disease.

MM is characterized by a profound genomic instability that involves both ploidy and structural rearrangements (1). Nearly half of MM tumors are defined as hyperdiploid associated with trisomies of odd chromosomes (including 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 and 21) and a low prevalence of chromosomal translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus (*IGH*) on chromosome 14q32. The remaining tumors are referred as nonhyperdiploid and are frequently associated with the constitutive activation of *CCND1*(11q13), *CCND3*(6p21), *MAF*(16q23), *MAFB*(20q11), or *FGFR3/MMSET*(4p16.3) genes as a result of *IGH* translocations (2-5). The mechanisms underlying this dichotomic pattern have not been elucidated but hyperdiploid patients have a generally better prognosis. With respect to the conventional and high dose therapy, the t(4;14) and the t(14;16) are associated with a poor prognosis. In addition, gains or losses of specific genomic regions including 13q, 17p13, 1p, 16q, 14q losses and 1q gains are adversely linked to prognosis in MM (6). Furthermore, it has been demonstrated by means of gene expression profiling (GEP) that the deregulation of one of the three cyclin D genes, in particular cyclin D1 and 2, is associated with virtually all of the MM patients leading to the proposal of a TC molecular classification based on the translocation partner (T) and cyclin D (C) expression (7, 8). Furthermore, a study based on unsupervised hierarchical cluster analyses of GEP data of a large survey of patients has proposed a prognostically potentially relevant molecular classification of MM based on seven groups some of them consistent with the presence of specific *IGH* translocations, hyperdiploidy or increased expression of proliferation-related genes (9). Overall, GEP studies support the high biological heterogeneity of MM and can provide further insights into the pathophysiology and treatment of myeloma, including response to specific agents.

A striking feature of MM is the predominant localization of malignant PCs in the BM, in close association with stromal cells. Although these cells indeed represent the main neoplastic cell type, several phenotypic and genotypic studies have demonstrated that small numbers of MM cells can also be detected in the peripheral blood (PB) in a high percentage of patients with plasma cell dyscrasia. The presence of circulating PCs can have a value in predicting risk of progression of the disease. Moreover, it can be assumed that these circulating cells represent the tumour-spreading component of the disease. This implicates that myeloma PCs have the capacity to (re)circulate and home to new BM niches. One question that has not been answered is whether these cells have stem cell-like features.

Tumor-initiating myeloma cells

Improvement of long-term outcomes in MM critically relies on a better understanding of the tumor-initiating cell in this disease. As in other malignancies, the cancer stem cell concept incriminates drug-resistant myeloma stem cells with tumor-initiating, self-renewing properties to feed the malignant plasma cell (M-PC) compartment in disease relapse and progression (10, 11). However, it remains a matter of debate if the clonogenic population resides within the pool of terminally differentiated post-switch M-PCs or within a less differentiated (surface) immunoglobulin (Ig)-positive pre-switch B-cell compartment. The latter hypothesis has been fueled by the description of so-called clonotypic pre-switch (IgM⁺) B cells postulated to express the same patient-individual variable region Ig rearrangement as the M-PC (12-16). This finding even provided the rationale for therapeutic targeting of this postulated CD20⁺ population with the monoclonal antibody rituximab (17, 18). However, inconsistent results of xenotransplantation experiments (19-23), data on intraclonal evolution at the PC level (24-30), the analysis of class switch junctions (31), and the lack of benefit from CD20-directed targeted therapy (17, 18) challenged the hypothesis that pre-switch clonotypic B cells act as tumor-initiating and propagating cells in myeloma. Interestingly, in a recent study an allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction (ASO-PCR) technique specifically designed for the detection of IGHVDJ monoclonal gene sequences unique to the tumor cells of individual patients, was used in multiple highly-purified fractions of PB B-lymphocytes from patients with MM and MGUS (32). The study failed to demonstrate the presence of circulating B cells clonally related to the tumor bone marrow PCs; the only exception were the myeloma PCs detected and purified from the PB of four of the myeloma patients. Moreover, the presence of pre-switch clonotypic B cells in the PB of myeloma patients was also disproved by a next-generation sequencing study showing the presence of circulating M-PCs with evidence for clonal evolution in active disease (33). These findings suggest that circulating M-PCs may contribute to spreading the disease. It seems evident that methodological aspects most likely account for the discrepancy between these two studies and prior reports (12-16), many of which were primarily based on B-cell subpopulations isolated by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Because M-PCs can circulate in the PB, such B-cell populations

may easily have been contaminated by circulating M-PCs, which may then have provided the clonotypic sequences attributed to B cells.

Prognostic value of circulating myeloma PCs

The presence of circulating M-PCs has been recently demonstrated in the vast majority (96%) of MM patients employing a deep-sequencing approach (34). This evidence has two main important implications. First of all, circulating M-PCs are a powerful prognostic marker in MM. Several studies have shown the prognostic relevance of circulating PCs at the time of diagnosis in the PB of patients with MM (65-38). Interestingly, the presence of circulating M-PCs has been associated with an increased risk of malignant transformation to symptomatic MM in both MGUS (39) and smoldering MM (40), as well as with an inferior survival among symptomatic newly diagnosed (36) and relapse/refractory MM (41). Secondly, the assessment of residual tumor cells persisting after therapy, or minimal residual disease (MRD), may play a role in the MM treatment paradigm as in many other hematologic malignancies. Numerous reports have shown that molecular MRD status is predictive of progression-free and overall survival in MM patients (42-44). These studies have generally been limited to the assessment of BM involvement, due in part to the sensitivity limitations of traditional MRD analysis techniques, such as traditional flow-cytometric methods. The recent development of a sequencing-based MRD assay (45-47) and its employment to identify myeloma cells in BM and PB samples, based on their unique Ig gene rearrangements (34), highlight the promise of a blood-based sequencing MRD assay that can be used to measure MM disease burden at different time points and various disease stages.

Characteristics of circulating myeloma PCs

With regard to the biological features of circulating M-PCs, these remain largely unexplored. Recently, a detailed characterization of myeloma circulating tumor cells vs paired BM clonal PCs from MM patients showed that they represent a unique subpopulation of clonal BM PCs (48). This subset is characterized by a lower expression of CD138 as well as integrin and adhesion molecules and, consequently, a lower dependence on BM stromal cell niches, that would confer them an enhanced capacity to egress into PB. Moreover, in a context where clonogenic cells are relatively rare among all myeloma tumor cells, circulating M-PCs seems to be enriched in mostly quiescent cells associated with higher clonogenic potential vs paired BM clonal PCs when cocultured with BM stromal cells. These results would support recent observations showing the existence of a more immature fraction of drug-resistant, relatively quiescent, and clonogenic clonal PCs lacking CD138 (49-51), which would be preferentially located in extramedullary sites (49). A further key point of the study is that Fluorescence In Situ Hybridization analysis on highly purified FACS-sorted circulating M-PCs unraveled different cytogenetic profiles vs paired BM clonal PCs. Most interestingly, despite a common cytogenetic background, BM clonal PCs showed systematic

cally ≥ 1 cytogenetic alteration not detected in circulating M-PCs suggesting that these cells may represent an ancestral clone from a cytogenetic point of view. Finally, when investigating the functional characteristics of circulating M-PCs, the Authors observed a marked fluctuation of their daily absolute number, peaking between 4:00 AM and 12:00 PM, with a nadir between 4:00 PM and 12:00 AM. These results, although preliminary due to low patient number, suggest that, similarly to CD34⁺ hematopoietic stem cells, circulating M-PCs may egress to PB during the patients' resting period to colonize/metastasize other sites in the BM or at extramedullary tissues (52). According to this model, malignant PCs would leave the BM, recirculate into PB, and home again into the BM at a different location, in a kind of "metastatic"/dissemination process that spreads the disease over the whole BM (53, 54).

Bibliografia

1. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res.* 2004; 64: 1546-1558.
2. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, et al. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood.* 2005; 106: 296-303.
3. Chesi M, Nardini E, Lim RS, et al. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood.* 1998; 92: 3025-3034.
4. Richelda R, Ronchetti D, Baldini, et al. A novel chromosomal translocation t(4; 14)(p16.3; q32) in multiple myeloma involves the fibroblast growth-factor receptor 3 gene. *Blood.* 1997; 90: 4062-4070.
5. Ronchetti D, Finelli P, Richelda R, et al. Molecular analysis of 11q13 breakpoints in multiple myeloma. *Blood.* 1999; 93: 1330-1337.
6. Agnelli L, Biccato S, Mattioli M, et al. Molecular classification of multiple myeloma: a distinct transcriptional profile characterizes patients expressing CCND1 and negative for 14q32 translocations. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 7296-7306.
7. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood.* 2004; 104: 607-618.
8. Mattioli M, Agnelli L, Fabris S, et al. Gene expression profiling of plasma cell dyscrasias reveals molecular patterns associated with distinct IGH translocations in multiple myeloma. *Oncogene.* 2005; 24: 2461-2473.
9. Zhan F, Huang Y, Colla S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood.* 2006; 108: 2020-2028.
10. Hosen N. Multiple myeloma-initiating cells. *Int. J. Hematol.* 2013; 97: 306-312.
11. Huff CA, Matsui W. Multiple myeloma cancer stem cells. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 2895-2900.
12. Billadeau D, Van NB, Kimlinger T, et al. Clonal circulating cells are common in plasma cell proliferative disorders: a comparison of monoclonal gammopathy of undetermined significance, smoldering multiple myeloma, and active myeloma. *Blood.* 1996; 88: 289-296.

13. Chen BJ, Epstein J. Circulating clonal lymphocytes in myeloma constitute a minor subpopulation of B cells. *Blood*. 1996; 87: 1972-1976.
14. Pilarski LM, Masellis-Smith A, Szczepek A, Mant MJ, Belch AR. Circulating clonotypic B cells in the biology of multiple myeloma: speculations on the origin of myeloma. *Leuk.Lymphoma*. 1996; 22: 375-383.
15. Szczepek AJ, Seeberger K, Wizniak J, et al. A high frequency of circulating B cells share clonotypic Ig heavy-chain VDJ rearrangements with autologous bone marrow plasma cells in multiple myeloma, as measured by single-cell and in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood*. 1998; 92: 2844-2855.
16. Taylor BJ, Pittman JA, Seeberger K, et al. Intraclonal homogeneity of clonotypic immunoglobulin M and diversity of nonclinical post-switch isotypes in multiple myeloma: insights into the evolution of the myeloma clone. *Clin. Cancer Res*. 2002; 8: 502-513.
17. Musto P, Carella AM, Jr., Greco MM, et al. Short progression-free survival in myeloma patients receiving rituximab as maintenance therapy after autologous transplantation. *Br.J.Haematol*. 2003; 123: 746-747.
18. Zojer N, Kirchbacher K, Vesely M, Hubl W, Ludwig H. Rituximab treatment provides no clinical benefit in patients with pretreated advanced multiple myeloma. *Leuk.Lymphoma*. 2006; 47: 1103-1109.
19. Matsui W, Huff CA, Wang Q, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*. 2004; 103: 2332-2336.
20. Pilarski LM, Hipperson G, Seeberger K et al. Myeloma progenitors in the blood of patients with aggressive or minimal disease: engraftment and self-renewal of primary human myeloma in the bone marrow of NOD SCID mice. *Blood*. 2000; 95: 1056-1065.
21. Pilarski LM, Seeberger K, Coupland RW, et al. Leukemic B cells clonally identical to myeloma plasma cells are myelomagenic in NOD/SCID mice. *Exp.Hematol*. 2002; 30: 221-228.
22. Yaccoby S, Epstein J. The proliferative potential of myeloma plasma cells manifest in the SCID-hu host. *Blood*. 1999; 94: 3576-3582.
23. Yata K, Yaccoby S. The SCID-rab model: a novel in vivo system for primary human myeloma demonstrating growth of CD138-expressing malignant cells. *Leukemia* 2004;18:1891-1897.
24. McSweeney PA, Wells DA, Shults KE, et al. Tumor-specific aneuploidy not detected in CD19+ B-lymphoid cells from myeloma patients in a multidimensional flow cytometric analysis. *Blood*. 1996; 88: 622-632.
25. Pfeifer S, Perez-Andres M, Ludwig H, Sahota SS, Zojer N. Evaluating the clonal hierarchy in light-chain multiple myeloma: implications against the myeloma stem cell hypothesis. *Leukemia*. 2011; 25: 1213-1216.
26. Pilarski LM, Giannakopoulos NV, Szczepek AJ, et al. In multiple myeloma, circulating hyperdiploid B cells have clonotypic immunoglobulin heavy chain rearrangements and may mediate spread of disease. *Clin.Cancer Res*. 2000; 6: 585-596.
27. Rasmussen T, Kuehl M, Lodahl M, Johnsen HE, Dahl IM. Possible roles for

- activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood*. 2005; 105: 317-323.
28. Rasmussen T, Haaber J, Dahl IM et al. Identification of translocation products but not K-RAS mutations in memory B cells from patients with multiple myeloma. *Haematologica*. 2010; 95: 1730-1737.
 29. Santonocito AM, Consoli U, Bagnato S, et al. Flow cytometric detection of aneuploid CD38(++) plasmacells and CD19(+) B-lymphocytes in bone marrow, peripheral blood and PBSC harvest in multiple myeloma patients. *Leuk. Res*. 2004; 28: 469-477.
 30. Zojer N, Schuster-Kolbe J, Assmann I, et al. Chromosomal aberrations are shared by malignant plasma cells and a small fraction of circulating CD19+ cells in patients with myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br. J. Haematol*. 2002; 117: 852-859.
 31. Taylor BJ, Kriangkum J, Pittman JA, et al. Analysis of clonotypic switch junctions reveals multiple myeloma originates from a single class switch event with ongoing mutation in the isotype-switched progeny. *Blood*. 2008; 112: 1894-1903.
 32. Thiago LS, Perez-Andres M, Balanzategui A, et al. Circulating clonotypic B cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica*. 2014; 99: 155-162.
 33. Thiele B, Kloster M, Alawi M et al. Next-generation sequencing of peripheral B-lineage cells pinpoints the circulating clonotypic cell pool in multiple myeloma. *Blood*. 2014; 123: 3618-3621.
 34. Vij R, Mazumder A, Klinger M, et al. Deep sequencing reveals myeloma cells in peripheral blood in majority of multiple myeloma patients. *Clin.Lymphoma Myeloma*. *Leuk*. 2014; 14: 131-139.
 35. Dingli D, Nowakowski GS, Dispenzieri A, et al. Flow cytometric detection of circulating myeloma cells before transplantation in patients with multiple myeloma: a simple risk stratification system. *Blood*. 2006; 107: 3384-3388.
 36. Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, et al. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 2005; 106: 2276-2279.
 37. Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, et al. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br. J. Haematol*. 1997; 97: 46-55.
 38. Witzig TE, Gertz MA, Lust JA, et al. Peripheral blood monoclonal plasma cells as a predictor of survival in patients with multiple myeloma. *Blood*. 1996; 88: 1780-1787.
 39. Kumar S, Rajkumar SV, Kyle RA, et al. Prognostic value of circulating plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J.Clin. Oncol*. 2005; 23: 5668-5674.
 40. Bianchi G, Kyle RA, Larson DR, et al. High levels of peripheral blood circulating plasma cells as a specific risk factor for progression of smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013; 27: 680-685.

41. Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, Zvirblis T, Griskevicius L. Circulating plasma cells predict the outcome of relapsed or refractory multiple myeloma. *Leuk.Lymphoma*. 2012; 53: 641-647.
42. Martinez-Sanchez P, Montejano L, Sarasquete ME, et al. Evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma patients by fluorescent-polymerase chain reaction: the prognostic impact of achieving molecular response. *Br.J.Haematol*. 2008; 142: 766-774.
43. Paiva B, Vidriales MB, Cervero J, et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008; 112: 4017-4023.
44. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005; 90: 1365-1372.
45. Faham M, Zheng J, Moorhead M, et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012; 120: 5173-5180.
46. Gawad C, Pepin F, Carlton VE, et al. Massive evolution of the immunoglobulin heavy chain locus in children with B precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012; 120:4407-4417.
47. Logan AC, Zhang B, Narasimhan B, et al. Minimal residual disease quantification using consensus primers and high-throughput IGH sequencing predicts post-transplant relapse in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2013; 27: 1659-1665.
48. Paiva B, Paino T, Sayagues JM, et al. Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. *Blood*. 2013; 122: 3591-3598.
49. Chaidos A, Barnes CP, Cowan G, et al. Clinical drug resistance linked to interconvertible phenotypic and functional states of tumor-propagating cells in multiple myeloma. *Blood*. 2013; 121: 318-328.
50. Hosen N, Matsuoka Y, Kishida S, et al. CD138-negative clonogenic cells are plasma cells but not B cells in some multiple myeloma patients. *Leukemia*. 2012; 26: 2135-2141.
51. Kawano Y, Fujiwara S, Wada N, et al. Multiple myeloma cells expressing low levels of CD138 have an immature phenotype and reduced sensitivity to lenalidomide. *Int. J. Oncol*. 2012; 41: 876-884.
52. Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*. 2008; 452: 442-447.
53. Ghobrial IM. Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood*. 2012; 120: 20-30.
54. Paiva B, Perez-Andres M, Vidriales MB, et al. Competition between clonal plasma cells and normal cells for potentially overlapping bone marrow niches is associated with a progressively altered cellular distribution in MGUS vs myeloma. *Leukemia*. 2011; 25: 697-706.

Immunoterapia e Cellule Staminali del Cancro: evidenze precliniche e prospettive cliniche

Massimo Aglietta

Dipartimento di Oncologia, Università di Torino, Istituto per la Ricerca e la Cura del Cancro, Candiolo (TO)

Introduzione e cenni storici

Crescenti evidenze sperimentali e cliniche supportano l'esistenza di un sottogruppo di cellule tumorali con caratteristiche di presunta staminalità, responsabili dell'"iniziazione" del processo neoplastico, invasività, metastatizzazione e resistenza alle terapie. Tale sottogruppo è denominato "cellule staminali del cancro" (CSC). Il concetto e l'individuazione delle CSC possiede una grande rilevanza clinica, con implicazioni in ambito diagnostico e terapeutico, essendo le CSC ritenute alla base delle recidive di malattia e fenomeni di chemoresistenza (1). In realtà il concetto che i tumori potessero derivare da cellule di tipo "embrionale" non è nuovo e le prime ipotesi furono formulate circa 150 anni fa, teorizzando l'esistenza di "cellule dormienti" in grado di sostenere lo sviluppo dei tumori (2-4). La descrizione formale e sperimentale del paradigma delle CSC si deve al gruppo di John Dick che dimostrò l'esistenza di CSC leucemiche con capacità di "selfrenew", proliferazione e differenziazione (5, 6).

Nell'ambito dei tumori solidi la prima evidenza di CSC fu riportata da Al-Hajj nel tumore mammario (7, 8). Si sono poi susseguite numerose dimostrazioni sperimentali in vari ambiti tra i quali tumore del polmone (9, 10), colon (11, 12), prostata (13), ovaio (14-16), sistema nervoso (17, 18), melanoma (19-22), Capo collo (23), pancreas (24).

Caratteristiche biologiche e criteri di identificazione

Le caratteristiche biologiche considerate proprie delle CSC comprendono:

- 1) la capacità di "automantenimento";
- 2) tumorigenicità, generando tumori anche partendo da minime quantità;
- 3) capacità di differenziazione;
- 4) espressione di marcatori di staminalità e relativa quiescenza proliferativa (25-27).

Le CSC sembrano intrattenere stretti rapporti fisici e funzionali con strutture microambientali in diversi istotipi tumorali, costituendo le formazioni note come “nicchie” (28, 29). Funzionalmente le nicchie sembrano svolgere un ruolo determinante nell’equilibrio tra differenziazione e automantenimento delle CSC.

La possibilità di isolare le CSC è ancora oggetto di ricerca, anche se numerose evidenze sperimentali ne supportano la fattibilità attraverso diversi approcci quali l’utilizzo di marcatori specifici di membrana (10, 13) (30, 31), l’individuazione citofluorimetrica di una “side population” (32, 33), o ancora la capacità di crescere come sferoidi (34).

Dal punto di vista funzionale potrebbero essere individuate sfruttando la chemoresistenza, multipotenza, tumorigenicità, espressione di geni di staminalità ed attività dell’enzima LDH (35-38).

Varie molecole di membrana sono state proposte come marcatori di CSC in vari istotipi tumorali anche se nessuno può essere considerato come definitivo (CD20, CD24, CD34, CD44, CD90, CD117, CD133) (39).

Le caratteristiche di relativa chemoresistenza delle CSC sembrano legate all’espressione di specifici trasportatori (ABC) o elevata capacità di riparazione dei danni al DNA (40-42). Come detto sopra, queste caratteristiche sono alla base di importanti implicazioni cliniche come le recidive tumorali, chemoresistenza e persistenza di malattia minima residua.

Gli sforzi della ricerca sono attualmente indirizzati a visualizzare le CSC in coltura o nell’ambito di modelli in vivo, con l’obiettivo di chiarirne le caratteristiche funzionali ed esplorare strategie terapeutiche in grado di eliminarle.

Immunoterapia e CSC

La chemioterapia convenzionale ha ormai raggiunto un plateau, spesso insoddisfacente, nel trattamento di molti tumori solidi sottolineando l’alta necessità di nuove strategie idealmente in grado di annientare la popolazione di CSC responsabile delle recidive e resistenze.

L’immunoterapia è tra gli approcci più promettenti, supportata da importanti e recenti risultati in ambito clinico. L’attività immunoterapica contro le CSC è attualmente oggetto di ricerca, gli effettori immunitari potrebbero superare importanti meccanismi di difesa e chemoresistenza messi in atto dalle CSC come la relativa quiescenza o pompe di efflusso.

Multipli approcci immunoterapici sono ipotizzabili, diretti contro precisi antigeni presentati dal complesso MHC o basati su effettori MHC-indipendenti. Recenti evidenze precliniche supportano la potenziale attività contro CSC di approcci basati su cellule natural Killer (NK), linfociti T di tipo $\gamma\delta$ o ancora cellule killer indotte da citochine (CIK). Si tratta di modelli preclinici, gravati da limitazioni sperimentali ma costituiscono comunque importante prova concettuale per il disegno di studi clinici dedicati. Elementi di ricerca centrali sono l’espressione da parte delle CSC di antigeni (Ag) MHC ristretti o molecole bersaglio MHC indipendenti riconosciute comunque dal sistema immunitario.

In questo corso ci focalizzeremo su approcci di immunoterapia contro CSC in

modelli di tumori solidi. Discuteremo gli iniziali risultati preclinici e relative prospettive cliniche, seguendo una divisione schematica tra approcci MHC-ristretti ed MHC-indipendenti.

Immunoterapia MHC-ristretta

Negli ultimi anni pochi ma importanti lavori preclinici hanno esplorato la possibilità di elicitare risposte adattative contro CSC in tumori solidi attraverso vaccinazione con cellule dendritiche (DC). Domande centrali affrontate dai ricercatori si sono concentrate sulla presenza di molecole MHC funzionali ed antigeni tumorali (TAA) sulla membrana delle CSC. La maggior parte dei dati deriva da modelli di carcinoma prostatico e glioblastoma maligno, fornendo importanti prove concettuali e spunti per speculazioni in prospettiva clinica.

Il modello del carcinoma prostatico

L'espressione di molecole MHC di classe I e II, congiuntamente a TAA, è stata dimostrata su CSC in modelli transgenici di carcinoma prostatico murino (TRAMP), dove gli animali sviluppano spontaneamente tumori prostatici molto simili strutturalmente al tumore nell'uomo (43). Nell'ambito di questo modello, CSC sono state efficacemente eliminate in vitro ed in vivo da linfociti citotossici (CTLs) specifici e regressione tumorale in vivo è stata ottenuta tramite vaccinazione con DC caricate con CSC. Lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato anche la presenza sulle CSC di molecole bersaglio riconosciute da cellule NK e LAK (Lymphokine-activated killer), con conseguente attività da parte di elementi dell'immunità innata (44). Nell'ambito dello stesso modello TRAMP, è stata dimostrata la possibilità di indurre una risposta immunitaria protettiva attraverso vaccinazione con DC caricate con DNA codificante per il "prostate stem cell antigen" (PSCA) (45, 46). La risposta immunitaria è stata associata a documentata infiltrazione da parte di linfociti CD4 e CD8, unitamente ad espressione di molecole MHC sulle cellule tumorali. PSCA è considerato un buon marcatore e potenziale bersaglio delle CSC prostatiche, implicato funzionalmente nei processi di progressione e metastatizzazione e descritto anche in altri istotipi tumorali (46, 47). Questi lavori preclinici costituiscono importante prova dell'immunogenicità di CSC, sfruttabile per indirizzare risposte immunitarie con CTLs specifici.

La descritta suscettibilità delle CSC alla risposta immunitaria di tipo adattativo ed innata è in apparente contrasto con la storia naturale di questa neoplasia, dove il sistema immunitario risulta per lo più incapace di arrestare spontaneamente la progressione. Questo apparente paradosso, comune ad altri modelli tumorali, è indicativo dell'esistenza nei pazienti oncologici di meccanismi immunosoppressivi che consentono al tumore di eludere la sorveglianza e risposta immunitaria in grado di eliminare le CSC.

Il modello del glioblastoma

Modelli sperimentali preclinici hanno dimostrato la possibilità di colpire efficacemente CSC di glioma maligno attraverso induzione di risposta immunitaria

adattativa. Neurosfere, arricchite in CSC, sono state utilizzate per caricare DC ottenendo importanti risposte curative vaccinando gli animali con conseguente infiltrazione di linfociti CD4 e CD8 (48). È interessante notare come la coltura ex vivo delle neurosfere porti ad una aumentata espressione delle molecole MHC di classe II e costimolatorie (CD80: CD86) sulle CSC.

Queste osservazioni sono importanti in prospettiva clinica, essendo la carenza di appropriata co-stimolazione una delle principali cause di fallimento di precedenti approcci di tipo vaccinale. In linea con questi dati, altri gruppi di ricerca hanno confermato indipendentemente come CSC di gliomi aggressivi fossero in grado di processare ed esprimere TAA con conseguente induzione di efficaci risposte da parte di CTLs in vitro ed in vivo (49). I dati suddetti sono tutti generati in modelli murini; recenti evidenze supportano l'estensione di questi concetti anche a CSC di glioblastomi umani, fonti di TAA capaci di stimolare risposte mediate da CTLs a seguito di vaccinazione con DC (50). Sulla scorta di questi risultati preclinici è stato condotto un primo studio clinico. Un ristretto numero di pazienti ha ricevuto vaccinazione con DC caricate con RNA estratto da neurosfere autologhe (51), confermando la fattibilità, sicurezza ed iniziale attività di questo approccio. Nonostante non conclusivi, questi primi dati clinici gettano le basi per successivi studi randomizzati e confermano la fattibilità ed il razionale di colpire le CSC nei pazienti affetti da tumori solidi. Oltre ai suddetti modelli di carcinoma prostatico e gliomi, dati iniziali suggeriscono l'efficacia di un'immunoterapia adattativa anche contro altri istotipi tumorali. Dati preclinici molto interessanti sono stati presentati nell'ambito di melanomi e carcinomi squamosi, ottenendo una risposta immunitaria protettiva, sia di tipo cellulare che umorale, a seguito vaccinazione con DC caricate con lisati di CSC (52).

È importante sottolineare come non ci sia un totale consenso al momento tra i ricercatori e dati contrastanti esistano a riguardo, con lavori sperimentali in favore di una bassa immunogenicità delle CSC ed addirittura una loro attività immunosoppressoria. In modelli di glioblastoma e carcinoma del colon le CSC sembravano avere ridotta capacità di presentazione antigenica e secrezione di citochine immunosoppressore (53, 54). In questi ambiti è interessante sottolineare come ci sia evidenza che la ridotta immunogenicità delle CSC di glioblastoma possa essere invertita dal trattamento con agenti demetilanti o esposizione ad IFN- γ , aprendo il campo all'esplorazione di strategie di sinergismo. Da questi pochi esempi si può evincere come la ricerca abbia definito un ruolo centrale delle CSC nei processi tumorali umani e la potenzialità dell'immunoterapia come approccio terapeutico. Al tempo stesso è evidente l'assenza di dati conclusivi, con dati spesso contrastanti e la necessità di esplorare modelli sperimentali adeguati.

Strategie di immunoterapia MHC indipendente

Cellule Natural Killer

Il setting oncologico maggiormente esplorato è quello del carcinoma del colon (CRC), con evidenze sperimentali di immunoterapia con NK o linfociti $\gamma\delta$ attivi contro CSC.

Le cellule NK rappresentano circa il 10% dei linfociti circolanti e costituiscono i principali effettori della cosiddetta immunità innata, coinvolta nella prima linea difensiva contro patogeni ed immunosorveglianza nei confronti dei tumori (55). L'attività antitumorale delle cellule NK è mediata da una serie di recettori attivatori (es. NKG2D, NKp30, NKp44, DNAM-1, FAS-L), così come dal recettore inibitorio KIR (killer immunoglobulin-like receptor) attivato dal meccanismo del "missing self" (56-58).

Evidenze sperimentali hanno riportato come CSC di CRC possano essere uccise da cellule NK sulla base di una preferenziale espressione di ligandi per recettori di citotossicità naturale (NKp30; NKp44) ed a seguito della mancata espressione di molecole MHC rispetto a cellule tumorali maggiormente differenziate (59).

Questi riscontri offrono spunto per speculazioni circa l'impatto prognostico di infiltrati di cellule NK a livello di CRC (60). Oltre al CRC, cellule NK si sono dimostrate attive contro CSC in modelli di glioblastoma e melanoma, pur richiedendo in questo caso preventiva attivazione citochinica con IL2 o IL15 (61, 62).

Tutte queste evidenze sperimentali confermano il ruolo delle cellule NK come potenziale immunoterapia contro le CSC e rilanciano la necessità di studi dedicati a possibili strategie di sinergismo con gli attuali approcci chemioterapici e volti a valutare il ruolo del "KIR Mismatch" recentemente valorizzato nell'ambito delle neoplasie ematologiche.

Linfociti T $\gamma\delta$

Recentemente sono stati presentati interessanti dati preclinici a supporto dell'attività preclinica di linfociti $\gamma\delta$ contro CSC in modelli di CRC (63, 64). In particolare, il sottogruppo di linfociti $\gamma\delta$ esplorato in questi studi si riferisce a quello V γ 9V δ 2. Questi linfociti si riscontrano prevalentemente a livello del sangue periferico ed organi linfoidi secondari e riconoscono antigeni non peptidici in maniera MHC indipendente.

La loro attività antitumorale si può esplicitare direttamente attraverso interazioni di molecole recettoriali quali Fas/FasL, TNF/TNF-R, TRAIL/TRAIL-R (65), o indirettamente agendo su altri effettori del sistema immunitario tramite secrezione di citochine tipo Th1 e Th2 (66-68).

Nei modelli sperimentali di CRC esplorati, le CSC risultavano in realtà spontaneamente resistenti all'attività dei linfociti V γ 9V δ 2, divenendo però sensibili a seguito di trattamento con basse dosi di chemioterapia convenzionale (5FU e Doxorubicina) o acido zoledronico (98, 99). L'effetto della chemioterapia sembra legato all'induzione di ligandi riconosciuti dal recettore NKG2D sui linfociti $\gamma\delta$. L'effetto pro immunoterapia dell'acido zoledronico non è stato ancora del tutto chiarito ma sembra indurre l'espressione di fosfo-antigeni a livello tumorale e delle CSC, riconosciuti dal TCR dei linfociti $\gamma\delta$, operanti poi un'uccisione mediata da granzimi e perforine. Queste osservazioni sperimentali, sebbene iniziali, sono scientificamente stimolanti e dotate di rilevante prospettiva clinica. Da una parte evidenziano il potenziale ruolo di linfociti $\gamma\delta$ contro CSC, dall'altra sottolineano la possibilità di integrazione con altri farmaci e strategie terapeutiche convenzionali. È da notare come le dosi di farmaci utilizzate a scopo "sensibilizzante" per

l'immunoterapia possano essere sensibilmente più basse rispetto a quelle comunemente utilizzate nella pratica clinica, con evidenti vantaggi sul profilo di tossicità e possibilità di traslazione in studi clinici.

Cellule Killer Indotte da Citochine

Negli ultimi anni risultati promettenti nel campo dell'immunoterapia dei tumori solidi sono stati riportati con l'utilizzo di effettori MHC-indipendenti denominati cellule killer indotte da citochine (CIK) (108). Le cellule CIK sono linfociti T espansi ex vivo con fenotipo T-NK (109-110). Il meccanismo di uccisione tumorale è MHC-indipendente, principalmente basato sull'interazione del recettore NKG2D con ligandi tipo "molecole indotte da stress" sulle cellule tumorali (es. MIC A/B; ULBPs) (69-73).

Il nostro gruppo ha recentemente dimostrato l'attività preclinica delle cellule CIK contro sarcoma e melanoma autologhi, incluse le presunte CSC (74, 75). L'aspetto importante di questi lavori preclinici consiste nella natura autologa del modello capace di rappresentare le intrinseche variabili biologiche di ogni tumore. I lavori hanno dimostrato come le CSC fossero in grado di esprimere i ligandi riconosciuti dal recettore NKG2D delle cellule CIK. L'attività contro le CSC è stata confermata in vivo in esperimenti preliminari utilizzando modelli di "tumorgraft" in topi immunocompromessi.

Questi dati, sebbene iniziali, forniscono importante prova concettuale ed inquadrano le cellule CIK come valida opzione nel panorama dell'immunoterapia dei tumori solidi, supportando prossime esplorazioni in studi clinici.

Risposta immunitaria e cellule tumorali circolanti (CTC) Il rapporto tra CTC e risposta immunitaria è stato sinora solo marginalmente indagato, ci limiteremo qui ad operare delle speculazioni sulla base delle evidenze esistenti e similarità con quanto detto a riguardo delle CSC. Le CTC nel torrente circolatorio sono esposte ad intensa pressione selettiva negativa operata dal sistema immunitario in forma di immunosorveglianza. È ipotizzabile che le poche CTC individuabili in periferia siano riuscite a mettere in atto una qualche forma di "evasione immunitaria", la cui comprensione e potenziale reversione ha una grande valenza di ricerca e prospettiva clinica. Le CTC presentano caratteristiche di transizione epiteliomesenchimale (EMT) e comuni con le CSC. Riportiamo di seguito alcune evidenze sperimentali a sostegno del concetto di CTC capaci di sfuggire al sistema immunitario. In pazienti con carcinoma mammario, positivi per CTC, è stata descritta un'aumentata espressione di CD95, responsabile di aumentata apoptosi ed inattivazione in seguito a legame con CD95L espresso dalle cellule tumorali (76). Sulla stessa linea è stata riportata aumentata espressione di CD47, potenzialmente responsabile di evasione da citolisi linfocitaria (77). Inoltre la capacità antitumorale di cellule NK appare sperimentalmente ridotta in pazienti con CTC aumentate (>7,5 per ml di sangue). L'associazione diretta di piastrine o linfociti attorno alle CTC è stato riportato proteggerle da un attacco diretto da parte delle cellule NK (78). Sempre nel contesto del carcinoma mammario, un'aumentata espressione di TLR su DC e monociti è stata riportata in pazienti positivi per CTC rispetto ad una popolazione negativa. L'iperespressione di tali TLR sembra tradursi in una

spinta verso un microambiente mieloide ad impronta immunosoppressoria, tramite citochine e fattori di crescita, limitante la capacità del sistema immunitario del paziente di eliminare le CTC (79).

Elementi interessanti di ricerca in questa direzione saranno la valutazione su CTC della capacità di presentazione antigenica ed espressione di molecole MHC, nonché l'esistenza di pathways immunomodulatori come quelli rappresentati da PDL1 e PDL2 (80).

Conclusioni

Negli ultimi anni si è assistito ad un crescente entusiasmo nell'ideazione e traslazione clinica di nuovi approcci immunoterapici per il trattamento dei tumori solidi. L'evidenza sperimentale sull'importanza biologica e rilevanza clinica delle CSC ha introdotto il concetto di "bersaglio nobile", da considerare nelle strategie terapeutiche inclusa ovviamente l'immunoterapia. I primi lavori sperimentali supportano l'idea che le CSC siano relativamente chemoresistenti ma possano essere suscettibili a vari tipi di immunoterapia, sia diretta contro antigeni MHC ristretti che di tipo MHC-indipendente. L'esplorazione di aspetti di sicurezza, legati a similarità condivise con le normali cellule staminali, unitamente a potenziali sinergismi con chemioterapia sono le sfide attuali della ricerca verso l'applicazione clinica.

Bibliografia

1. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8: 755-768.
2. Virchow R. Editorial Archiv fuer pathologische Anatomie und Physiologie und fuer klinische Medizin. Volume 81855: 23.
3. Cohnheim J. Congenitales, quergestreiftes Muskelsarkon der Nieren Virchows Arch. Volume 651875: 64.
4. Durante F. Nesso fisio-pathologico tra la struttura dei nei materni e la genesi di alcuni tumori maligni. *Arch Memori ed Osservazioni di Chirurgia Practica*. 1874; 11: 217-726.
5. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994; 367: 645-648.
6. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997; 3: 730-737.
7. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 3983-3988.
8. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*. 2005; 65: 5506-5511.

9. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*. 2005; 121: 823-835.
10. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*. 2008; 15: 504-514.
11. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007; 445: 106-110.
12. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007; 445: 111-115.
13. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005; 65: 10946-10951.
14. Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, Dinulescu DM, Connolly D, Foster R, et al. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 11154-11159.
15. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res*. 2008; 68: 4311-4320.
16. Curley MD, Therrien VA, Cummings CL, Sergeant PA, Koulouris CR, Friel AM, et al. CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. *Stem Cells*. 2009; 27: 2875-2883.
17. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature*. 2006; 444: 761-765.
18. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004; 432: 396-401.
19. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*. 2005; 65: 9328-9337.
20. La Porta C. Cancer stem cells: lessons from melanoma. *Stem Cell Rev*. 2009; 5: 61-65.
21. La Porta CA, Zapperi S. Human breast and melanoma cancer stem cells biomarkers. *Cancer Lett*. 2012.
22. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*. 2008; 456: 593-598.
23. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 973-978.
24. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 2007; 67: 1030-1037.

25. Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008; 135: 1118-1129.
26. Essers MA, Offner S, Blanco-Bose WE, Waibler Z, Kalinke U, Duchosal MA, et al. IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature*. 2009; 458: 904-908.
27. Fuchs E. The tortoise and the hair: slow-cycling cells in the stem cell race. *Cell*. 2009; 137: 811-819.
28. Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*. 2010; 12: 468-476.
29. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*. 2007; 11: 69-82.
30. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*. 2009; 27: 1006-1020.
31. Tirino V, Desiderio V, d' Aquino R, De Francesco F, Pirozzi G, Graziano A, et al. Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. *PLoS One*. 2008; 3: e3469.
32. Pearce DJ, Bonnet D. The combined use of Hoechst efflux ability and aldehyde dehydrogenase activity to identify murine and human hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2007; 35: 1437-1446.
33. Rybak AP, He L, Kapoor A, Cutz JC, Tang D. Characterization of sphere-propagating cells with stemlike properties from DU145 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813: 683-694.
34. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5: 275-284.
35. Suv. ML, Riggi N, Stehle JC, Baumer K, Tercier S, Joseph JM, et al. Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma. *Cancer Res*. 2009; 69: 1776-1781.
36. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science*. 2009; 324: 1670-1673.
37. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J*. 2013; 27: 13-24.
38. Awad O, Yustein JT, Shah P, Gul N, Katuri V, O'Neill A, et al. High ALDH activity identifies chemotherapy-resistant Ewing's sarcoma stem cells that retain sensitivity to EWS-FLI1 inhibition. *PLoS One*. 2010; 5: e13943.
39. La Porta CA. Thoughts about cancer stem cells in solid tumors. *World J Stem Cells*. 2012; 4: 17-20.
40. Mohrin M, Bourke E, Alexander D, Warr MR, Barry-Holson K, Le Beau MM, et al. Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell*. 2010; 7: 174-185.
41. Viale A, De Franco F, Orleth A, Cambiaghi V, Giuliani V, Bossi D, et al. Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells. *Nature*. 2009; 457: 51-56.

42. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 14228-14233.
43. Greenberg NM, DeMayo F, Finegold MJ, Medina D, Tilley WD, Aspinall JO, et al. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 3439-3443.
44. Jachetti E, Mazzoleni S, Grioni M, Ricupito A, Brambillasca C, Generoso L, et al. Prostate cancer stem cells are targets of both innate and adaptive immunity and elicit tumor-specific immune responses. *Oncoimmunology*. 2013; 2: e24520.
45. Garcia-Hernandez MeL, Gray A, Hubby B, Klinger OJ, Kast WM. Prostate stem cell antigen vaccination induces a long-term protective immune response against prostate cancer in the absence of autoimmunity. *Cancer Res*. 2008; 68: 861-869.
46. Gu Z, Thomas G, Yamashiro J, Shintaku IP, Dorey F, Raitano A, et al. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene*. 2000; 19: 1288-1296.
47. Bahrenberg G, Brauers A, Joost HG, Jakse G. Reduced expression of PSCA, a member of the LY-6 family of cell surface antigens, in bladder, esophagus, and stomach tumors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 275: 783-788.
48. Pellegatta S, Poliani PL, Corno D, Menghi F, Ghielmetti F, Suarez-Merino B, et al. Neurospheres enriched in cancer stem-like cells are highly effective in eliciting a dendritic cell-mediated immune response against malignant gliomas. *Cancer Res*. 2006; 66: 10247-10252.
49. Brown CE, Starr R, Martinez C, Aguilar B, D'Apuzzo M, Todorov I, et al. Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells. *Cancer Res*. 2009; 69: 8886-8893.
50. Xu Q, Liu G, Yuan X, Xu M, Wang H, Ji J, et al. Antigen-specific T-cell response from dendritic cell vaccination using cancer stem-like cell-associated antigens. *Stem Cells*. 2009; 27: 1734-1740.
51. Vik-Mo EO, Nyakas M, Mikkelsen BV, Moe MC, Due-Tennesen P, Suso EM, et al. Therapeutic vaccination against autologous cancer stem cells with mRNA-transfected dendritic cells in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2013; 62: 1499-1509.
52. Ning N, Pan Q, Zheng F, Teitz-Tennenbaum S, Egenti M, Yet J, et al. Cancer stem cell vaccination confers significant antitumor immunity. *Cancer Res*. 2012; 72: 1853-1864.
53. Di Tomaso T, Mazzoleni S, Wang E, Sovena G, Clavenna D, Franzin A, et al. Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clin Cancer Res*. 2010; 16: 800-8013.
54. Volont. A, Di Tomaso T, Spinelli M, Todaro M, Sanvito F, Albarello L, et al. Cancer-Initiating Cells from Colorectal Cancer Patients Escape from T Cell-Mediated Immunosurveillance In Vitro through Membrane-Bound IL-4. *J Immunol*. 2014; 192: 523-532.

55. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 2006; 20: 123-137.
56. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008; 112: 461-469.
57. Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J.* 2004; 23: 255-259.
58. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; 9: 495-502.
59. Talerico R, Todaro M, Di Franco S, Maccalli C, Garofalo C, Sottile R, et al. Human NK cells selective targeting of colon cancer-initiating cells: a role for natural cytotoxicity receptors and MHC class I molecules. *J Immunol.* 2013; 190: 2381-2390.
60. Sandel MH, Speetjens FM, Menon AG, Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, et al. Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Mol Immunol.* 2005; 42: 541-546.
61. Castriconi R, Daga A, Dondero A, Zona G, Poliani PL, Melotti A, et al. NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties. *J Immunol.* 2009; 182: 3530-3539.
62. Pietra G, Manzini C, Vitale M, Balsamo M, Ognio E, Boitano M, et al. Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells. *Int Immunol.* 2009; 21: 793-801.
63. Todaro M, D'Asaro M, Caccamo N, Iovino F, Francipane MG, Meraviglia S, et al. Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes. *J Immunol.* 2009; 182: 70287-70296.
64. Todaro M, Orlando V, Cicero G, Caccamo N, Meraviglia S, Stassi G, et al. Chemotherapy sensitizes colon cancer initiating cells to V γ 9V δ 2 T cell-mediated cytotoxicity. *PLoS One.* 2013; 8: e65145.
65. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, et al. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science.* 1994; 264: 267-270.
66. Vermijlen D, Ellis P, Langford C, Klein A, Engel R, Willimann K, et al. Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy. *J Immunol.* 2007; 178: 4304-4314.
67. Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D. Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol.* 2001; 212: 110-107.
68. Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Todaro M, Stassi G, et al. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human V γ 9V δ 2 T cells. *Blood.* 2011; 118: 129-138.
69. Baker J, Verneris MR, Ito M, Shizuru JA, Negrin RS. Expansion of cytolytic CD8(+) natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon gamma production. *Blood.* 2001; 97: 2923-2931.
70. Karimi M, Cao TM, Baker JA, Verneris MR, Soares L, Negrin RS. Silencing human NKG2D, DAP10, and DAP12 reduces cytotoxicity of activated CD8+ T cells and NK cells. *J Immunol.* 2005; 175: 7819-7828.
71. Verneris MR, Karami M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS. Role of NKG2D

- signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood*. 2004; 103: 3065-3072.
72. Franceschetti M, Pievani A, Borleri G, Vago L, Fleischhauer K, Golay J, et al. Cytokine-induced killer cells are terminally differentiated activated CD8 cytotoxic T-EMRA lymphocytes. *Exp Hematol*. 2009; 37: 616-628 e2.
 73. Pievani A, Borleri G, Pende D, Moretta L, Rambaldi A, Golay J, et al. Dual-functional capability of CD3+CD56+ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity. *Blood*. 2011; 118: 3301-3310.
 74. Gammaitoni L, Giraudo L, Leuci V, Todorovic M, Mesiano G, Picciotto F, et al. Effective Activity of Cytokine-Induced Killer Cells against Autologous Metastatic Melanoma Including Cells with Stemness Features. *Clin Cancer Res*. 2013; 19: 4347-4358.
 75. Sangiolo D, Mesiano G, Gammaitoni L, Leuci V, Todorovic M, Giraudo L, et al. Cytokine-induced killer cells eradicate bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer Res*. 2014; 74: 119-129.
 76. Gruber I, Landenberger N, Staebler A, Hahn M, Wallwiener D, Fehm T. Relationship between circulating tumor cells and peripheral T-cells in patients with primary breast cancer. *Anticancer Res*. 2013; 33: 2233-2238.
 77. Steinert G, Schlich S, Niemietz T, Iwata N, Garcia SA, Behrens B, et al. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. *Cancer Res*. 2014; 74: 1694-1704.
 78. Green TL, Cruse JM, Lewis RE, Craft BS. Circulating tumor cells (CTCs) from metastatic breast cancer patients linked to decreased immune function and response to treatment. *Exp Mol Pathol*. 2013; 95: 174-179.
 79. Green TL, Santos MF, Ejaedi AA, Craft BS, Lewis RE, Cruse JM. Toll-like receptor (TLR) expression of immune system cells from metastatic breast cancer patients with circulating tumor cells. *Exp Mol Pathol*. 2014; 97: 44-48.
 80. Noman MZ, Messai Y, Muret J, Hasmim M, Chouaib S. Crosstalk between CTC, Immune System and Hypoxic Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron*. 2014; 7: 153-160.

Standardized flow cytometry data analysis for the diagnosis, classification and monitoring of haematological malignancies

A. Orfao¹, Q. Lécresse¹, C.E. Pedreira², E. Mejstrikova³, V.H.J. van der Velden⁴, S. Böttcher⁵, J. Flores-Montero¹, S. Matarraz¹, A. W. Langerak⁴, J. Almeida¹, A. Trinquand⁶, L. Martín-Martín¹, A.J. van der Sluijs-Gelling⁷, D. Karsch⁵, L. Şçdek⁸, M. Lima⁹, M. Gomes da Silva¹⁰, Elaine S. Costa¹¹, G. Gaipa¹², M. Roussel¹³, L. Campos-Guyotat¹⁴, B. Paiva¹⁵, N. Villamor-Casas¹⁶, R. Fluxa¹⁷, J. Verde¹⁷, G. Grigore¹⁷, J.J.M. van Dongen⁴

¹Department of Medicine and Cytometry Service (NUCLEUS), Cancer Research Center (IBMCC-CSIC/USAL) and Instituto de Investigación Biosanitaria de Salamanca (IBSAL), Universidad de Salamanca y Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ²Federal University of Rio de Janeiro - UFRJ COPPE - Systems and Computing Department; ³Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University (DPH/O), Prague, Czech Republic; ⁴Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam (Erasmus MC), Rotterdam, The Netherlands; ⁵Second Department of Medicine, University Hospital of Schleswig Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany; ⁶Department of Hematology, Hôpital Necker-Enfants-Malades (AP-HP) and UMR CNRS 8147, University of Paris Descartes, Paris, France; ⁷Dutch Childhood Oncology Group DEN HAAG, The Netherlands; ⁸Department of Pediatric Hematology and Oncology, Medical University of Silesia (SUM), Zabrze, Poland; ⁹Department of Hematology, Cytometry Lab, Centro Hospitalar do Porto, Hospital de Santo António, University of Porto, Porto Portugal; ¹⁰Department of Hematology, Portuguese Institute of Oncology (IPOLFG), Lisbon, Portugal; ¹¹Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil; ¹²Centro Ricerca Tettamanti, Clinica Pediatrica Università di Milano, Bicocca - Ospedale San Gerardo, MONZA Italy; ¹³Hematology Laboratory CHU Pontchaillou, Rennes France; ¹⁴Hematology Laboratory CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne France; ¹⁵Clinica Universidad de Navarra - Centro De Investigaciones Medicas Aplicadas (CIMA) Universidad de Navarra, Pamplona Spain; ¹⁶Unitat d'Hematopatologia Hospital Clínic de Barcelona, Escala Barcelona Spain; ¹⁷Cytognos SL, Salamanca, Spain

Correspondence to: Prof. Alberto Orfao, MD, PhD Centro de Investigación del Cáncer Paseo de la Universidad de Coimbra s/n, 37007 Salamanca (Spain)

Background

Diagnosis, classification and monitoring of hematological malignancies have long relied on the combination of different laboratory approaches, particularly on cytology and histopathology, immunophenotyping by flow cytometry and microscopy, and molecular/cytogenetic analyses of tumor cells from distinct types of samples. For this purpose, more sophisticated and variable approaches have been progressively used. Similarly to cytomorphological studies, flow cytometry-based immunophenotyping has been built on the basis of expert-guided interpretation

of immunological staining patterns of groups of individual cells in a sample. At the early phases of flow cytometry immunophenotyping, single antibody indirect immunofluorescence stainings were used.

Based on such stainings, the percentage of cells (grouped by their light scatter features) that expressed a given protein at levels over those of an arbitrary threshold for positivity set on background fluorescence defined by isotype-matched negative controls, was typically evaluated. Afterward, progressive development of informative multicolor stainings facilitated more accurate immunophenotypic assessment of protein expression at the single cell level. Thus, simultaneous evaluation of the staining patterns for two or more markers in one or more cell populations became routine.

This has led to an increased complexity of flow cytometry immunophenotyping. Because of this, expert-based analytical approaches, similar to those widely used for the interpretation of microscopic images in conventional hematopathology, have been progressively implemented in routine flow cytometry immunophenotyping. Through such approaches, 2-dimensional dot plots showing simultaneous staining on a given cell population, for combinations of multiple pairs of markers/parameters, are typically visualized and interpreted by an (experienced) expert. The expert typically defines the patterns of positivity for each marker using subjective semi-quantitative rankings, and at the same time performs direct interpretation of such patterns via virtual comparison against one or more rather subjective references built on the basis of experience and knowledge; for rare cases, informative pictured dot plot graphics from scientific papers and flow cytometry atlas may be used for interpretation of flow cytometry data (e.g. dot plots). The pattern of expression of individual markers once interpreted in such a way, results in the definition of negative versus positive, dim versus bright and homogeneous vs. heterogeneous staining profiles for individual phenotypic markers, using as reference the patterns visualized for the corresponding normal cell counterpart. Alternatively, descriptive statistics about mean/median fluorescence intensity (MFI) values and the coefficient of variation (CV) of expression levels per marker for a given cell population are also recorded and used to determine immunophenotypic profiles.

In recent years, the overall number of stainings that can be simultaneously performed in a single tube (i.e. for the same cells in a sample aliquot) has substantially increased; this has been paralleled by an increase in the number of markers required for efficient immunophenotypic screening, diagnostic classification and monitoring of hematological malignancies.

Together with the ability of digital flow cytometers to interrogate an increasingly high number of cells, this has led to an increased complexity of flow cytometry immunophenotypic data. Such complexity has further contributed to make the interpretation of antigen profiles expressed by multiple cell populations coexisting in a sample difficult to perform in a reproducible and efficient way.

This is particularly true, when the classical expert-guided interpretation approaches of 2-dimensional dot plots, are used.

In order to address the complexity and subjectivity, and therefore also the de-

creased reproducibility of data interpretation, the EuroFlow Consortium has proposed the construction of reference data bases containing representative sets of flow cytometry data files from both controls and patients for the most informative multicolor stainings (e.g. EuroFlow diagnostic screening tubes and antibody panels) in a large set of hematological neoplasms. Such data bases may be used as reference staining patterns against which stainings performed in a specific sample (or groups of samples) from individual patients may be directly compared via innovative software tools and algorithms.

Such approach will bring the experts' knowledge into a highly objective computer-based reference standard, which may be uniformly used across different laboratories, independently of the local experts' knowledge and experience at individual centers.

In this presentation, we will briefly review key features of the data base construction process and the utility of reference flow cytometry data bases for the immunophenotypic characterization of hematological malignancies in diagnostic hemato-oncology; in the last part, we will briefly describe the specific data bases that the EuroFlow Consortium is building to be used with the EuroFlow screening tubes, antibody classification panels and minimal residual disease combinations of antibody markers and antibody panels.

Construction of flow cytometry data bases

Construction of flow cytometry data bases may be currently considered a simple one-step process which may be achieved in a fast way. At the same time, it may in principle be accomplished for any multicolor antibody tube and multicolor antibody panel, whenever standardized sample preparation, staining procedures and antibody reagent panels are used. A pre-requisite for building such robust reference data bases is that enough reference samples had been stained and measured in advance in one or preferentially more flow cytometer instruments, using standardized, reproducible and fully comparable approaches and techniques.

Furthermore, the construction of reference data files also requires that additional specific and strict requirements are met. Thus, the data files to be used need to contain information about combinations of the markers for which the same (or fully comparable) fluorochrome-conjugated antibody reagent clones have been used; alternatively, markers that provide an identical staining profile to reference reagents may also be considered after full validation of the corresponding multicolor antibody stainings in a set of relevant samples. In case of reference data files containing multi-tube antibody panels, it is also required that a backbone of common markers used in every tube is included; such conditions will assure that reproducible identification of distinct cell populations of interest is identically achieved in every tube in a panel (Fig. 1, upper panels).

The data files to be used in a reference data base must also had been obtained by standardized and highly reproducible sample preparation procedures and data acquisition instrument settings. This is crucial to assure that differences observed among distinct data files are exclusively due to inter-sample biological diversity/

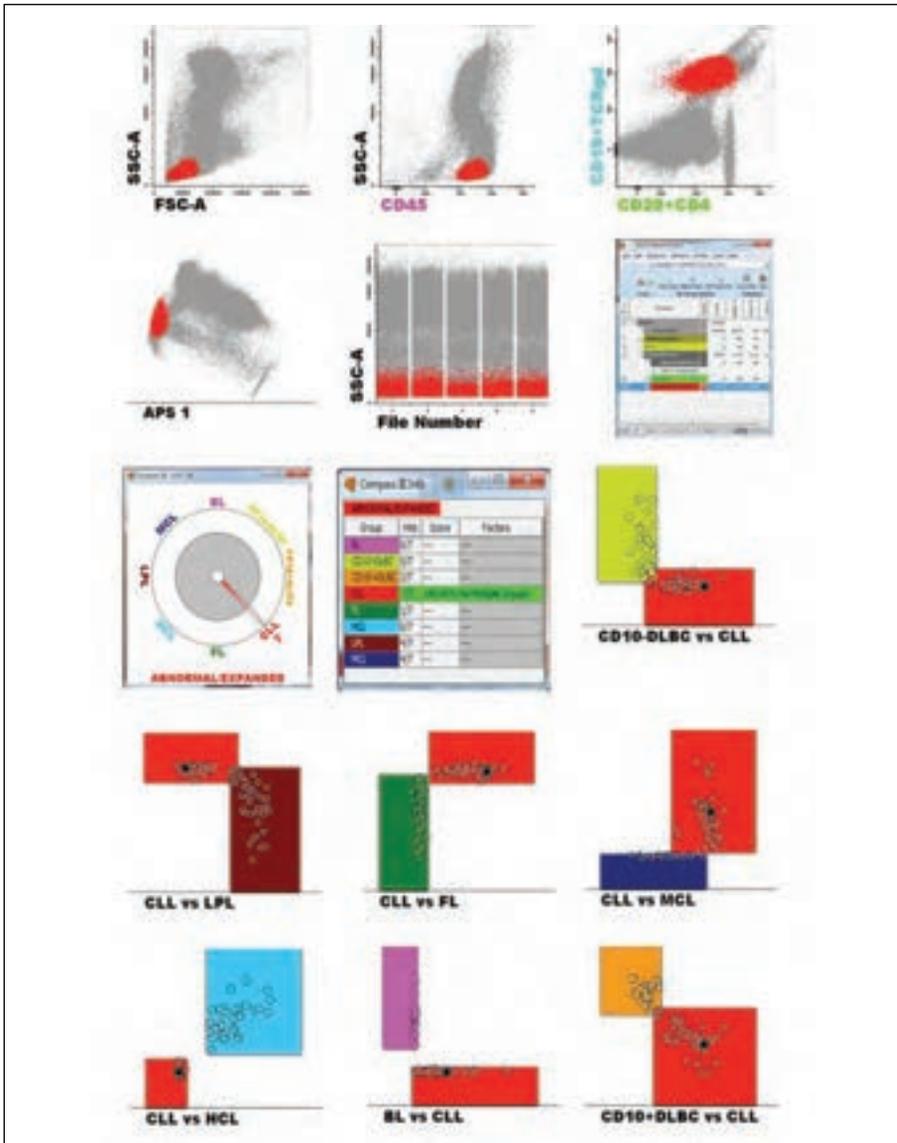


Fig. 1 - Illustrating example of how a cell population (red events in 2D dot plots and the APS1 plot) from a case stained with 5 distinct antibody combinations is selected on the basis of the common backbone markers (FSC, SSC, CD45, CD19 and CD20) for the corresponding five merged data files (file number parameter) (panels in the upper two rows) and compared with a preliminary EuroFlow data base for BCLPD (panels in the lower three rows). As shown, the case has an immunophenotypic profile which is fully compatible with CLL based on pairwise comparison of the phenotype of this case against all potential 1 by 1 comparisons for the distinct BCLPD WHO disease categories contained in the referred BCLPD data base (panels in the lower three rows); please note that the LPL group includes both lymphoplasmacytic lymphoma and marginal zone lymphoma cases; HCL, hairy cell leukemia, DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma, MCL, mantle cell lymphoma; CLL, chronic lymphocytic leukemia; FL, follicular lymphoma; BL, Burkitt lymphoma.

variability, and not to uncontrolled technical pitfalls. Because of this, the Euro Flow data bases are being constructed strictly based on the EuroFlow antibody panels and multicolor screening and MRD tubes, after staining according to the EuroFlow standard operating procedures (SOPs) and acquisition in instruments which had been cross-calibrated using the EuroFlow standardized procedures for instrument set-up and data acquisition (please see the following section for more detailed information about the EuroFlow data bases). In addition, such instruments and procedures have undergone an external quality assurance process for the last four years, in order to assure that data acquired in different instruments and laboratories and at different times in individual laboratories, are fully and consistently comparable. Only through such a strategy, it can be guaranteed that the potential technical variability generated in multicenter settings will not have a negative impact on the detection of the relevant biological differences among distinct cell populations in one or multiple samples. This can be particularly relevant in the case of cells from distinct tumor entities when a differential diagnosis has to be established in routine clinical practice (e.g. the major WHO diagnostic categories of B-cell chronic leukemias and lymphomas).

Despite all the above, the construction of reference databases for flow cytometry leukemia/lymphoma immunophenotypic data remains a rather flexible process. For example, data derived from sample aliquots stained in a different but standardized way, can still be merged. This is due to the fact that systematic differences related to technical variables (e.g. differences in light scatter between the same cell populations derived from different aliquots of the same sample stained for cell surface-only and cell surface plus intracellular markers) can be corrected, allowing such data files to be pooled together. Similarly, flow cytometry data on antigen expression levels derived from different instruments, distinct antibody clones within a CD code, or different fluorochrome conjugates, may still be merged and included together in the same data base, whenever the appropriate correction factors, once validated, are applied.

In practice, construction of a reference data base only requires merging of distinct data files into one single data file (Fig. 1, upper panels). In such final “merged” file, the sequence of acquisition of cells in the flow cytometer (e.g. the parameter “time of acquisition”) may be used to also indicate the sequence of merged data files into the reference data base (Fig. 1, upper panels). This will facilitate easy and fast identification and control of deviations from the expected values for the common parameters evaluated in each of the merged individual data files and fast identification of said deviations.

It should be noted that a reference data base for a given sample may be obtained by merging distinct subgroups of data files that contain similar data about distinct reference groups of cases (Fig. 1, lower panels). Thus, a reference data base may contain data for distinct groups of control subjects (e.g. age and gender groups), distinct diseases - e.g. B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL), T-ALL and acute myeloblastic leukemia (AML) - , and/or multiple biological disease subgroups - e.g. *IGHV* gene mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) -, or different disease stages (e.g. bone marrow samples from T-

ALL cases after induction and consolidation therapy, during maintenance therapy and out of therapy) as well as distinct types of samples (e.g. peripheral blood, bone marrow and lymph nodes) for a single (e.g. CLL) or multiple diseases (B-cell chronic leukemias and lymphomas) (Fig. 1, lower panels).

The utility of flow cytometry data bases

Flow cytometry data bases have multiple applications. Among other, they can be used for technical purposes (e.g. to evaluate the performance of a given antibody panel for a pre-defined specific goal), for data base-guided identification of multiple cell populations coexisting in a sample (e.g. automated gating and identification of cell populations) and to support the diagnostic process during screening, classification, and monitoring the disease evolution after therapy. Data bases allow software-guided identification of altered cell numbers and phenotypes in a given sample, including sub-classification of distinct cell populations (e.g. normal and altered) defined on phenotypic grounds and the evaluation of normal vs altered maturation-associated protein expression profiles.

Currently, the design of monoclonal antibody combinations and antibody panels still relies to a large extent, on the experience and the knowledge of individual experts. Because of this, panel optimization has been almost systematically required. This is due to the fact that panel design is frequently experience-based and experienced-biased; therefore, newly designed panels are frequently built on retrospective data and not on prospective (robust) validation, prior to its establishment in routine laboratory diagnostics. Because of this, the median lifetime of many panels (at individual or at multiple laboratories) is clearly shorter than expected; this is particularly true in a field like flow cytometry immunophenotyping, where continuous developments occur in the areas of laser technology, development of new antibody clones and availability of high-quality and technically compatible fluorochromes, among other advances. Therefore, whenever a recently designed panel enters into routine testing, its weaknesses start to become evident, rapidly leading to panel modifications after multiple and different rounds of panel optimization; in this regard, the more a panel is used in different laboratories and distinct settings, the highest the probability that its weaknesses are identified and that divergence from such panel into an increasing number of different variants will occur at individual sites.

In order to improve panel design, the availability of data bases containing large sets of data about the relevant samples and a broad number of stainings, are crucial. For such purpose clear definition of the precise aims of a given panel is required prior to its evaluation, in order to objectively determine its performance. Although the starting point may be the experts experience and the knowledge and data available in the literature, most antibody panels to define lineage-commitment in the diagnosis of acute leukemia have not been directly evaluated against an independent criteria (e.g. the WHO classification), but just adopted following experienced-based consensus recommendations and guidelines that indicate a list of mandatory and recommended CD markers without specifying, for example,

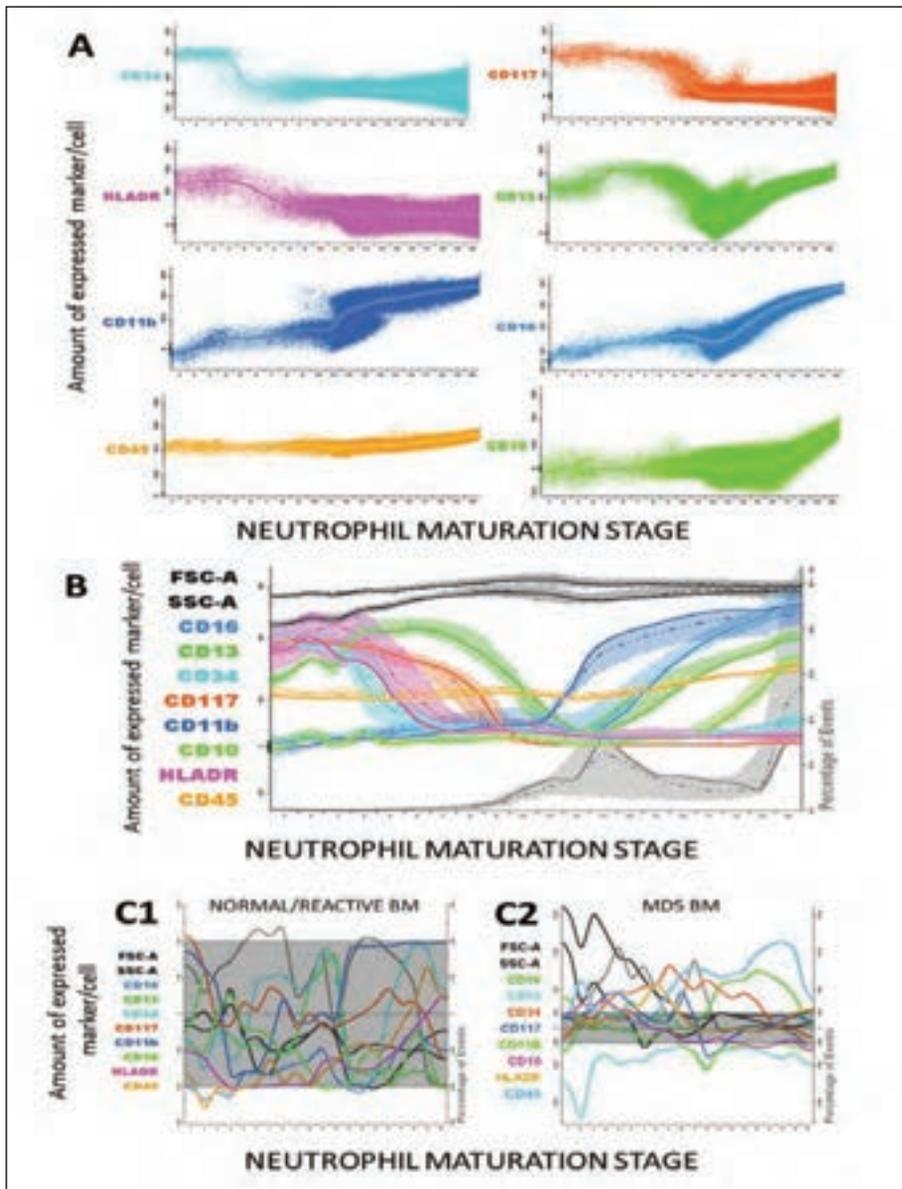


Fig. 2 - Maturing neutrophil data base for normal bone marrow samples for prospective evaluation of normal vs altered phenotypes of bone marrow neutrophil lineage cells. Example illustrating the neutrophil maturation profile of a bone marrow sample from a healthy control (Panel A) and the reference profile for the same markers plus the normal FSC, SSC and cell distribution patterns in a reference data base built with 23 normal bone marrow samples (panel B) for tube 1 of the EuroFlow AML/MDS antibody panel (this tube includes the following markers: CD34, CD117, HLADR, CD13, CD11b, CD16, CD45 and CD10). In panel C the differences between the maturation profiles of the neutrophil compartment from the normal bone marrow sample shown in panel A (panel C1) and a bone marrow sample from a patient with myelodysplasia (MDS; panel C2) against the reference data base shown in panel B, are illustrated, after transforming normal reference data base expression values to zero plus/minus two standard deviations (gray area in plots C1 and C2).

which are the most appropriate antibody clones and fluorochrome conjugated reagents per marker. Because of this, antibody panels used in individual laboratories are frequently home-built and run in the absence of a full validation in large series of cases with reference criteria (e.g. a gold standard or at least a fully independent method). Thus, their precise performance providing clinically useful information and the contribution of individual markers for that information, are only vaguely determined; at the same time, unwanted levels of redundancy are also frequently present in such panels. Altogether, this leads to a decreased cost-effectiveness of such strategies and panels. In contrast, usage of data bases containing flow cytometry information for large numbers of cases that have been classified according to pre-established (and independent) criteria, in combination with multivariate statistical analyses based on single cellular event data, provides robust information not only about the performance of a given antibody panel but also about the most informative markers contained in it and the potential levels of redundancy among the remaining markers, in a highly-controlled way.

Reference data files from a well-defined subgroup of individuals may also be used to highlight altered cell numbers and phenotypes through direct comparison with staining patterns of prospective data obtained in individual cases, against a reference data base of normal controls. For this purpose, the data base of the controls has to be matched with the interrogated sample for all relevant variables (e.g. age, type of sample). Such direct comparisons permit rapid identification of each normal cell subpopulation in the interrogated sample, as well as cell populations that differ from the normal reference in terms of absolute cell numbers and relative distribution or multidimensional phenotype. In addition, information may also be provided about the parameters that contribute most to the differences encountered. Similar comparisons of altered cell populations found in an interrogated case, with reference flow cytometry data bases of distinct but related disease categories, also helps to sub-classify them into the corresponding diagnostic categories (Fig. 1, lower panels). Of note, reference data bases of control samples may contain information about discrete cell populations or heterogeneous cell compartments with e.g. their maturation associated immunophenotypic profiles (Fig. 2). Therefore, they may also contribute to provide new objective data about the specific stages of maturational arrest/blockade of tumor cells and their altered patterns of expression of maturation-associated markers.

The EuroFlow databases

At present, several different flow cytometry data bases are being constructed by the EuroFlow Consortium. Such data bases are aimed at being incorporated into the Infinicyt software developed by Cytognos SL (Salamanca, Spain) (Fig. 3). Overall, such databases include distinct sets of flow cytometry data files per diagnostic screening tube (ALOT, LST, PCST and SST) and per antibody panel (AML/MDS, BCP-ALL, T-ALL, BCLPD, TCLPD NKCLPD and PCD), as well as per multicolor MRD tube/combination of markers (e.g. MM, CLL, and BCP-ALL MRD tubes) (Tab. 1). They include reference data files of normal samples,

Tab. 1 - EuroFlow data bases: summary of planned numbers and type of cases to be included for the EuroFlow diagnostic screening tubes and classification panels.

Disease/ Tube	Disease Category Leader	Back-up person	No. of cases to be in the first EuroFlow data bases	
			Patient samples	Normal samples
ALOT	E. Mejstrikova	A.J. van der Sluijs-Gelling	~2000	BM: 15 PB: 15 LN: 15
LST	J. Flores	A. W. Langerak	1500	BM: 10 PB: 60 Viral PB: 10 Reactive LN: 10
SST	A. W. Langerak	L. Martín-Martín	To be determined	Reactive CSF: 10 Normal CSF: 20 VF: 10
PCST + PCD	J. Flores	D. Karsch	210	Healthy BM: 20 Reactive BM: 20 PB: 10 LN type 1: 10 LN type 2: 10
BCP-ALL	V.H.J. van der Velden	E. Mejstrikova	~600	BM $\leq 2y$: 5 BM $> 2y$: 20 Regenerating BM: 20 (=T-ALL samples) PB: 10
T-ALL	A. Trinquand	L. Şedek	~150	BM: 10 Regenerating BM: 10 (=BCP-ALL samples) PB: 10 (thymus: 5?)
AML	V.H.J. van der Velden	S. Matarraz	~500	BM: 40 (all 7 tubes) PB: 10
MDS	S. Matarraz	V.H.J. van der Velden	To be determined	BM: 40 (tube 1-4) PB: 10
B-CLPD	S. Böttcher	A. Orfao	1000	BM : 20 PB : 20 Reactive LN: 10
T-CLPD	J. Almeida	M. Lima	250	BM: 10 Reactive PB: 20 Reactive LN: 10
NK-CLPD	M. Lima	J. Almeida	30	BM: 10 Reactive PB: 20

other control groups and/or less frequent disease subtypes which are also clinically relevant despite their lower prevalence or even their rarity. Thus, the ALOT data base initially aims at containing a few thousands of reference cases for the three major groups of acute leukemias identified with the ALOT tube: AML, BCP-ALL and T-ALL (Tab. 1). Usage of such data base will aim at identifying cases with typical AML, BCP-ALL and T-ALL, distinguishing them from mixed lineage acute leukemia and undifferentiated acute leukemia identified as those cases not fulfilling the criteria required for any of the former three major groups of acute leukemias. In a second step, new reference subgroups for these latter cases (e.g., B-T, B-myeloid, T-myeloid and B-T-myeloid mixed lineage acute leukemia and also undifferentiated leukemias), will be added together with the reference groups for typical BCP-ALL, T-ALL and AML.

In turn, the LST data base will include reference cases for normal control and altered peripheral blood, bone marrow and lymph node samples (Tab.1). Normal control data files will be used for automated gating of the normal cell populations and identification of the altered populations co-existing in a sample of the above types; a similar approach will also be used with the SST data base. In turn, reference pathological cases will be used for initial/preliminary sub-classification of the altered cell populations into major groups of diseases. Further classification into the distinct WHO diagnostic categories of B-, T- and NK-cell chronic lymphoproliferative disorders (BCLPD, TCLPD and NKCLPD, respectively) will be achieved with the corresponding EuroFlow data bases and panels.

For the AML/MDS panel a different strategy will be applied as separate databases will be constructed and linked for:

- 1) the early hematopoietic cells precursors identified as those bone marrow cells that express CD34+ and/or of CD117+;
- 2) the distinct maturation compartments of neutrophil, monocytic, erythroid and lymphoid lineage cells, respectively (Fig. 2).

In a second phase, maturation-associated data bases for other minor cell lineages (e.g. plasmacytoid dendritic cell, mast cell and basophil lineage) will also be constructed with normal and reactive control bone marrow samples. Similarly, the EuroFlow BCP-ALL and T-ALL antibody panels will be used to stain normal/reactive bone marrow and thymus, respectively, in order to build the corresponding normal/reactive reference profiles of maturation for B and T-cell precursors to mature B and T lymphocytes.

Finally, data bases with informative tissue samples per disease category are also being built for the EuroFlow MRD tubes/panels per disease category (e.g. BCP-ALL, CLL and multiple myeloma); such MRD data bases are being constructed based on control samples derived from healthy subjects and patients with other pathologic conditions. For example, reference data bases for multiple myeloma MRD include reference bone marrow samples from healthy subjects, regenerating bone marrow from patients with disease conditions other than B-cell and plasma cell neoplasias, as well as both MGUS and multiple myeloma patients at diagnosis, all stained with the two EuroFlow-multiple myeloma 8-color MRD tubes.

Concluding remarks

Recently, the concept of using reference data bases invented by Orfao A, Costa ES and Pedreira CE has been implemented into innovative flow cytometry software programs. In combination with multivariate statistical analysis, such data bases provide unique, useful tools for objective evaluation of antibody panels and prospective comparison of individual cases or groups of cases against such data bases for the diagnostic screening, classification and MRD monitoring of patients with distinct hematological disorders; in addition, the data base concept also supports new algorithms for automated gating of flow cytometry data files and direct labeling of the normal and altered cell populations they may contain. Currently, data bases to be specifically used with the EuroFlow screening tubes, classification panels and MRD antibody combinations based on the EuroFlow protocols and antibody combinations, are being constructed and will be implemented into the Infinicyt software for user-friendly application and support of routine immunophenotyping of leukemia and lymphoma cases.

Aknowledgements

We thank Marieke Comans-Bitter for graphic EuroFlow antibody panels design of the figures and for her continuous support in the management of the EuroFlow Consortium, and Bibi van Bodegom, Caroline Linker for their secretarial support of the consortium activities. The research activities of the EuroFlow Consortium were supported by the European Commission (grant STREP EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708, entitled 'Flow cytometry for fast and sensitive diagnosis and follow-up of hematological malignancies') and the following national and international grants: Spanish Network of Cancer Research Centers (ISCIII RTICC-RD12/0036/0048-FEDER), FIS 08/90881 and FIS PS09/02430 from the 'Fondo de Investigacion Sanitaria', Ministerio de Ciencia e Innovacion (Madrid, Spain); the International Myeloma Foundation, the Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC); Consejería de Sanidad, Gerencia Regional de Salud de Castilla y León (SACYL) (BIO/SA24/13); Fundación Samuel Solórzano Barruso (University of Salamanca, Spain); GR37 EDU/894/2009 and SA016- A-09 from the Consejería de Educacion, Junta de Castilla y Leon (Valladolid, Spain); PIB2010BZ-00565 from the Direccion General de Cooperacion Internacional y Relaciones Institucionales, Secretaria de Estado de Investigacion, Ministerio de Ciencia e Innovacion (Madrid, Spain); Ministry of Health Czech Republic (NT/12425-4 and NS/10480-3); and Charles University grant No. 23010 and UNCE No. 204012; Tomas Kalina is supported as an 'ISAC Scholar' by the International Society for Advancement of Cytometry (ISAC); CEP and ESC were partially supported by CNPq- Brazilian National Research Council, (Brasília, Brazil) (Produtividade em Pesquisa: 305081/2011-0 & 402734/2012-2, respectively and Universal: 472499/2012 & 481266/2012-7, respectively) and FAPERJ-Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro, (Rio de Janeiro, Brazil) (Cientista do Nosso Estado: E26/102.946/2011-CNE & E26/101.466/2010-JCNE, respectively).

Bibliografia essenziale

1. Costa ES, Pedreira CE, Barrena S, Lecrevisse Q, Flores J, Quijano S, Almeida J, Garcia Macias MC, Botcher S, Van Dongen JJM, Orfao A on behalf of the EuroFlow Consortium. Automated pattern-guided principal component analysis vs expert-based immunophenotypic classification of B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a step forward in the standardization of clinical immunophenotyping. *Leukemia*. 2010; 24: 1927-1933.
2. Kalina T, Flores-Montero J, Van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Bottcher S, Ritgen M, Almeida J, Lhermitte L, Asnafi V, Mendonça A, De Tute R, Cullen M, Sedek L, Vidriales MB, Perez JJ, Mesjstrikova E, Hrusak O, Szczepanski T, Van Dongen JJM, Orfao A. Euro Flow standardization of flow cytometry instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012; 26: 1986-2010.
3. Pedreira CE, Costa ES, Lecrevisse Q, Van Dongen JJM, Orfao A. On behalf of the EuroFlow Consortium: Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trend Biotechnol*. 2013; 31: 415- 425.
4. Pedreira CE, Costa ES, Barrena S, Lecrevisse Q, Almeida J, Van Dongen JJM, Orfao A. Generation of flow cytometric data files with a potentially infinite number of dimensions. *Cytometry A*. 2008; 73A: 834-846.
5. Pedreira CE, Costa ES, Almeida J, Fernandez C, Quijano S, Flores J, Barrena S, Lecrevisse Q, Van Dongen JJM, Orfao A. A probabilistic approach for the evaluation of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Cytometry A*. 2008; 73A: 1141-1150.
6. Sobral da Costa E, Tosta Peres R, Almeida J, Lecrevisse Q, Arroyo ME, Teodosio C, Pedreira CE, Van Dongen JJM, Orfao A. Harmonization of light scatter and fluorescence flow cytometry profiles obtained after staining peripheral blood leucocytes for cell surface-only versus intracellular antigens with the Fix & Perm reagent. *Cytometry B Clin Cytometry*. 2010; 78B: 11-20.
7. Van Dongen JJM & Orfao A. EuroFlow: resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics in personalized medicine. *Leukemia*. 2012; 26: 1897-1907.
8. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, Van der Velden VHJ, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lecrevisse Q, Lucio P, Mejstrikova E, Szczepanski T, Kalina T, De Tute R, Brügemann M, Sedek L, Cullen M, Langerak AW, Mendonça A, Macintyre E, Martin-Ayuso M, Hrusak O, Vidriales MB, Orfao A. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leucocytes. *Leukemia*. 2012; 26: 1908-1975.

Clinical and biological significance of rare tumor cells in multiple myeloma

Bruno Paiva

Flow Cytometry Core, CIMA LAB diagnostics, Clinica Universidad de Navarra, University of Navarra, Av. Pio XII, 55 - 31008 Pamplona, Spain

B cells can develop into two major types of memory cells, namely memory B cells and memory plasma cells (PCs). Memory B cells do not constitutively express any effector function, and require re-stimulation before they can contribute to the memory response. This form of memory is flexible, and can be regulated according to the amount of antigen encountered, and the immune environment. Memory PCs secrete abundant amounts of effector molecules, i.e. specific antibodies for extended periods of time (>1 year) while remaining as non-dividing cells in bone marrow (BM). They persist independently of antigenic stimulation, and have lost the molecular equipment necessary for sensing their target microorganism/antigen. As a consequence of their longevity, long-lived PCs already harbor one of the features typically required for tumor development, and further accumulation of oncogenic events potentially driven by genomic instability may enhance clonal predominance through proliferative expansion. Accordingly, PCs can give rise to different pathological manifestations such as chronic inflammatory processes in autoimmune diseases by continuously secreting pathogenic antibodies, or neoplasms such as monoclonal gammopathies that can either become malignant (e.g.: multiple myeloma -MM- and AL amyloidosis) or remain benign for several years (e.g.: MGUS) (1).

It is remarkable to see that for an end-stage population within the B-cell lineage, PCs show significant cellular heterogeneity regarding their physical location, life-time, functionality and geno/phenotypes. Not surprisingly, their malignant counterpart such as in MM is also highly heterogeneous. At the genomic level, the study of sequential samples by SNP-arrays and whole genome sequencing (WGS) has demonstrated three distinct patterns of genomic evolution:

- 1) stable genomes without differences between diagnosis and relapse clones;
- 2) linear evolution in which the relapse clone apparently derives from the major subclone at diagnosis, but continues to diversify through additionally acquired lesions;
- 3) branching (nonlinear) models where the relapse clone clearly derives from a minor subclone, barely present at diagnosis (2-4).

The clonal heterogeneity observed at the genomic level translates into the RNA

level, and massive gene expression profiling (GEP) has allowed the recognition of new molecular subgroups with prognostic impact (5). The molecular classification of MM relies on different gene expression profiles displaying specific genetic signatures related to specific IGH translocations or ploidy status, and with a characteristic clinical behavior (6). Consequent with the genomic and transcriptomic heterogeneity, also the immunophenotypic expression profiles of MM clonal PCs greatly differs. Importantly, the presence or absence of different antigens has already been correlated with different outcome and even different cytogenetic profiles (7, 8). In fact, it has been recently shown that distinct phenotypic subclones can be observed in approximately 30% of newly-diagnosed MM patients, as well as potential therapeutic selection of such pre-existing diagnostic phenotypic subclones during minimal residual disease (MRD) monitoring (9). Because phenotypically distinct PCs may show different clonogenic and cytogenetic profiles, identification and follow-up of unique phenotypic-genetic myeloma PCs subclones may indeed become relevant for tailored therapy (9).

Given the recent advances on flow cytometry technology, immunophenotypic studies on PCs have remarkably improved, and led to the identification of distinct functional MM subclones. One example of such subclones are circulating tumor cells (CTCs). We and others have recently observed that CTCs are present in the vast majority of MM patients (80%), and also in a significant number of smoldering and MGUS (20%) cases (10). A potential explanation for the recirculation of clonal PC in the early stages of the disease (e.g. MGUS) could rely on the advanced age of MGUS patients, which could lead to lower numbers of available BM niches. However, we failed to show any correlation between the presence of clonal PC in PB and patients' age, which left us with the following question: what is the precise biological significance of CTCs in MM? In fact, the biological features of MM CTCs remained largely unexplored with many questions kept unanswered (11):

- 1) Are all bone marrow (BM) clonal PCs capable to egress into PB, or only a specific subpopulation?
- 2) Do CTCs have stem cell-like features and are they enriched on clonogenic cells?
- 3) Do circadian rhythms also affect CTCs (similarly to CD34+ hematopoietic stem cells; HSCs)?

We have recently investigated the biological and functional characteristics of CTCs, by analyzing the phenotypic, cytogenetic, and circadian characteristics of CTCs from MM patients, and comparing them to patient-paired BM clonal PCs (12). Interestingly, we have shown that CTCs might represent a phenotypic subset of BM myeloma PCs with lower expression of integrin and adhesion molecules and consequently a lower dependence on BM stromal cell niches would have an enhanced capacity to egress into PB. Accordingly, FISH analysis on highly purified FACS-sorted CTCs and their paired BM clonal PCs, unraveled a different cytogenetic profile between the 2 tumor subpopulations in most MM patients analyzed. Most interestingly, despite a common cytogenetic background, BM clonal PCs showed systematically >1 cytogenetic alteration which was not detected

in CTCs. Further investigations using novel and wider genomic techniques are currently underway. *In vitro*, we also shown that the fraction of clonal PCs that exit the BM into the PB (CTCs) could be enriched on clonogenic cells, but also that clonogenic cells are relatively rare among all myeloma tumor cells, particularly in the BM. Finally, while investigating the circadian rhythm of myeloma CTCs, it was surprising to see the marked fluctuation of the daily absolute number of CTCs in the PB of MM patients, peaking between 4:00 AM and 12:00 PM, with a nadir between 4:00 PM and 12:00 AM. These results, although preliminary due to low patient number, suggest that similarly to CD34+ HSCs, MM CTCs may egress to PB during the patients' resting period to colonize/metastasize other sites in the BM or at extramedullary tissues. Altogether, these results support the concept of CTCs as the MM disseminating cells, though further studies are warranted to elucidate which molecular mechanisms drive disease dissemination.

Although MM remains a largely incurable disease, approximately half of the patients achieve complete remission (CR), and emerging data suggests potential curability rates with comprehensive "total-therapy-like" programs. This landscape is likely to be improved with the advent of new antibodies and small molecules. Therefore, conventional serological and morphological techniques have become suboptimal for sensitive evaluation of highly-effective treatment strategies, and the role of MRD for response assessment and potential implications for clinical decision making is matter of extensive debate. Because existing data suggests that MRD could be used as biomarker to evaluate treatment efficacy, help on therapeutic decisions, and act as surrogate for overall survival (13-16), the time has come to address within clinical trials the exact role of MRD monitoring in MM, which implies systematic usage of highly sensitive cost-effective, readily available and standardized MRD techniques. Our and other groups have shown that albeit "*the deeper the response the longer the survival*", even among patients reaching complete response (CR), a small chemoresistant clone (MRD) can be detected using highly sensitive techniques, and its detection translates into immediate worse outcome (17). Interestingly, the outcome of MRD-positive patients not only depends on the amount of residual tumor cells, but also on their cytogenetic features (17). Accordingly, the genomic landscape of MRD cells may well influence patients' survival. Ultimately, this MRD clone represents a very small fraction of tumour cells that are chemoresistant, potentially quiescent (not producing M-protein), and able to recapitulate the initial tumour burden at relapse. Thus, the MRD clone may represent a unique model whose analysis can help us understand chemoresistance and the characteristics of eventual MM clonogenic cells, and ultimately design therapeutic strategies to overcome resistance.

Most recently, we compared the immunophenotypic and genomic profiles of paired baseline vs MRD clonal PCs from a total of 40 newly-diagnosed elderly MM patients enrolled in the GEM2010 trial. First, we focused on the immunophenotypic expression profiling (iPEP) of patient-paired baseline vs MRD clonal PCs through 23-color MFC, combining backbone markers for the identification of clonal PCs with additional integrins, adhesion, activation and maturation molecules. Our results suggested that among the initial tumor bulk, the few chemoresistant

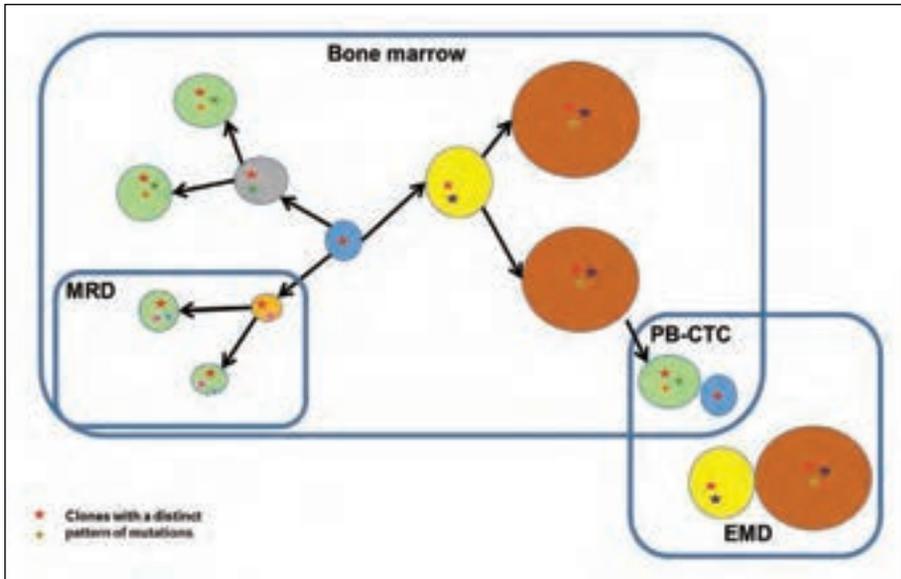


Fig. 1 - Phenotypic overview of myeloma clonal heterogeneity and chemoresistance.

cells were those with stronger expression of integrin and adhesion molecules. Furthermore, specific copy number abnormalities are differently present in diagnostic vs. MRD myeloma plasma cells, suggesting treatment selection of chemoresistant subclones during the MRD stage.

In parallel, we have characterized the transcriptome of MRD myeloma PCs comparing to their diagnostic counterpart, we confirmed de-regulated genes/pathways previously related to proteasome-inhibition chemoresistance, and unravel novel genes that may determine chemoresistance of MRD cells to “modern” chemotherapy and survival of MM patients.

In summary, we have witnessed over the last decade a remarkable improvement on the treatment of MM as well as on our knowledge of the disease biology. Importantly, laboratory diagnostic care is also improving, and newer high-throughput techniques should allow further optimization of patient’ outcomes through “precise medicine” according to the intraclonal mutational landscapes and ultra-deep treatment monitoring.

Bibliografia

1. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014; 15: e538-e548.
2. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell.* 2014; 25: 91-101.
3. Melchor L, Brioli A, Wardell CP, et al. Single-cell genetic analysis reveals the

- composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia*. 2014.
4. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2014; 5: 2997.
 5. Shaughnessy JD, Jr., Zhan F, Burington BE, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*. 2007; 109: 2276-2284.
 6. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009; 23: 2210-2221.
 7. Mateo G, Castellanos M, Rasillo A, et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 3661-3667.
 8. Mateo G, Montalban MA, Vidriales MB, et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 2737-2744.
 9. Paino T, Paiva B, Sayagues JM, et al. Phenotypic identification of subclones in multiple myeloma with different chemoresistant, cytogenetic and clonogenic potential. *Leukemia*. 2014.
 10. Paiva B, Perez-Andres M, Vidriales MB, et al. Competition between clonal plasma cells and normal cells for potentially overlapping bone marrow niches is associated with a progressively altered cellular distribution in MGUS vs myeloma. *Leukemia*. 2011; 25: 697-706.
 11. Ghobrial IM. Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood*. 2012; 120: 20-30.
 12. Paiva B, Paino T, Sayagues JM, et al. Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. *Blood*. 2013; 122: 3591-3598.
 13. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*. 2014.
 14. Paiva B, Martinez-Lopez J, Vidriales MB, et al. Comparison of immunofixation, serum free light chain, and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 1627-1633.
 15. Rawstron AC, Child JA, de Tute RM, et al. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol*. 2013; 31: 2540-2547.
 16. Zamagni E, Patriarca F, Nanni C, et al. Prognostic relevance of 18-F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood*. 2011; 118: 5989-5995.
 17. Paiva B, Gutierrez NC, Rosinol L, et al. High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood*. 2012; 119: 687-691.

Applicazioni cliniche della biopsia liquida nel carcinoma del colon-retto metastatico

Salvatore Siena, Erica Bonazzina, Giuseppina Ziranu, Andrea Sartore-Bianchi
Niguarda Cancer Center, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

I marcatori molecolari (biomarkers) che possono predire nel tumore del singolo paziente la risposta o la resistenza alla terapia oncologica hanno sempre più ampio utilizzo nel carcinoma del colon retto (CRC) metastatico.

In particolare, le mutazioni di *RAS* (*KRAS* e *NRAS* esoni 2, 3 e 4) del CRC sono indice di resistenza al trattamento con gli anticorpi monoclonali anti-EGFR panitumumab (Douillard et al., 2013) e cetuximab (Ciardiello et al., 2014). Tuttavia anche nel caso dei pazienti selezionati sulla base dello stato mutazionale di *RAS* dopo il beneficio clinico alla terapia con panitumumab o cetuximab il tumore va in progressione perché sviluppa resistenza (resistenza acquisita) che si verifica di norma dopo 3-12 mesi dall'inizio della terapia. Nostri studi hanno dimostrato

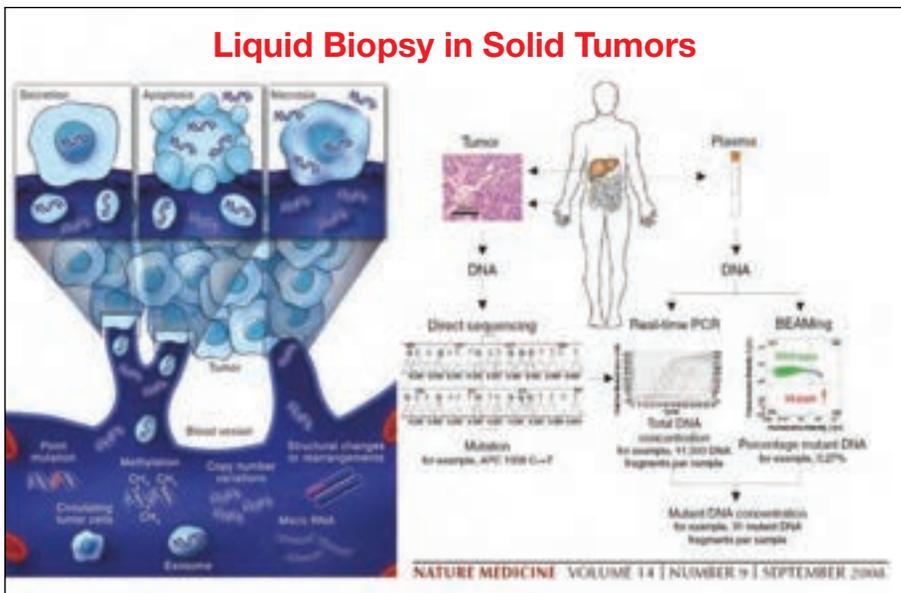


Fig. 1

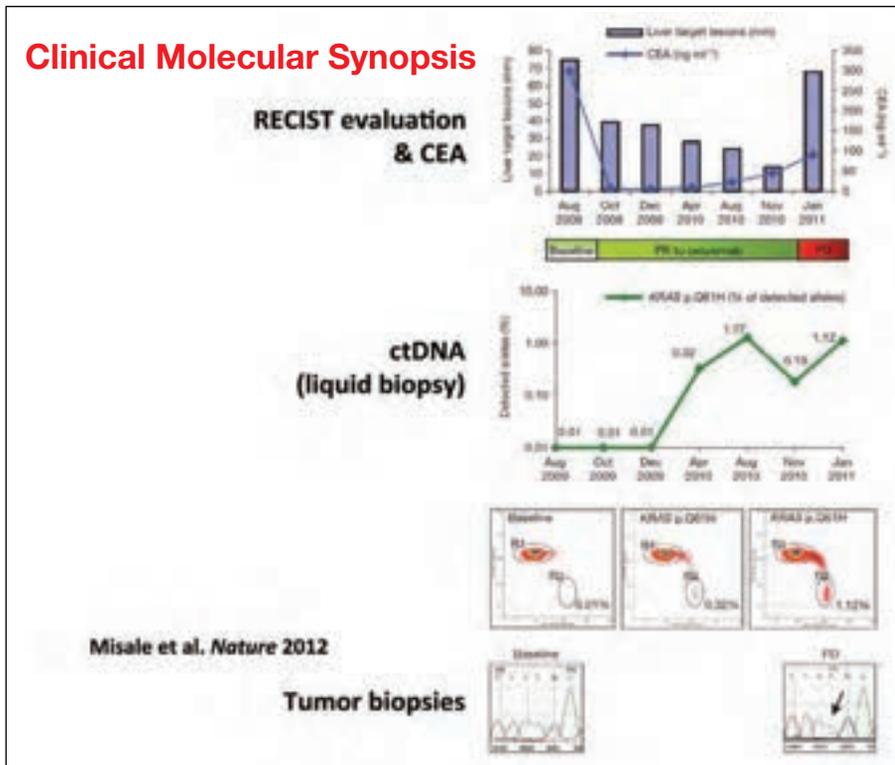


Fig. 2

come alla base della resistenza vi sia l'espansione di cloni tumorali con mutazioni di *RAS* molto probabilmente risultato della pressione farmacologica e selezione darwiniana esercitata dalla terapia anti-EGFR (Diaz et al., 2012, Misale et al., 2012, Misale et al., 2014).

Per quanto riguarda il solo cetuximab è stata documentata anche l'insorgenza della mutazione di *EGFR* S492R (Montagut et al., 2012). Queste scoperte di farmacogenomica stanno alla base delle applicazioni cliniche, immediate o future, della biopsia liquida per la terapia del CRC.

Determinazione dello status di KRAS e BRAF su plasma rispetto a tessuto

Attualmente, la rilevazione di mutazioni di *RAS* è effettuata di routine su tessuto tumorale mediante sequenziamento diretto, analisi RFLP o *high-resolution melting analysis* combinata con sequenziamento diretto, o *pyrosequencing*; raramente vengono impiegate altre tecniche come *single-strand conformational polymorphism analysis* o *suppressive clamp-PCR* (Pinto et al., 2011, Kobunai et al., 2010, Weichert et al., 2010). Sebbene queste metodiche forniscano risultati soddisfacenti in termini di specificità, dipendono dalla qualità e dalla quantità del campione tumorale (Boissière-Michot et al., 2014) e hanno un tempo per l'otteni-

mento dei risultati (*turnaround time*) mediamente lungo (2-3 settimane), che può risultare insoddisfacente per la programmazione terapeutica ottimale, soprattutto per il trattamento di prima linea della malattia metastatica. La necessità crescente di miglioramento della diagnostica molecolare ai fini della selezione personalizzata della cura ha innescato pertanto un vigoroso sforzo per sviluppare metodi più sensibili, più specifici, più convenienti e più veloci per determinare lo stato di mutazione di *RAS*, *BRAF* e altri geni rilevanti, fra cui “BEAMing”, PCR digitale o “cold” PCR. L’applicazione di queste tecniche avanzate, data la loro aumentata sensibilità nel rilevare mutazioni puntiformi, si può applicare alla ricerca di mutazioni su frammenti di DNA libero circolante (*circulating free DNA*, cfDNA) ottenuto da prelievo ematico (biopsia liquida) (Diehl et al., 2008, Bettgowda et al., 2014) e può pertanto rappresentare un’alternativa alla valutazione eseguita su tessuto.

Diversi studi hanno direttamente confrontato i dati mutazionali di *KRAS* su tessuto tumorale e su plasma in coorti di pazienti con CRC metastatico (Yen et al., 2009, Trevisiol et al., 2006, Spindler et al., 2012, Ryan et al., 2003, Thierry et al., 2014), con livelli di specificità variabili dal 36 al 98% per tecniche basate su qPCR (Trevisiol et al., 2006, Ryan et al., 2003), metodo array membrana (Yen et al 2009), *refined PCR* (Spindler et al., 2012) e *refined allele-specific quantitative PCR* (Thierry et al., 2014). In particolare, Thierry e collaboratori hanno recentemente riportato i risultati di uno studio prospettico in cieco che ha confrontato la determinazione dello status di *KRAS* e *BRAF* da cfDNA mediante *refined allele-*

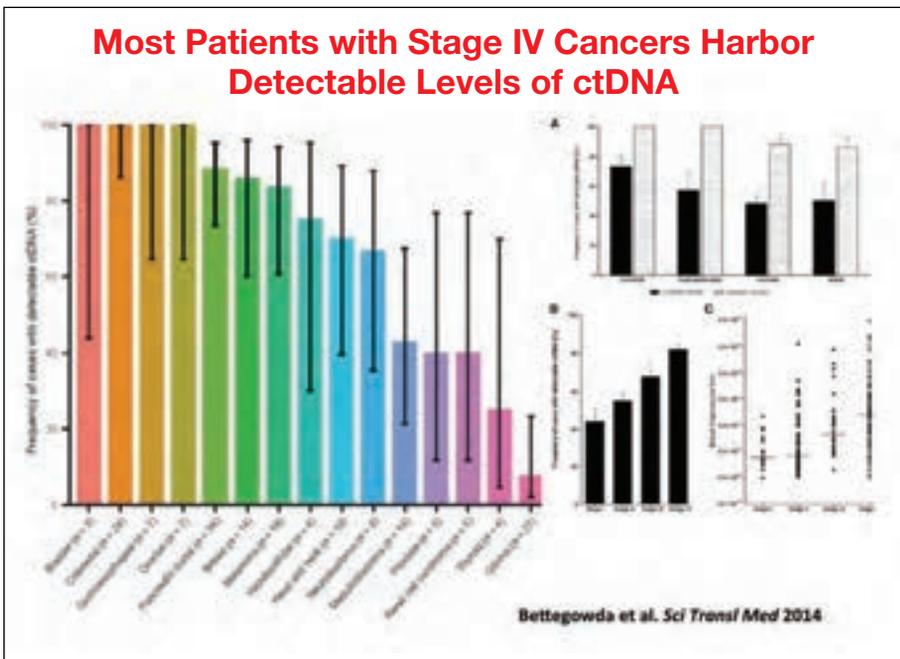


Fig. 3

specific quantitative PCR (AS qPCR) con quella effettuata su tessuto mediante tecniche standard di routine in 95 pazienti con CRC metastatico. In questo studio si è dimostrata una concordanza globale del 94% e una specificità del 98% rispetto ai metodi di analisi standard su tessuto tumorale, con un tasso di successo nella rilevazione di cfDNA del 100%. Per *KRAS* si è rilevata una discordanza in 4/95 casi: in 3/4 l'analisi ha rivelato assenza di mutazione da cfDNA (*wild-type*) a fronte di una mutazione su analisi tissutale, mentre in un caso è avvenuto il contrario. Per *BRAF* si è rilevata una concordanza del 100%, sia per i casi mutati (n=5) che *wild-type* (n=90).

Nel loro insieme questi dati (Yen et al., 2009, Trevisiol et al., 2006, Spindler et al., 2012, Ryan 2003), comprensivi di uno studio prospettico in cieco (Thierry et al., 2014), dimostrano come l'analisi mutazionale mediante biopsia liquida possa sostituire l'analisi su tessuto tumorale nel CRC metastatico, offrendo i vantaggi di un approccio relativamente non invasivo e più duttile, sia per la possibilità di effettuare più facilmente la determinazione dello stato mutazionale in base al momento dell'intervento terapeutico, sia per il ridotto *turnaround time*. Gli studi sinora disponibili per il CRC hanno preso in considerazione sinora le mutazioni di *KRAS* e *BRAF*, ma le performance della *liquid biopsy* sono certamente estendibili ad altre mutazioni puntiformi quali quelle di *NRAS*, rendendo completo il pannello ad oggi necessario per escludere resistenza ad anticorpi monoclonali anti-EGFR.

Monitoraggio dei meccanismi molecolari di resistenza alla terapia con anticorpi monoclonali anti-EGFR

Diversi studi hanno dimostrato che l'insorgenza di resistenza alla terapia con cetuximab e panitumumab può essere monitorata rilevando la comparsa di cloni mutati in *RAS* e *BRAF* in cfDNA (Misale et al., 2012, Diaz et al., 2012, Bettgowda et al., 2014). Inoltre, Montagut e colleghi (Montagut et al., 2012) hanno dimostrato anche l'insorgenza di una mutazione puntiforme nel dominio extracellulare di *EGFR* (S492R) quale meccanismo di resistenza secondaria a cetuximab. Questa mutazione altera legame dell'anticorpo al recettore ma non interferisce con il legame a panitumumab, ed è stato riportato come pazienti che hanno sviluppato questa mutazione acquisita siano stati successivamente trattati con panitumumab senza mostrare cross-resistenza (Montagut et al., 2012).

Esperimenti in linee di cellule di CRC rese resistenti a cetuximab o panitumumab hanno dimostrato come la resistenza acquisita ad anti-EGFR nel CRC metastatico si associ a plurime simultanee alterazioni geniche nel singolo tumore: in linee cellulari resistenti è stato possibile identificare più mutazioni concomitanti di *KRAS*, unitamente a cloni *NRAS* e *BRAF* mutati. Comunque, qualsiasi sia il meccanismo di resistenza che si è sviluppato in vitro, queste alterazioni del signaling pathway di EGFR convergono invariabilmente su MEK ed ERK, sostenendone un'attivazione prolungata che è possibile modulare farmacologicamente in vitro e in vivo (*patient-derived xenografts*) mediante inibizione specifica con inibitori di MEK di questi effettori a valle (Misale et al., 2014a).

La conferma clinica che vi sia un'eterogeneità genetica intrinseca a sostenere la

resistenza agli anticorpi anti-EGFR si deve proprio all'utilizzo della liquid biopsy. Nel cfDNA di pazienti con resistenza acquisita a cetuximab o panitumumab è possibile infatti dimostrare l'insorgenza di complessi patterns di mutazioni di *KRAS* e *NRAS*, spesso coesistenti (Misale et al., 2014, Bettgowda et al., 2014). Bettgowda e colleghi (Bettgowda et al., 2014) hanno analizzato mediante BEA-Ming il cfDNA tumorale di 24 pazienti con CRC alla recidiva dopo panitumumab, estendendo l'analisi di una coorte già analizzata in precedenza per il solo *KRAS* (Diaz et al., 2012) per ricercare anche altri hotspot noti di diversi geni nel pathway di EGFR: le regioni all'interno e circostanti i codoni *KRAS* 12, 13, 59, 60 e 61, i codoni *NRAS* 12, 13, 59, 60 e 61, *BRAF* codoni 599 e 600, *EGFR* codoni 712-721, 738-748, 790-800 e 847-859, e *PIK3CA* codoni 538-549 e 1039-1050. In questo studio sono state rinvenute, a resistenza a panitumumab, mutazioni acquisite di *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* o *EGFR* nella pressoché totalità dei casi (23 su 24 pazienti). A dimostrazione dell'eterogeneità che caratterizza questo fenomeno, in media è stato possibile rilevare 2.9 diverse mutazioni per singolo paziente (Bettgowda et al., 2014).

Se, da una parte, lo spettro delle mutazioni secondarie che insorgono a resistenza agli anticorpi anti-EGFR rispecchia gli stessi geni che presidono anche alla resistenza primaria (*KRAS* e *NRAS*), dall'altra vi è una peculiarità nel pattern mutazionale che si osserva nella resistenza secondaria, e cioè una maggiore incidenza (46% delle mutazioni acquisite) di alterazioni che interessano il codone 61, sia di *KRAS* che di *NRAS* (Misale et al., 2014b), e il meccanismo per il quale queste mutazioni siano così consistentemente associate alla resistenza acquisita non è noto, ma certamente la loro aumentata frequenza non può essere casuale. Inoltre, sono state osservate più raramente a resistenza anche mutazioni in *BRAF* (V600E) e nel dominio chinasi di *EGFR* (codoni 714 e 794) (Bettgowda et al., 2014), queste ultime descritte in un solo studio e pertanto da confermare quali meccanismi resistenza acquisita.

Nel complesso, questi risultati dimostrano che l'eterogeneità è una caratteristica fondamentale della resistenza acquisita alla terapia anti-EGFR nel CRC e che la complessità molecolare nel singolo tumore può essere desunta efficacemente avvalendosi della liquid biopsy. Lo scenario di ricerca clinica che si apre a questo riguardo è quello di verificare se sia possibile utilizzare queste informazioni per intercettare o prevenire l'insorgenza della resistenza prima della progressione clinica mediante modulazione farmacologica, ad esempio con farmaci che agiscono sulla via biochimica finale comune nel pathway di EGFR quali gli inibitori di MEK (Misale et al., 2014a).

Bibliografia

1. Bardelli A, Corso S, Bertotti A, Hobor S, Valtorta E, Siravegna G, Sartore-Bianchi A, Scala E, Cassingena A, Zecchin D, Apicella M, Migliardi G, Galimi F, Lauricella C, Zanon C, Perera T, Veronese S, Corti G, Amatu A, Gambacorta M, Diaz LA Jr, Sausen M, Velculescu VE, Comoglio P, Trusolino L, Di Nicolantonio F, Giordano S, Siena S. Amplification of the MET receptor

- drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov.* 2013; 3: 658-73.
2. Bettgeowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Lubner B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih IM, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA Jr. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014; 6: 224ra24.
 3. Boissière-Michot, F. et al. KRAS genotyping in rectal adenocarcinoma specimens with low tumor cellularity after neoadjuvant treatment. *Mod. Pathol.* 2012; 25: 731-739.
 4. Ciardiello F, Lenz HJ, Kohne CH, Heinemann V, Tejpar S, Esser R, Beier F, Stroh C, Duecker K, Van Cutsem E. Effect of KRAS and NRAS mutational status on first-line treatment with FOLFIRI plus cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): New results from the CRYSTAL trial. *J Clin Oncol.* 2014; 32(Suppl. 3); abstract LBA443.
 5. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA Jr. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008; 14: 985-990.
 6. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocáková I, Ruff P, Błasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon JL, Rother M, Williams R, Rong A, Wizek J, Sidhu R, Patterson SD. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2013; 369: 1023-1034.
 7. Kobunai T, Watanabe T, Yamamoto Y, Eshima K. The frequency of KRAS mutation detection in human colon carcinoma is influenced by the sensitivity of assay methodology: a comparison between direct sequencing and real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 395: 158-162.
 8. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen CT, Veronese S, Zanon C, Sartore-Bianchi A, Gambacorta M, Gallicchio M, Vakiani E, Boscaro V, Medico E, Weiser M, Siena S, Di Nicolantonio F, Solit D, Bardelli A. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature.* 2012; 486: 532-6.
 9. Misale S, Arena S, Lamba S, Siravegna G, Lallo A, Hobor S, Russo M, Buscarino M, Lazzari L, Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Amatu A, Lauricella C, Valtorta E, Siena S, Di Nicolantonio F, Bardelli A. Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Sci Transl Med.* 2014; 6: 224ra26.
 10. Misale S, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Siena S, Bardelli A. Resi-

- stance to Anti-EGFR Therapy in Colorectal Cancer: From Heterogeneity to Convergent Evolution. *Cancer Discov.* 2014; 4: 1269-1280. Epub 2014 Oct 7. Review.
11. Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, Crespo M, Pairet S, Iglesias M, et al. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med.* 2012; 18: 221-223.
 12. Pinto P, et al. Comparison of methodologies for KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer. *Cancer Genetics.* 2011; 204: 439-446.
 13. Ryan BM, et al. A prospective study of circulating mutant KRAS2 in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up. *Gut.* 2003; 52: 101-108.
 14. Spindler KLG, Pallisgaard N, Vogelius I, Jakobsen A. quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18: 1177-1185.
 15. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, Gillet B, Gongora C, Dechelotte P, Robert B, Del Rio M, Lamy PJ, Bibeau F, Nouaille M, Loriot V, Jarrousse AS, Molina F, MATHONNET M, Pezet D, Ychou M. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med.* 2014; 20: 430-435.
 16. Trevisiol, C. et al. Prognostic value of circulating KRAS2 gene mutations in colorectal cancer with distant metastases. *Int. J. Biol. Markers.* 2006; 21: 223-228.
 17. Van Emburgh BO, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Siena S, Bardelli A. Acquired resistance to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2014; 8: 1084-1094.
 18. Weichert, W. et al. KRAS genotyping of paraffin-embedded colorectal cancer tissue in routine diagnostics: comparison of methods and impact of histology. *J. Mol. Diagn.* 2010; 12: 35-42.
 19. Yen LC, et al. Detection of KRAS oncogene in peripheral blood as a predictor of the response to cetuximab plus chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 4508-4513.

Deterministic factors and stochastic events at the origin of Cancer Cells and of Metastatic Cells

Lucio Luzzatto

Scientific Director, Istituto Toscano Tumori, Firenze, Italy

The current model of the pathogenesis of cancer, or oncogenesis, is that a normal cell becomes a cancer cell through a sequence of somatic mutations. We presume that each of these mutations confers onto the progeny of the cell in which it has occurred a growth advantage, no matter how small: so that the resulting clone will be somewhat more abundant than the surrounding normal cells. If one cell belonging to the mutant clone were to undergo a second mutation, which again confers a growth advantage, the resulting sub-clone will grow somewhat faster still; and this pattern can be again repeated once or several times. In conventional pathology we call this a dysregulated growth pattern; at the same time, we are talking of a mutation/Darwinian selection process taking place in a population of somatic cells, that is very similar to the Darwinian evolution of organisms. Although the number n of mutations required to produce a cancer cell is not known in all cases and is certainly variable from one tumor to another, current estimates, based on both epidemiological data and molecular analysis, are that in most cases n is probably between 3 and 6. Today the landscape of somatic mutations in cancer has become a huge database, which fortunately is to a large extent public (see <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>).

Since the pioneering observation reported in 1775 by Percival Pott that scrotal cancer was common in chimney sweepers, many major environmental causes of cancer have been identified. In terms of public health the smoking of cigarettes has been and still is quantitatively the most prominent; however, many other agents of cancer are known, including viruses, bacteria, inflammatory processes, exposure to a number of chemicals, urban air pollution. It has also been noticed for a long time that cancer can 'run in families': by now we know a few dozens high penetrance cancer genes and many others that have low penetrance. Thus, in the causation of cancer both environmental and hereditary factors are important. Metastasis is defined as the spread of cancer from the initial or primary site to another part of the body, and the process by which such spreading occurs. In classic teaching of pathology there have been three major modes of metastasis:

- 1) by contiguous spread;
- 2) via the lymphatic vessels (or lymphogenous);
- 3) through the bloodstream (or haematogenous).

From the clinical point of view these modes of spread are those that underlie: (i) local recurrence, (ii) involvement of regional lymph nodes, (iii) distant metastasis. Metastatic cancer, especially type (iii), is hard to control and it is exceedingly rare that it can be cured: therefore it is ominous. Here we will concentrate on this type, also because there is evidence that, in order to be able to give distant metastasis, a cancer cell must be special. Indeed, up to 10 characteristic features have been named, which enable a cancer cell to undergo the following five steps: detachment from primary cancer, passage through vessel wall, survival in circulation, extravasation, formation of a colony in foreign territory. None of these steps is trivial: for instance, in the case of epithelial cancers the first two are associated with major morphological and functional changes, which have been described as the epithelial mesenchymal transition (ETM). The last step of metastasis is particularly demanding, because it implies that a small cluster of cancer cells (perhaps even a single cell) is able to give rise to a new tumor: in other words, at least one cell in the cluster must meet the definition of a tumor stem cell.

In brief, the distant haematogenous metastasis is the most striking type both clinically and biologically. In this respect, a remarkable feature is that the metastatic cell must grow in an environment alien to its origin: this has been named in 1889 by Stephen Paget the 'seed and soil' issue, meaning that development of a metastasis depends on a subtle match between the tumor cell and the tissue where it lands. Since that time a large number of experiments, mainly in mice, have shown that the concept is valid: the same type of tumor cell may be able to make metastasis in one tissue and not in another. On the other hand, both in mice and in humans it is well established that cells from a metastatic tumor can further metastasize (*metastasis of metastasis*), indicating that once competence for metastasis is acquired it is a stable quality: in brief, the soil must be permissive, but the ability to make metastasis is in the seed. The most likely explanation is that within the primary tumor some or all of the cells have acquired, through somatic mutation(s), those features that enable them to make metastasis. It is an interesting and as yet unsolved question whether such 'extra' mutations are acquired before or after those that have made the cell neoplastic in the first place.

Thus, formation of a cancer cell and formation of a metastatic cell both depend on somatic mutations. Mutations can be spontaneous, being random errors in DNA replication that occur at every round of cell division: very rarely (estimated frequency of 10^{-7} per gene per cell division), but inevitably. The rate of spontaneous mutations is variable in different individuals, and it is increased, even by orders of magnitude, in those who have defects in DNA repair. Additional mutations can be caused by exposure to physical agents (*e.g.* UV radiation) or to chemical mutagens (*e.g.* alkylating agents used in chemotherapy). Fortunately the large majority of somatic mutations have no significant consequences, and most of them have nothing to do with cancer: however, the more mutations occur, the greater the chance that one or more of them may be oncogenic. Since every cell division

entails a risk of mutation, the total number of mutations that will accumulate can be expressed as $M = mD$, where m is the mutation rate and D is the total number of cell divisions (the same equation applies to a particular tissue or organ or to the entire organism). As just mentioned, m can be affected by environmental or by hereditary factors, and so can D : indeed, in familial adenomatous polyposis there is a marked increase in the proliferation of epithelial cells in the crypts of the colon, and eventually colon cancer will develop; in chronic hepatitis there is active proliferation of liver cells and eventually hepatoma. Cigarette smoking is an extreme example, because the smoke contains mutagens, and at the same time inhaling it stimulates proliferation of bronchial epithelial cells: lung cancer in smokers is mediated by an increase in both μ and D .

In view of the fundamental role of somatic mutations in oncogenesis, and since mutations are stochastic events, chance plays a major role in the origin of cancer. This has been clear for a long time; but the notion of 'cancer by chance' (or by 'bad luck') has come to the fore, even in the lay press, following the paper recently published by Tomasetti & Vogelstein, who have tackled a major issue in oncology: why is cancer so frequent in certain organs or tissues, and so rare in others? In the aim to answer this question, they have extracted from the literature for 31 organs or tissues values of D (the number of divisions of that tissue's stem cells); and they have shown that the frequency of tumors - from the very rare osteosarcoma to the only too common colon cancer - correlates strongly with D over a range of several orders of magnitude. This elegant analysis certainly supports the notion that more cell divisions entail more mutations, and therefore a higher risk of cancer. In this respect, there has been mounting evidence that epigenetic changes can stand in for somatic mutations in oncogenesis. Epigenetic changes too are random events; to some extent they can be induced by the environment and, most important, they are faithfully inherited in somatic cells (not in germ cells): therefore they are potentially susceptible to Darwinian selection just like somatic mutations. As for the ominous cancer offshoot, metastasis, it has been mentioned above that in essence it must be attributed to specific mutations, and in individual cases we begin to understand which ones: therefore the development of metastasis, like that of cancer itself, includes both causal factors and randomness. If a tumor has been present for some time without metastasis, it is likely that its cells do not have metastatic potential, and that this can be acquired only through more mutation(s). The probability that this happens will depend, once again, on m and D , and this has immediate implications with respect to management. For instance, pre-operative chemotherapy of a large primary tumor (so called *neo-adjuvant* therapy) by reducing promptly the tumor mass will produce an abrupt fall in D ; and in general any therapeutic measure that before the tumor is metastatic, limits its size, including incomplete surgical resection, even though not curative, may be beneficial in reducing the risk of metastasis.

In conclusion, random events are key to oncogenesis, but this in no way detracts from the aetiological role of those hereditary and environmental factors that have been mentioned above, and of many others. We cannot control random somatic mutations and epigenetic events: but we can and must do everything in our power

to keep their numbers to a minimum. This is the essence of primary cancer prevention, and the mission of ITT is *To understand, to treat and to prevent cancer at best for all.*

Bibliografia essenziale

1. Adorno M, Cordenonsi M, Montagner M, Dupont S, Wong C, Hann B, Solari A, Bobisse S, Rondina MB, Guzzardo V, et al. A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell*. 2009; 137: 87-98.
2. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*. 1975; 255, 197-200.
3. Hanahan D, Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-674.
4. Luzzatto L. Somatic mutations in cancer development. *Environmental health*. 2011; 10 (Suppl. 1): S12.
5. Luzzatto L, Pandolfi PP. Leukaemia: a genetic disorder of haemopoietic cells. *BMJ*. 1993; 307: 579-580.
6. Nguyen DX, Massague J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet*. 2007; 8: 341-352.
7. Stratton MR. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science (New York, NY)*. 2011; 331: 1553-1558.
8. Timp W, Feinberg AP. Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13: 497-510.
9. Tomasetti C, Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*. 2015; 347: 78-81.
10. Vogelstein B, Kinzler KW. *The Genetic Basis of Human Cancer*, 2 edn (New York, McGraw-Hill). 2002.
11. Wan L, Pantel K, Kang, Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nat Med*. 2013; 19: 1450-1464.
12. Weinberg RA. *The Biology of Cancer* (New York, Garland). 2007.

Liquid biopsy in new drug development: Clinical perspectives and research opportunities

Giuseppe Curigliano

Division of Experimental Therapeutics, Istituto Europeo di Oncologia,
Via Ripamonti, 435 - 20133 Milano, Italia

Introduction

Improvement in the clinical outcome of many cancer types is likely to be achieved by giving patients a drug tailored to the genetic makeup of their tumor. The recent surge in high-throughput sequencing of cancer genomes is delivering more accurate tumor genome information, and it can be anticipated that more predictive biomarkers will be identified and that patients will increasingly be treated by focusing on the genetic architecture of their particular tumor rather than on the tumor's location or histological features.

Circulating cell-free DNA (cf-DNA) represents a non-invasive biomarker, as it can be isolated from human plasma, serum and other body fluids (1). Cf-DNA offer a unique opportunity for serially monitoring tumor genomes in a non-invasive manner. As cf-DNAs is a potential surrogate for the tumor itself, it is often referred to as 'liquid biopsy'.

In 1940 Mandel and Métais observed, for the first time, the presence of cell-free nucleic acid in the blood of healthy individuals (2). Thirty years later, Leon et al. reported elevated levels of cf-DNA in the circulation of cancer patients in comparison with healthy individuals (3) and the data were confirmed in several studies (4-6).

Subsequently, several studies reported a variety of alterations in cf-DNA such as mutations in oncogenes and tumor suppressor genes (7), microsatellite variances (8), and promoter hypermethylation (9). The levels of cf-DNA might also reflect physiological and pathological processes that are not tumour-specific. Increased levels may be found in patients with benign lesions, inflammatory diseases and tissue trauma (10), which makes it difficult to evaluate the extent to which cf-DNA in the circulation of a patient is cancer specific.

In our presentation we will focus on the findings on cf-DNA in breast, lung, colorectal, ovarian and prostate cancers and discuss its relevance and potential use as diagnostic and prognostic marker.

Biology of circulating cell free DNA

The source of cf-DNA is still uncertain. A proportion seems to derive from nucleated blood cells; wild-type DNA has been detected in the plasma of cancer patients as well as in that of healthy controls. In cancer patients a considerable proportion of plasma DNA originates from tumor cells (11). The apoptosis and necrosis of cancer cells in the tumor microenvironment are the possible explanations for the release of the nucleic acids into the blood.

Macrophages usually engulf necrotic and apoptotic cells and then they release the digested DNA into the tissue environment (11). Another hypothesis is that cf-DNA is due to the lyses of circulating cancer cells or micro metastases shed by tumor (11). It was also hypothesized that the tumor actively releases DNA into the bloodstream (11).

The amount of cf-DNA that derives from tumor cells changes owing to the size and the state of the tumor. The proportion of cf-DNA is also conditioned by clearance, degradation and other physiological filtering events of the blood and lymphatic circulation (12). However the concentration of cf-DNA in serum of cancer patients is about 4 times that of healthy controls (13). The size of the DNA released from dead cancer cells varies between small fragments of 70 to 200 base pairs and large fragments of about 21kilobases and it is longer than that of non neoplastic DNA (14).

Breast cancer

Quantitative alterations of circulating DNA

Some quantitative studies reported increased concentrations of circulating DNA in patients with breast cancer when compared to healthy individuals (15-17). Frattini et al. demonstrated that the levels of cf-DNA present in cancer patients constitute a stable parameter over the time and its variations may be correlated with clinical outcome (15). Large individual variations in DNA quantity have been observed among different studies. A comprehensive review reported that the concentration of DNA in the bloodstream of patients with breast cancer (BC) varied from 153 to 549 ng/ml in serum and from 122 to 462 ng/ml in plasma, whereas that of healthy controls ranged between 63-318 and 3-63 ng/ml, respectively (10).

A study by Kohler et al. showed significantly higher levels of cf-DNA in patients with BC in comparison to the patients with benign breast tumors and healthy individuals. This quantitative approach could distinguish between cancer patients and healthy controls with a sensitivity and specificity of 81 and 69% respectively (16). Catarino et al. quantified circulating DNA using real-time PCR (polymerase chain reaction) and showed that the cf-DNA levels were higher before breast surgery respect to post-operative time. This observation proved that cf-DNA may be a useful tool for monitoring disease. In addition, elevated levels of cf-DNA were found to be associated with tumor size, lymph node involvement, histopathological grade, and clinical staging (17). These results were in accordance with previous observations in which the cf-DNA of BC patients also correlated with stage, lymph node metastasis and tumor size (4, 18).

Qualitative alterations of circulating DNA

Several studies reported that a qualitative analysis of specific molecular alterations in isolated DNA from tumoral tissue may mirror cf-DNA (19). The presence of specific mutations helps to differentiate circulating tumor DNA (ct-DNA) from normal cf-DNA. These somatic mutations, commonly single base pair substitutions, are present only in the genomes of cancer cells or pre-cancerous cells and are never present in the DNA of normal cells of the same individual. This juxtaposition confers to ct-DNA elevated specificity as a biomarker.

Four studies, for a total of 371 patients with breast cancer, analyzed the mutations of the tumor suppressor gene *TP53* (20-23).

Great variations in incidence were described in the 4 different studies, ranging from 11 to 73% and 5 to 43% for tumours and circulating DNA, respectively. These great variations should be considered as the consequence of the different methodologies used. Also the *PIK3CA* mutations were detected in the plasma in up to 30% of patients with advanced breast cancer (24-26). In the study of Board and colleagues (24), the *PIK3CA* mutations were detected in cf-DNA of 13/46 (28%) patients with metastatic breast cancer but were not detected in cf-DNA of patients with operable breast cancer. The concordance was 95% for *PIK3CA* mutations found in cf-DNA compared to those found in tumor DNA. These results clearly demonstrated that the detection of cf-DNA mutations is lower in the early stage disease compared to more advanced disease and demonstrated the feasibility of detection of *PIK3CA* mutation in cf-DNA.

A more recent study showed how the analysis of ct-DNA can be integrate in the clinical management of BC patients (27).

Dawson et al. (27) compared the radiographic imaging of tumors with the assay of ct-DNA, CA 15.3 and circulating tumor cells in 30 patients with advanced breast cancer during chemotherapy administration. Ct-DNA was identified in 29 of the 30 women (97%) in whom somatic genomic alterations of *TP53* and *PIK3CA* were detected. This assay proved to have a higher sensitivity for detecting presence of metastatic disease when compared with assays of CA 15-3 or circulating tumor cells. Furthermore, the researchers found that measurement of levels of ct-DNA corresponds both with treatment response and survival: those who survived longer had lower levels of ct-DNA compared with those who survived a shorter period of time. These initial studies involved patients with high tumor burden and it remains to be evaluated if similar sensitivity can be achieved in patients with localized disease.

Additional genetic alterations that are detectable on cf-DNA and are used as biomarkers in cancer include the integrity of non-coding genomic DNA repeat sequences such as *ALU* and *LINE1*. The *ALU* and *LINE1* sequences are involved in various physiological events such as DNA repair, transcription, epigenetic and transposon-based activity (28) and many studies showed their potential prognostic and diagnostic utility (29, 30). The assays are based on the observation that common DNA repeat sequences are preferentially released by tumor cells that are undergoing non apoptotic or necrotic cell death, and these fragments can be between 200bp and 400bp in size (12). The integrity of cf-DNA *ALU* sequences in

blood has been shown to be sensitive for the assessment of the early stage of BC progression, including micrometastasis (30).

Also the microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) of cf-DNA were observed to have potential application in the management of patients with BC (6, 8, 31).

A recent study (31) showed that the detection of DNA losses of the tumor suppressor genes *TIG1*, *PTEN*, *cyclin D2*, *RB1*, and *BRCA1* on cf-DNA was associated with a more aggressive biology of BC. In particular, the detected *cyclin D2* loss was an indicator of an unfavourable prognosis. Thus, the improved detection of cf-DNA might provide clinically relevant information on the variable biology of BC. In addition, LOH was not detected in the healthy subjects whereas it was observable in patients with carcinoma in situ (6) indicating the potential application of this analysis in the screening proceedings.

Recently it has been observed that epigenetic changes are a constant alterations in cancer cells and they have a substantial effect on early carcinogenesis and progression (32). The most examined epigenetic modification is that of DNA methylation. A small set of genes (*APC*, *RASSF1A*, *DAP kinase*) were found hypermethylated in the cf-DNA of patients with in situ carcinoma and with benign lesions (33), suggesting that this approach may be of particular interest in view of early molecular diagnosis. In addition it was seen that hypermethylation of *RASSF1A* and *APC* detected in serum DNA of BC patients was associated with a worse outcome (34). It was seen, also, that the combined assessment of large amounts of free circulating total/methylated DNA and circulating tumor cells was predictive for tumor progression (35). Other studies suggested that the assessment of abnormal methylation in the serum of BC patients may used for monitoring the efficacy of neoadjuvant (36) and adjuvant (37, 38) treatment. Therefore, the detection of methylated cf-DNA represents a promising approach for risk assessment in cancer patients.

Lung cancer

Quantitative alterations of circulating DNA

The quantitative analysis of cf-DNA as tool for the lung cancer monitoring was investigated in many studies. Significantly higher DNA concentrations were detected in the serum/plasma of lung cancer patients compared with healthy controls or patients with benign diseases (39, 40).

In addition higher DNA levels have been reported in the serum of patients with metastatic disease than in patients with non metastatic disease, and it was seen that the cf-DNA levels decreased in 75% of the patients after therapy (3).

Sozzi et al. reported that the cf-DNA concentration was significantly lower in plasma of patients during the follow-up than before surgery and was comparable to the concentration measured in the control group, suggesting that quantification of plasma DNA might represent a new approach to monitor surgical procedures or to assess the efficacy of chemoradiotherapy (40). Plasma DNA concentrations do not uniformly correlate with disease stage and histological subtypes (41). Conflic-

ting data exist regarding to the correlation of cf-DNA with survival. Some authors reported no correlation between plasma DNA concentrations and relapse-free or overall survival (40, 41), whereas other authors reported an association of plasma DNA with survival, lactate dehydrogenase (39, 42), and NSE (42) for a mixed group of SCLC and NSCLC patients (42), and for NSCLC patients only (39).

Qualitative alterations of circulating DNA

Several oncogenes are involved in lung carcinogenesis, such as *Ras*, *c-myc*, tyrosine-kinase receptors (*EGFR*) and *c-erbB2* (*HER2/neu*).

Ramirez et al. reported *K-ras* mutations in 24% of 50 resected NSCLC patients (43) and Kimura et al. detected mutations in 20% of cases (44), whereas Bearzatto et al. did not find *K-ras* mutations in serum (45).

Camps et al. demonstrated that there were no significant differences between the NSCLC patients with *K-ras* mutations in the serum and those with wild-type genotype with respect to baseline patient characteristics, response rates, progression-free survival, or overall survival (46). Instead two other studies found an association between the presence of mutant *K-ras* in serum/plasma of NSCLC patients and survival (43, 44). In a more large study the plasma DNA of 180 lung patients was analysed and it was found a significant correlation between the presence of *K-ras* mutations and poor prognosis (47). The examination of *EGFR* mutations is essential to determine an appropriate lung cancer treatment strategy. Several clinical trials endorsed that the response rate to EGFR-TKI is approximately 70% in patients with *EGFR* activating/sensitive mutations, such as exon 19 deletions or L858R mutation (48). Many studies have focused on detection of mutations in plasma or serum, to avoid the difficulty to obtain tumor specimens.

Kimura et al. analysed the *EGFR* mutation status in tumor and plasma of 42 patients treated with gefitinib. *EGFR* mutations were detected in the tumour samples of eight patients and in the serum samples of seven patients highlighting that *EGFR* mutation status in serum DNA was the same as in tumour samples in almost every patient. In addition, they demonstrated a correlation between the presence of the *EGFR* mutations in plasma DNA and the objective responses to gefitinib and as well as a trend towards increased overall survival in patients treated with gefitinib (49).

The EURTAC trial (50) reported, for patients with *EGFR* mutations detected in serum, an hazard ratio (HR) of 0.25 in favour of erlotinib, which was similar to results from IPASS study (HR 0.29 in favour of gefitinib) (51).

Moreover, in the EURTAC trial, the subgroup analysis of *EGFR* mutations in cf-DNA showed that the presence of *EGFR* mutations was an independent prognostic marker for progression free survival (PFS) (HR 0.43, 95% CI 0.26-0.73; $p=0.002$). The PFS for patients with mutations detected in serum was 10.7 months (95% CI 6.8-15.5) in the erlotinib group compared with 4.2 months (3.2-6.0) in the standard chemotherapy group (HR 0.25, 95% CI 0.12-0.54; $p=0.0002$). PFS for patients in whom mutations were not detected was 12.6 months (95% CI 8.3 - not assessable) in the erlotinib group compared with 6.0 months (4.9-9.0) in the standard chemotherapy group (HR 0.29, 95% CI 0.13-0.63; $p=0.0010$) (50).

Another study demonstrated that the plasma levels of the mutant sequences of *EGFR* correlated with the clinical response and that a decreased concentration was detected in all patients with partial or complete clinical remission, whereas persistence of mutation was observed in the patient with cancer progression (52). These studies suggest that the detection of *EGFR* and other mutations in cf-DNA could be used to monitor response to treatment and to detect the presence of new acquired mutations in plasma or serum.

In 50% of lung cancer patients, acquired resistance to gefitinib or erlotinib, develops through the emergence of *EGFR* T790M variants (53). The mutation at residue 790 increases the affinity of *EGFR* for ATP and so out-competes binding of the inhibitors. These results have been initially obtained examining biopsies from patients who relapsed upon anti-*EGFR* and were later confirmed through the analyses of plasma, providing the first example that resistance to targeted therapies of solid tumors can be detected non-invasively in the blood of patients (54). It was observed also that the MSI, the LOH and the epigenetic alterations of cf-DNA may have a potential application in the management of patients with lung cancer (40, 45, 55-57).

Colorectal cancer

Quantitative alterations of circulating DNA

The detection of circulating DNA has strengthened its role as an additional tool for the management of patients with colorectal cancer (CRC).

A study by Frattini et al. suggested that the quantification of plasma tumor DNA might be useful for monitoring patients with colorectal cancer and, prospectively, for recognizing high-risk individuals (58). The data of this study showed that the plasma tumor DNA levels were significantly higher in patients with CRC, they decreased progressively in the follow up period in tumor-free patients and instead they increased in patients with recurrence or metastasis (58). These results are in line with the findings of another study which demonstrated that serum DNA levels were significantly increased in stage IV CRC patients and they fluctuated during chemotherapy (59).

A study performed in a cohort of patients with CRC undergoing resection with curative intent showed that it is possible to define a unique set of molecular probes for each patient. These probes can then be exploited to quantify tumoral DNA after surgery. The patients were subsequently followed over the course of 2-5 years. In this study, ct-DNA was shown to be sufficiently sensitive to detect minimal residual disease after surgical resection (60).

Other studies reported higher levels of circulating DNA in CRC patients than in healthy individuals, but a correlation was not demonstrated between the levels of circulating DNA and the size and site of the tumor and the clinical course of disease (61, 62). Another study compared the sensitivity and specificity of cf-DNA with that of conventional serum marker carcinoembryonic antigen (CEA) and it was shown that cf-DNA, when used in combination with CEA, represents a potentially useful tool for the diagnosis of early stage CRC (63).

Qualitative alterations of circulating DNA

Although anti-EGFR therapy has established efficacy in metastatic colorectal cancer (MCRC), only 10-20% of unselected patients respond (64). This is partly due to *KRAS* mutation, which is currently assessed in the primary tumor. Many studies assessed mutation status in circulating tumor DNA, with the aim to improve patient selection (65-68). In the study published by Bazan et al., it was shown that the preoperative detection of mutant *KRAS* and *TP53* in the serum of CRC patients undergoing resective surgery, was predictive of disease recurrence (65). In another study it was detected the amount of circulating tumor DNA in 18 MCRC patients who underwent surgical resection of their metastases and it was observed that the detection of circulating mutant DNA after surgery was highly predictive of disease recurrence (66). These results were agree with those of a previous study in which the probability to have a curative surgical resection has been shown to be lower in MCRC patients with measurable *KRAS* mutation in their serum (67).

Lefebure et al. detected, in the serum of unresectable MCRC, *KRAS* mutation and *RASSF2A* methylation and they observed that the presence of circulating mutant DNA was predictive of clinical outcome (68). In a recent study was demonstrated the clinical utility of multiplex digital PCR to screen for multiple *KRAS* mutations in the plasma samples of MCRC patients (69) suggesting that the “liquid biopsy” is a feasible alternative to a solid tissue biopsy for identifying specific mutations. The principal limitations of therapies that target the extracellular domain of *EGFR* is the acquisition of secondary drug resistance. In a recent study was investigated weather the detection of *KRAS* mutant alleles, in the plasma of patients become refractory to anti-EGFR therapies, may allow the early identification of individuals at risk of develop drug resistance before radiographic documentation of disease progression (70).

It was found that *KRAS* mutant alleles were detectable in the blood of cetuximab treated patients as early as 10 months before the documentation of disease progression by radiologic assessment. Of relevance, the discovery of the mechanisms of resistance to the anti EGFR antibodies therapies in CRC was simultaneously accomplished in tissue and liquid biopsy. Another noteworthy aspect of this study was the emergence of multiple different resistance mutations in the same patient (70). Overall these results indicate that the emergence of *KRAS* mutant clones can be detected months before radiographic progression and could allow an early initiation of combination therapies that may delay or prevent disease progression. DNA hypermethylation in serum of colorectal cancer patients has been reported to have prognostic and predictive value (61, 71-73) and together with the assessment of DNA integrity (74) represents another promising tool for risk assessment.

Prostate cancer

Quantitative alterations of circulating DNA

We need specific, sensitive and non invasive biomarkers for prostate cancer (PCA) diagnosis that could be used in addition to prostate-specific antigen (PSA) serial

evaluations. The measurement of ct-DNA as a marker of tumor dynamics over conventional PSA or even imaging studies has been actively explored.

Two studies failed to demonstrate significant differences of ct-DNA between patients with PCA and non malignant prostate disease (75, 76). In the first study (75) the failure could be due to the use of a less sensitive fluorometric assay, whereas other studies used a real time PCR and detected higher DNA levels in PCA patients than in non malignant prostate disease patients (77, 78). Cf-DNA levels were correlated with pathological stage (78), Gleason score, surgical margin status and extraprostatic extension (79). In addition it was showed that cf-DNA increased with diagnosis of metastasis and was predictive of survival in patients with metastatic prostate cancer (75, 79, 80).

Qualitative alterations of circulating DNA

One of the earliest genetic alterations during prostate carcinogenesis seems to be *GSTP1* CpG island hypermethylation. A recent meta-analysis of 22 manuscripts indicated good specificity (89%) but modest sensitivity (52%) of *GSTP1* differential methylation for PCA screening (81). The detection of hypermethylated DNA is also an adverse prognostic marker: *RASSF1A*, *RARB2*, and *GSTP1* hypermethylation were correlated with the Gleason score and the serum PSA (82). *RARB2* and *GSTP1* methylation were also correlated with the AJCC stage (82). *GSTP1* hypermethylation was the strongest predictor of PSA recurrence following radical prostatectomy (83) and it was correlated with the Gleason score and the extent of metastasis in patients with hormone-refractory PCA (84).

Also the analysis of the fragmentation patterns of cf-DNA provide useful information in the management of prostate cancer. It was seen that the DNA integrity was higher in PCA patients than in controls (85). Ellinger et al. demonstrated that the DNA integrity was a predictor of PSA recurrence following radical prostatectomy and that the DNA integrity may allow to recognize PCA patients and benign prostate hyperplasia patients with a specificity of 81% and a sensitivity of 68% (77).

Ovarian cancer

Quantitative alterations of circulating DNA

Ovarian cancer is the fifth leading cause of cancer death (86) in women.

The cf-DNA has been investigated as novel biomarker for diagnosis, prediction and monitoring of therapeutic response in ovarian cancer.

Kamat et al. showed that the levels of cf-DNA were elevated in patients with invasive epithelial ovarian cancer compare to the controls emphasizing the potential role of cf-DNA as an additional non invasive technique to identify women with malignant ovarian disease (87). These findings were not consistent with a subsequent study showing that there was no statistical difference in the levels of cf-DNA between patients with ovarian cancer and patients with benign ovarian tumors (88). One explanation for these results is the elevation of cf-DNA by other causes, including variation in the source, in fact cf-DNA in serum is reported to be higher than in plasma.

In another study it was demonstrated also the utility of cf-DNA as surrogate bio-

marker of therapeutic response, using an orthotopic ovarian cancer model (89). It was seen that cf-DNA correlated with tumor burden and the levels declined with chemotherapy. Kamat et al. investigated also the role of pre-operative total plasma cf-DNA levels in predicting clinical outcome in patients with ovarian cancer (90). The cf-DNA levels were significantly higher in patients with invasive cancer compared with women with benign ovarian tumors and controls and high cf-DNA levels correlated with aggressive phenotypic features such as high stage and high grade. In addition it was seen that cf-DNA >22.000 GE/ml was an independent predictor of poor outcome in patients with ovarian cancer, and was superior to CA 125 in predicting mortality (90). Also another study reported a significant difference between the presence of cf-DNA in patients with high grade serous cancer compared with other histological subtypes (91).

Wimberger et al. observed a significant relationship between residual tumor load of >1 cm after primary surgery and serum DNA levels, and both parameters were associated with a higher risk of relapse and poorer overall survival (92).

Qualitative alterations of circulating DNA

As the measurement of cf-DNA levels has some limitations as screening marker for ovarian cancer, in last years the research has focused on findings of specific alterations in cf-DNA, such as methylation or microsatellite alterations and mutation of tumor suppressor genes. In early detection of ovarian cancer, Liggett et al. found that methylation of *RASSF1A* and *PGR-PROX* in serum may be a useful biomarker to differentiate between benign and malignant ovarian tumors with a specificity of 73.3% and a sensitivity of 80.0% (93). Another study showed that hypermethylation of at least one of six gene promoters, including *RASSF1A*, *BRCA1*, *APC*, *DAPK* and *CDKN2A*, was detected in the serum of early-stage ovarian cancer patients with 82% sensitivity; in contrast it was not reported hypermethylation in non neoplastic tissue, peritoneal fluid, or serum from 40 control women (100% specificity) (94). Abnormal methylation of the *HMLH1* promoter has been demonstrated to correlate with poor survival after chemotherapy (95) providing the possibility to identify those patients who relapse after standard chemotherapy and who would be suitable for novel epigenetic therapies. In a small study, tumor specific mutated *p53* DNA levels were detected in the peritoneal fluid of 28 of 30 (93%) women with intraperitoneal ovarian cancer, including all 6 cases with non malignant cells identified on cytopathology (96).

Therefore the identification of cf-DNA in peritoneal fluid compares favourably to cytopathologic evaluation, and warrants further investigation as a diagnostic marker. In ovarian cancer patients were investigated also the MSI and the DNA integrity with promising results (97, 98).

Conclusion and Perspectives

The detection of cf-DNA provides new opportunities for management of cancer patients adding a new useful tool for diagnosis, staging and prognosis. It offers a new type of very specific biomarker that allow to identify the mutations accu-

mulated from each tumor and to monitor the tumor burden and the response to treatment using a minimally invasive blood analyses (Table 1).

In addition cf-DNA may have particular utility in the identification of mutations associated with acquired drug resistance in advanced cancers allowing to avoid repeat biopsies and to provide an evaluation of clonal genomic evolution associated with treatment response and resistance (70, 99).

There are, however, several questions to be answered. One crucial factor in evaluating cf-DNA is the standardization of assays and the definition of the optimal sampling specimen (serum or plasma) to obtain data more consistent and comparative between different laboratories. Actually there are different procedures both in the pre-analytical phases (blood collection, processing, storage, baseline of patients), in DNA extraction, in quantification and analysis after the DNA extraction. These variables are critical and need to be standardized for consensus analysis and reporting. Despite these technical limitations, “liquid biopsy” may provide a unique opportunity in the field of clinical cancer research and have been already embedded in the design of several clinical trials (Table 2). Correlation of qualitative and quantitative analysis of circulating DNA with pathological response to neoadjuvant treatment in solid tumors may anticipate potential resistance to cytotoxic and biological agents during preoperative therapy. In the era of next generation sequencing detection of specific DNA mutations predicting response or resistance to targeted agents may anticipate switch to non cross-resistant therapies. The identification of circulating DNA in patients with breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy may predict pathological residual disease that

Tab. 1 - Detection of cf-DNA and its alterations in patients with solid tumors.

Cf-DNA alterations	Molecular alterations				
	Breast	Lung	Colorectal	Prostate	Ovary
<i>Mutation</i>	TP53 (28-31, 37) PIK3CA (32-34, 37)	RAS (63-67) EGFR (72-77)	RAS, TP53, APC (10, 84, 90, 92-94)	-	TP53 (127)
<i>DNA integrity</i>	Serum DNA integrity (40, 41)	-	Serum DNA integrity (100)	Serum DNA integrity (102, 115)	Serum DNA integrity (129)
<i>Microsatellite alterations</i>	LOH and MSI (9, 11, 42, 43)	LOH and MSI (8, 78)	-	LOH and MSI (110, 112)	LOH (128)
<i>Methylation</i>	RASSF1A, APC, DAPK, ESR1, BRCA1, MGMT, GSTP1, Stratifin, MDR1, HSD17B4, HIC1, NEUROD1 (48-53)	P16 (65, 79) 14-3-3sigma (80)	SEPT9, ALX4, HLTF, HPP1 (84, 95-99)	GSTP1, RASSF1A, RARB2, AR (111-114)	RASSF1A, PGR PROX, BRCA1, APC, DAPK, CDKN2A, HMLH1 (124, 126)

LOH: Loss of heterozygosity MSI: Microsatellite instability.

Tab. 2 - Ongoing clinical trials that study cf-DNA in solid tumors with therapeutic intervention.

Clinical Trial	Status	Therapeutic Intervention	Setting
NCT00899548 (*)	Recruiting	Predict Response After Systemic Therapy	MBC
NCT01198743 (*)	Recruiting	Validate prognostic value of cf-DNA	Stage II-III CRC
NCT00977457 (*)	Recruiting	Predict recurrence	Prostate Cancer Undergoing Surgery
NCT01617915 (*)	Recruiting	Correlate cf-DNA with response to neoadjuvant CT	BC candidate to neoadjuvant CT
NCT01776684 (*)	Recruiting	Evaluation of EGFR TKI Resistance Mechanism	NSCLC
NCT01836640 (*)	Not yet recruiting	Evaluate cf-DNA as a Surrogate for Tumor Biopsy to Identify Tumor Genetic Alterations	MBC

(*)<http://clinicaltrials.gov/>

CT: chemotherapy; CRC: Colorectal Cancers; cf-DNA: Circulating cell-free DNA; MBC: Metastatic Breast Cancer; NSCLC: Non small Cell Lung Cancer; BC: breast cancer; EGFR TKI : Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor.

correlate with poor prognosis in triple negative and HER2 positive breast cancer. Another opportunity to explore the role of cf- DNA is to study the “tumor dormancy” phenomenon. Analysis of cf-DNA in patients in follow up for previous diagnosis of breast cancer has provided some hints regarding tumour dormancy. Specifically identification of cf-DNA might be employed to monitor patients with breast cancer without clinically detectable disease (100) comparing the genomic profiles of germline DNA, cf-DNA and tumour DNA as defined by single nucleotide polymorphism arrays. It is essential to highlight that plasma cf-DNA and primary tumour tissue showed some similarities regarding specific tumour copy-number variations as observed by DNA amplification at several chromosome arms (100). The biological significance of cf-DNA in patients with no evidence of clinical disease is presently unclear; further studies are required to determine whether this approach is sufficiently sensitive as a screening tool or for identification of early relapse. More importantly, the process of identifying specific DNA mutations for each patient’s cancer is a laborious process that is currently too time-intensive and costly for more widespread use. Future development will have to provide a cost effective analysis mainly identifying the genes known to be recurrently mutated in each tumor. Therefore, developing standardized methodologies for cf-DNA analyses and validation in large prospective clinical studies is mandatory to implement the ‘liquid biopsy’ approach in the clinical management of cancer patients.

References

1. Utting M, Werner W, Dahse R, et al. Microsatellite analysis of free tumor DNA in urine, serum, and plasma of patients. A minimally invasive method for the detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 35-40.

2. Mandel PM. Les acides nucleiques du plasma sanguine chez l'homme. *CR Acad Sci Paris*. 1940; 142: 241-253.
3. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977; 37: 646-650.
4. Zhong XY, Ladewig A, Schmid S, et al. Elevated level of cell-free plasma DNA is associated with breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2007; 276: 327-331.
5. Sozzi G, Conte D, Leon M, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 3902-3908.
6. Chen X, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, et al. Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1999; 5: 2297-2303.
7. Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, et al. Molecular detection of APC, K-RAS, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg*. 2004; 28: 721-726.
8. Shaw JA, Smith BM, Walsh T, et al. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 1119-1124.
9. Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 1219-1225.
10. Fleischhacker, M. & Schmidt, B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-a survey. *Biochim. Biophys; Acta*. 2007; 1775: 181-232.
11. Stroun M., Maurice P, Vasioukhin V, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann. N. Y Acad. Sci*. 2000; 906: 161-168.
12. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11: 426-437.
13. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, et al. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer*. 1983; 51: 2116-2120.
14. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001; 61: 1659-1665.
15. Frattini M, Balestra D, Verderio P, et al. Reproducibility of a semiquantitative measurement of circulating DNA in plasma from neoplastic patients. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 3163-3164.
16. Kohler C, Radpour R, Barekati Z, et al. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer*. 2009; 8: 105.
17. Catarino R, Ferreira M, Rodrigues H, et al. Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *DNA Cell Biol*. 2008; 27: 415-421.
18. Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, et al. p53 mutation in plasma DNA and its prognostic value in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2001; 7: 2222-2227.
19. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994; 3: 67-71.

20. Di GH, Liu G, Wu J, et al. Peripheral blood mutated p53 DNA and its clinical value in human breast cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2003; 25: 137-140.
21. Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, et al. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations. *Cancer Res*. 1999; 59: 3251-3256.
22. Silva JM, Garcia JM, Dominguez G, et al. Persistence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients after mastectomy. *Ann Surg Oncol*. 2002; 9: 71-76.
23. Garcia JM, Garcia V, Silva J, et al. Extracellular tumor DNA in plasma and overall survival in breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006; 45: 692-701.
24. Board RE, Wardley AM, Dixon JM, et al. Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 120: 461-467.
25. Angenendt P, David K, Juhl H, et al. Detection of phosphoinositide-3-kinase, catalytic, and alpha polypeptide (PIK3CA) mutations in matched tissue and plasma samples from with metastatic breast cancer (abstract). *J. Clin. Oncol*. 2010; 28 (Suppl.) a10502.
26. Higgins M J, Jelovac D, Barnathan E, et al. Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin. Cancer Res*. 2012; 18: 3462-3469.
27. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2013; 368: 1199-209.
28. Bennett EA, Keller H, Mills RE, et al. Active Alu retrotransposons in the human genome. *Genome Res*. 2008; 18: 1875-1883.
29. Sunami E, Vu AT, Nguyen SL, et al. Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer. *Ann. N. Y Acad. Sci*. 2008; 1137: 171-174.
30. Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J. Clin. Oncol*. 2006; 24: 4270-4276.
31. Schwarzenbach H, Eichelsner C, Kropidlowski J, et al. Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression. *Clin Cancer Res*. 2012; 18: 5719-5730.
32. Dehan P, Kustermans G, Guenin S, et al. DNA methylation and cancer diagnosis: New methods and applications. *Expert Rev Mol Diagn*. 2009; 9: 651-657.
33. Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez de Caceres I, et al. Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 6189-6193.
34. Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res*. 2003; 63: 7641-7645.

35. Van der Auwera I, Elst HJ, Van Laere SJ, et al. The presence of circulating total DNA and methylated genes is associated with circulating tumour cells in blood from breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2009; 100: 1277-1286.
36. Sharma G, Mirza S, Parshad R, et al. DNA methylation of circulating DNA: a marker for monitoring efficacy of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Tumour Biol*. 2012; 33: 1837-1843.
37. Fiegl H, Jones A, Hauser-Kronberger C, et al. Methylated NEUROD1 promoter is a marker for chemosensitivity in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 3494-3502.
38. Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, et al. Circulating tumour specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res*. 2005; 65: 1141-1145.
39. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, et al. Circulating deoxyribonucleic acid as a prognostic marker in non-small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 4157-4164.
40. Sozzi G, Conte D, Mariani L, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res*. 2001; 61: 4675-4678.
41. Beau-Faller M, Gaub MP, Schneider A, et al. Plasma DNA microsatellite panel as sensitive and tumor-specific marker in lung cancer Patients. *Int J Cancer*. 2003; 105: 361-370.
42. Fournie GJ, Courtin JP, Laval F. Plasma DNA as a marker of cancerous cell death: investigation in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumour. *Cancer Lett*. 1995; 2: 221-227.
43. Ramirez JL, Sarries C, de Castro PL, et al. Methylation patterns and K-ras mutations in tumor and paired serum of resected non-small-cell lung cancer patients. *Cancer Lett*. 2003; 193: 207-216.
44. Kimura T, Holland WS, Kawaguchi T, et al. Mutant DNA in plasma of lung cancer patients: potential for monitoring response to therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1022: 55-60.
45. Bearzatto A, Conte D, Frattini M, et al. p16(INK4A) hypermethylation detected by fluorescent methylation-specific PCR in plasmas from nonsmall cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2002; 8: 3782-3787.
46. Camps C, Sirera R, Bremnes R, et al. Is there a prognostic role of K-ras point mutations in the serum of patients with advanced non-small cell lung cancer? *Lung Cancer*. 2005; 50: 339-346.
47. Gautschi O, Huegli B, Ziegler A, et al. Origin and prognostic value of circulating KRAS mutations in lung cancer patients. *Cancer Lett*. 2007; 254: 265-273.
48. Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Spanish Lung Cancer Group. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361: 958-967.
49. Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer*. 2007; 97: 778-784.

50. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13: 239-246.
51. Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012; 7: 115-121.
52. Young TK, Chan KC, Mok TS, et al. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 2076-2084.
53. Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clin Cancer Res.* 2011; 17: 1616-1622.
54. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2011; 17: 7808-78015.
55. Bruhn N, Beinert T, Oehm C et al. Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor cells and from plasma DNA of patients with lung cancer. *Ann. N. Y Acad. Sci.* 2000; 906: 72-82.
56. Liu Y, An Q, Li L, et al. Hypermethylation of p16INK4 α in Chinese lung cancer patients: biological and clinical implications. *Carcinogenesis.* 2003; 24: 1897-1901.
57. Ramirez JL, Rosell R, Taron M, et al. 14-3-3sigma methylation in pretreatment serum circulating DNA of cisplatin-plus-gemcitabine-treated advanced non-small-cell lung cancer patients predicts survival: The Spanish Lung Cancer Group. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 9105-9112.
58. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, et al. Quantitative analysis of plasma DNA in colorectal cancer patients: a novel prognostic tool. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006; 1075: 185-190.
59. Schwarzenbach H, Stoecklacher J, Pantel K, et al. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1137: 190-196.
60. Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 16368-16373. Epub Oct 28.
61. Lecomte T, Berger A, Zinzindohoue F, et al. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in serum of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer.* 2002; 100: 542-548.
62. Boni L, Cassinotti E, Canziani M, et al. Free circulating DNA as possible tumor marker in colorectal cancer. *Surg Oncol.* 2007; 16: 29-31.
63. Flamini E, Mercatali L, Nanni O, et al. Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: an important combination for diagnosis of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 6985-6988.

64. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004; 351: 337-345.
65. Bazan V, Bruno L, Augello C, et al. Molecular detection of TP53, KRAS and p16 promoter methylation in serum of patients with colorectal cancer and its association with prognosis. Results of a 3 years GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. *Ann Oncol.* 2006; 17: 784-790.
66. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008; 14: 985-990.
67. Trevisiol C, Di Fabio F, Nascimbeni R, et al. Prognostic value of circulating KRAS2 gene mutations in colorectal cancer with distant metastases. *Int J Biol Markers.* 2006; 21: 223-228.
68. Lefebure B, Charbonnier F, Di Fiore F, et al. Prognostic value of circulating mutant DNA in unresectable metastatic colorectal cancer. *Ann Surg.* 2010; 251: 275-280.
69. Taly V, Pekin D, Benhaim L, et al. Multiplex Picodroplet Digital PCR to Detect KRAS Mutations in Circulating DNA from the Plasma of Colorectal Cancer Patients. *Clin Chem.* 2013; Aug 12. (Epub ahead of print).
70. Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature.* 2012; 486: 532-536.
71. deVos T, Tetzner R, Model F, et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin. Chem.* 2009; 55: 1337-1346.
72. He Q, Chen HY, Bai EQ, et al. Development of a multiplex MethyLight assay for the detection of multigene methylation in human colorectal cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2010; 202: 1-10.
73. Philipp A, Stieber P, Nagel D, et al. Prognostic role of methylated free circulating DNA in colorectal cancer. *Int. J. Cancer.* 2012; 131: 2308-2319.
74. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin. Chem.* 2006; 52: 1062-1069.
75. Jung K, Stephan C, Lewandowski M, et al. Increased cell-free DNA in plasma of patients with metastatic spread in prostate cancer. *Cancer Lett.* 2004; 205: 173-180.
76. Boddy JL, Gal S, Malone PR, et al. Prospective study of quantitation of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 1394-1399.
77. Ellinger J, Bastian PJ, Haan KI, et al. Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators. *Int J Cancer;* 2008; 122:138-143.
78. Altamari A, Grigioni AD, Benedettini E, et al. Diagnostic role of circulating free plasma DNA detection in patients with localized prostate cancer. *Am J Clin Pathol.* 2008; 129: 756-762.
79. Bastian PJ, Palapattu GS, Yegnasubramanian S, et al. Prognostic value of preoperative serum cell-free circulating DNA in men with prostate cancer

- undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 5361-5367.
80. Schwarzenbach H, Alix-Panabieres C, Muller I, et al. Cell-free Tumor DNA in Blood Plasma As a Marker for Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 1032-1038.
 81. Wu T, Giovannucci E, Welge J, et al. Measurement of GSTP1 promoter methylation in body fluids may complement PSA screening: a meta-analysis. *Br. J. Cancer.* 2011; 105: 65-73.
 82. Sunami E, Shinozaki M, Higanos CS, et al. Multimarker circulating DNA assay for assessing blood of prostate cancer patients. *Clin Chem.* 2009; 55: 559-567.
 83. Bastian PJ, Palapattu GS, Lin X, et al. Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and the risk of early prostate specific antigen recurrence following radical prostatectomy. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 4037-4043.
 84. Reibenwein J, Pils D, Horak P, et al. Promoter hypermethylation of GSTP1, AR, and 14-3-3-sigma in serum of prostate cancer patients and its clinical relevance. *Prostate.* 2007; 67: 427-432.
 85. Hanley R, Rieger-Christ KM, Canes D, et al. DNA integrity assay: A plasma-based screening tool for the detection of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 2: 4569-4574.
 86. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008; 58: 71-96.
 87. Kamat AA, Sood AK, Dang D, et al. Quantification of total plasma cell-free DNA in ovarian cancer using real-time PCR. *Ann NY Acad Sci.* 2006; 1075: 230-234.
 88. No JH, Kim K, Park KH, et al. Cell-free DNA level as a prognostic biomarker for epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2012; 32: 3467-3471.
 89. Kamat AA, Bischoff FZ, Dang D, et al. Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2006; 5: 1369-1374.
 90. Kamat AA, Baldwin M, Urbauer D, et al. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker. *Cancer.* 2010; 116: 1918-1925.
 91. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Kinalski M, et al. Circulating free DNA and p53 antibodies in plasma of patients with ovarian epithelial cancers. *Ann Oncol.* 2011; 22: 1133-1140.
 92. Wimberger P, Roth C, Pantel K, et al. Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients. *Int J Cancer.* 2011; 128: 2572-2580.
 93. Liggett TE, Melnikov A, Yi Q, et al. Distinctive DNA methylation patterns of cell-free plasma DNA in women with malignant ovarian tumors. *Gynecol Oncol.* 2011; 120: 113-120.
 94. Ibanez de Caceres I, Battagli C, Esteller M, et al. Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Cancer Res.* 2004; 64: 6476-6481.

95. Gifford G, Paul J, Vasey PA, et al. The acquisition of hMLH1 methylation in plasma DNA after chemotherapy predicts poor survival for ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 4420-4426.
96. Swisher EM, Wollan M, Mahtani SM, et al. Tumor-specific p53 sequences in blood and peritoneal fluid of women with epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193: 662-667.
97. Kuhlmann JD, Schwarzenbach H, Wimberger P et al. LOH at 6q and 10q in fractionated circulating DNA of ovarian cancer patients is predictive for tumor cell spread and overall survival. *BMC Cancer.* 2012; 12: 325.
98. Salani R, Davidson B, Fiegl M, et al. Measurement of cyclin E genomic copy number and strand length in cell-free DNA distinguish malignant versus benign effusions. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 5805-5809.
99. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature.* 2013; 497: 108-112.
100. Shaw JA, Page K, Blighe K, et al. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. *Genome Res.* 2012; 22: 220-231.

Circulating and tissue mesenchymal stem cells in organ homeostasis and repair: an open debate

Angelo Parini

INSERM U1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases - I2MC, Toulouse, France

Nel corso degli ultimi anni, pochi campi di ricerca hanno suscitato un interesse paragonabile a quello delle cellule staminali mesenchimali. Questo interesse crescente è legato in parte all'identificazione di queste cellule nel midollo osseo adulto (Fig. 1) e alla dimostrazione del loro ruolo potenziale nella terapia cellulare. Classicamente le cellule mesenchimali sono localizzate nell'embrione e, più particolarmente, nei somiti, strutture metameriche localizzate nella parte mediana del mesoderma. Verso la fine della quarta settimana dello sviluppo embrionario, le cellule della parte ventrale-mediana dei somiti (sclerotomo), acquisiscono un

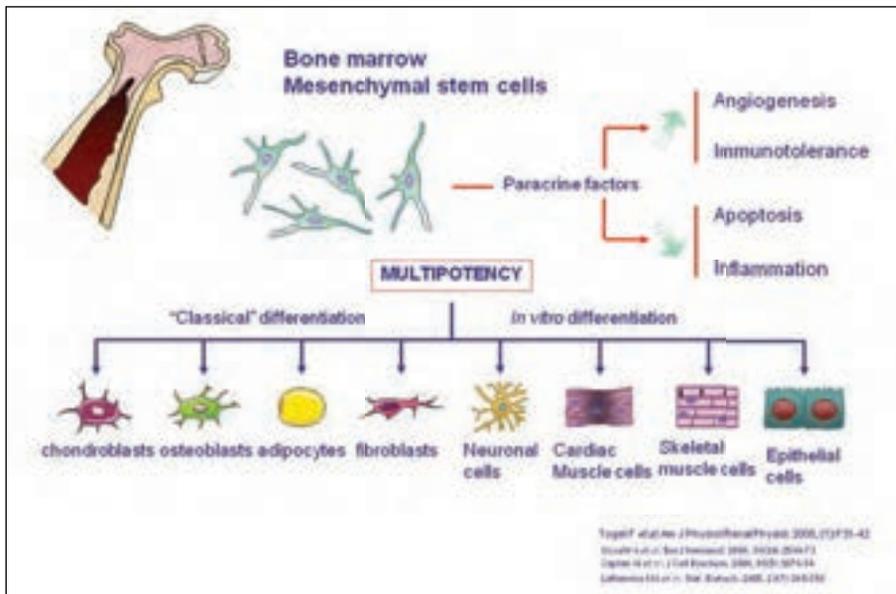


Fig. 1

aspetto polimorfo e cominciano a produrre la matrice di un tessuto connettivo lasso chiamato mesenchima. Le cellule sono definite come «mesenchimali» multipotenti e hanno un potenziale di differenziazione in fibroblasti, condroblasti, osteoblasti, cellule muscolari lisce e cellule endoteliali.

Le cellule mesenchimali del midollo osseo (CMM) hanno delle caratteristiche morfologiche e un potenziale di differenziazione simile a quelle delle cellule mesenchimali embrionarie. In termine di potenziale di differenziazione, sulla base dei criteri classici dello sviluppo embrionario, le CMM sono delle cellule multipotenti all'origine dei fibroblasti, condroblasti e osteoblasti. In vitro, le CMM hanno dimostrato un potenziale di differenziazione in vari tipi cellulari, inclusi i cardiomiociti, ma queste proprietà non sono state confermate in vivo. Una delle caratteristiche più importanti delle CMM consiste nella loro capacità di produrre differenti fattori paracrini a attività trofica, immunomodulatrice, angiogenica, antiapoptotica e chemotattica (Fig. 1). Nel midollo osseo, è stato dimostrato che alcuni di questi fattori hanno un ruolo chiave nella regolazione dell'ematopoiesi. Tali attività paracrine sembrano essere particolarmente importanti per l'utilizzo delle CMM nella terapia cellulare. Le CMM sono state identificate e caratterizzate sulla base di tre criteri principali: l'aderenza al supporto in plastica, l'espressione di marcatori caratteristici sulla membrana plasmatica (positive per CD105 (endoglin, SH2), CD73 (ecto-50-nucleotidase) e CD90 (Thy1) e negative per i marcatori della linea ematopoietica CD45, CD19, CD79, CD14 or CD11b, e endoteliale CD31) e per la capacità di differenziazione tipica delle cellule mesenchimali dello sclerotomo embrionario. Anche se all'origine queste cellule sono state definite come cellule staminali, la loro capacità di autorinnovarsi (criterio indispensabile per definire le cellule staminali) non è stata determinata con chiarezza. Per queste

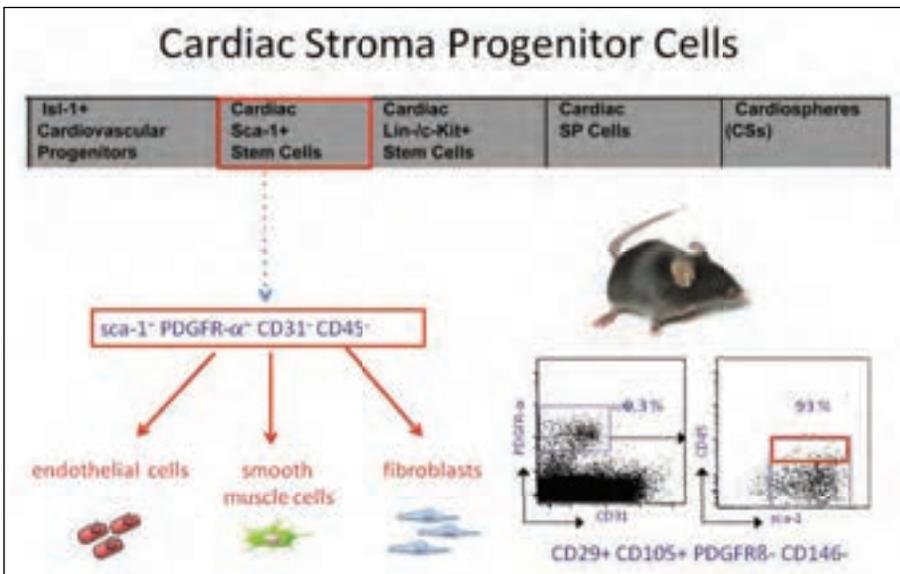


Fig. 2

ragioni, è più opportuno definire le cellule mesenchimali adulte come «cellule mesenchimali multipotenti dello stroma» (CMMS).

Queste cellule non sono localizzate esclusivamente nel midollo osseo ma si trovano anche nello stroma di numerosi tessuti come il tessuto adiposo, la placenta, il cuore (Fig. 2) e il rene. Anche se queste cellule presentano delle analogie con quelle dello stroma del midollo osseo (in particolare, l'aderenza su supporto in plastica e i marcatori della membrana plasmatica), esse presentano delle differenze per quel che riguarda il loro potenziale di differenziazione in vitro. In effetti, nei tessuti differenti dal midollo osseo, le CMMS possono differenziarsi in cellule figlie tipiche delle linee mesoblastiche ma differenti dai fibroblasti, osteoblasti e condroblasti. Sulla base delle analogie fra le CMMS dei differenti tessuti, è stata formulata l'ipotesi che le CMMS del midollo osseo possano passare nella circolazione sanguigna e colonizzare l'insieme dello stroma dei differenti organi. Tuttavia, tale ipotesi è contestata. In effetti, se in differenti modelli murini è stato possibile isolare delle cellule con alcune caratteristiche delle CMMS a partire dal sangue, nell'uomo tali cellule non sembrano essere presenti. Questi risultati suggeriscono che le CMMS nei differenti tessuti dell'organismo sono indipendenti dalle cellule del midollo osseo e derivano direttamente da zone specifiche del mesoderma embrionario. L'insieme dei risultati che abbiamo commentato fino a questo punto dell'articolo dimostra che le CMMS sono molto eterogenee e che i primi criteri utilizzati per definire tali cellule sono oggi limitanti e sorpassati. Tali criteri devono essere aggiornati ed alcuni possono essere riassunti nel modo seguente:

- come citato in precedenza, per le CMMS il termine "staminali" dovrebbe essere riservato alle cellule stromali che posseggono la capacità di autorinnovarsi e di differenziarsi in vari tipi di cellule della linea mesoblastica. Tali caratteristiche sono limitate a una percentuale veramente esigua delle CMMS;
- dovrebbe essere sistematicamente precisato se i marcatori di membrana utilizzati per caratterizzare le CMMS sono stati definiti su cellule isolate o dopo coltura cellulare. In effetti, il profilo dei marcatori può cambiare dopo l'aderenza delle cellule e la coltura;
- le caratteristiche fenotipiche e funzionali delle CMMS dovrebbero essere definite per ogni organo senza generalizzare tali caratteristiche all'insieme di queste cellule nell'organismo;
- l'analisi del trascrittoma, del proteoma e del secretoma dovrà essere utilizzato per completare la caratterizzazione delle CMMS nei differenti tessuti.

Anche se l'identificazione e la caratterizzazione funzionale delle CMMS nell'adulto devono ancora essere definite con precisione, è innegabile che queste cellule siano veramente interessanti in terapia. In effetti, numerosissimi studi hanno dimostrato che la somministrazione di queste cellule induce un miglioramento significativo in differenti patologie.

Il nostro gruppo, ha utilizzato le CMMS del midollo osseo per la terapia cellulare dell'insufficienza cardiaca post-ischemica. I nostri esperimenti nel ratto, hanno permesso di definire una tecnica di preconditionamento che ha permesso di aumentare la sopravvivenza e l'efficacia delle CMMS del midollo osseo iniettate

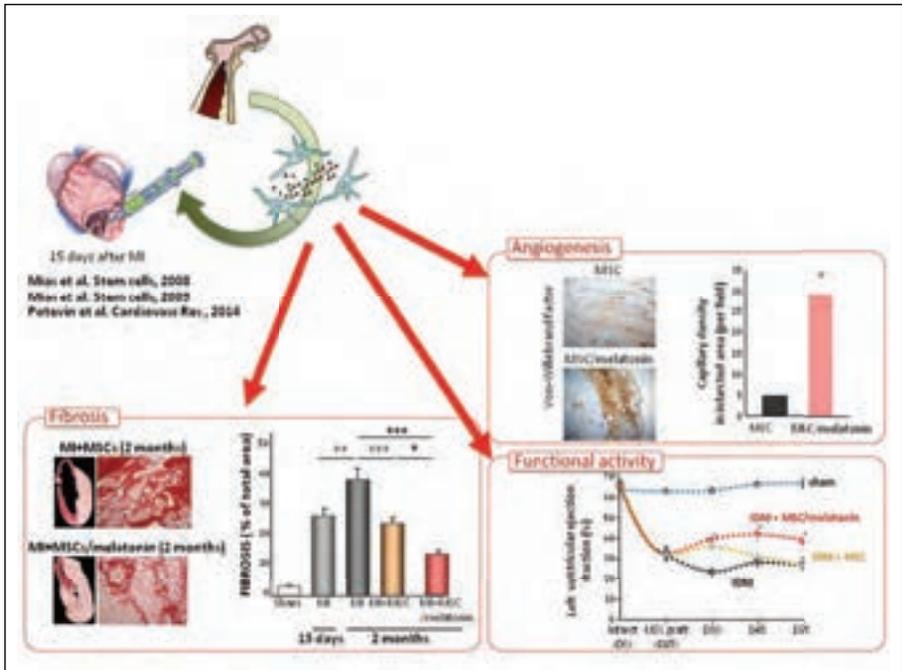


Fig. 3



Fig. 4

nel miocardio nel corso dell'insufficienza cardiaca. Questi studi hanno anche dimostrato che gli effetti benefici della terapia cellulare sono dovuti soprattutto alla secrezione di diversi fattori paracrini da parte delle CMMS (Fig. 3). Sulla base di questi risultati e dopo conferma in un modello d'insufficienza cardiaca in una specie animale di grande taglia (maiale), abbiamo elaborato un protocollo clinico di terapia cellulare di Fase 1 (MESAMI 1) (Fig. 4) in pazienti con insufficienza cardiaca grave. Tale protocollo, che ha utilizzato l'amministrazione di CMMS autologhe di midollo osseo per via transendocardica (sistema NOGA), ha permesso di dimostrare l'assenza di effetti secondari e una tendenza al miglioramento dei parametri di funzionalità cardiaca. Lo studio multicentrico di Fase 2 (MESAMI II) che sarà effettuato su 90 pazienti è programmato per fine 2015.

In conclusione, l'identificazione delle cellule mesenchimali del midollo osseo e la dimostrazione del loro effetto terapeutico nella terapia cellulare hanno aperto un immenso campo di ricerca sul ruolo della parte stromale degli organi nei processi fisiologici e patologici. La caratterizzazione delle funzione tessuto-specifiche delle CMMS e l'identificazione delle loro anomalie in patologia dovrà permettere di proporre dei nuovi approcci terapeutici.

Bibliografia essenziale

1. Bani D, Nistri S. New insights into the morphogenic role of stromal cells and their relevance for regenerative medicine. lessons from the heart. *J Cell Mol Med.* 2014; 18: 363-370.
2. Bianco P, et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med.* 2013; 19: 35-42.
3. Dominici M, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8: 315-317.
4. Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn.* 2005; 233: 706-720.
5. Hoogduijn MJ, et al. No evidence for circulating mesenchymal stem cells in patients with organ injury. *Stem Cells Dev.* 2014; 23: 2328-2335.
6. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell.* 2012; 10: 709-716.
7. Mias C, et al. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. *Stem Cells,* 2009; 27: 2734-2743.
8. Mias C, et al. Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, pro-angiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney. *Stem Cells.* 2008; 26: 1749-1757.
9. Nakaya Y, Sheng G. Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: an embryological view. *Dev Growth Differ.* 2008; 50: 755-766.

The potential of single cell investigation: dissecting the human immune response to pathogens and self-antigens

Antonio Lanzavecchia

Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona and Institute of Microbiology ETHZ, Zürich, Switzerland

Memory lymphocytes represent the repository of the antigenic experience of an individual. By analyzing the specificity and function of these cells we can dissect the human immune response to pathogens, isolate therapeutic antibodies and identify mechanisms of immunity and immunopathology. Our laboratory has developed cell culture-based high-throughput methods to interrogate human memory B cells, plasma cells and memory T cells. Using these methods we isolated neutralizing antibodies of exceptional potency and breadth, such as antibodies that neutralizes all influenza A viruses (1) and even four different paramyxoviruses (2). By targeting conserved structures, these broadly neutralizing antibodies are less prone to select escape mutants and are therefore promising candidates for prophylaxis and therapy of infections as well as tools for the design of improved vaccines. The discovery of unusually potent antibodies that neutralize human cytomegalovirus led to the identification of the viral ligand (3). This ligand has been produced as an experimental vaccine that shows high efficacy in a preclinical model. We also isolated and characterized autoantibodies from patients with pemphigus, pulmonary alveolar proteinosis and other autoimmune diseases and determined their pathogenic mechanism of action (4). To understand the mechanisms that underpin affinity maturation we reconstructed the genealogy tree of broadly influenza neutralizing antibodies. We found that the unmutated common ancestor binds to antigen with low affinity and that a single mutation is sufficient to confer maximal affinity for the immunogen, but further redundant mutations continue to accumulate broadening reactivity against homologous viruses (5). In contrast, in many cases, the unmutated common ancestor of autoantibodies does not bind to the self-antigen, suggesting that the autoantibodies may be generated from the memory rather than from the naïve B cell pool.

Our laboratory has also developed a variety of approaches to dissect the heterogeneity of memory T cells. Distinct functional subsets of central memory, effector memory, and Th1, Th2 and Th17 cells are identified according to the differential expression of chemokine receptors (6). By combining the analysis of memory T cells with the *in vitro* priming of naïve T cells we have characterized two distinct

types of Th17 cells that produce IFN- γ or IL-10 and identified IL-1 β as a master regulator of the inflammatory properties of Th17 cells (7). We also developed a high-throughput cellular screening method based on T cell libraries of polyclonally expanded T cells (8), which has been used to identify HIV-specific naïve and HIV-crossreactive memory T cells in healthy donors (9). Finally, we have combined antigenic stimulation of memory T cell subsets with next generation TCR V β sequencing to address the cellular basis of memory T cell heterogeneity and to define the role of different CD4⁺ T cells in protection or pathology (10).

Bibliografia essenziale

1. Corti D, et al. *Science*. 2011; 333: 850.
2. Corti D, et al. *Nature*. 2013; 501: 439.
3. Macagno, et al. *J Virol*. 2010; 84: 1005.
4. Di Zenzo G, et al. *J Clin Invest*. 2012; 122: 3781.
5. Pappas L, et al. *Nature*. 2014; DOI: 10.1038/nature13764.
6. Acosta-Rodriguez E, et al. *Nat Immunol*. 2007; 8: 942.
7. Zielinski C, et al. *Nature*. 2012; 484: 514.
8. Geiger R, et al. *J Exp Med*. 2009; 206: 1525.
9. Champion SL, et al. *J Exp Med*. 2014; 215: 403.
10. Becattini S, et al. *Science*. 2015; 347: 400.

