

# LETTERE GIC

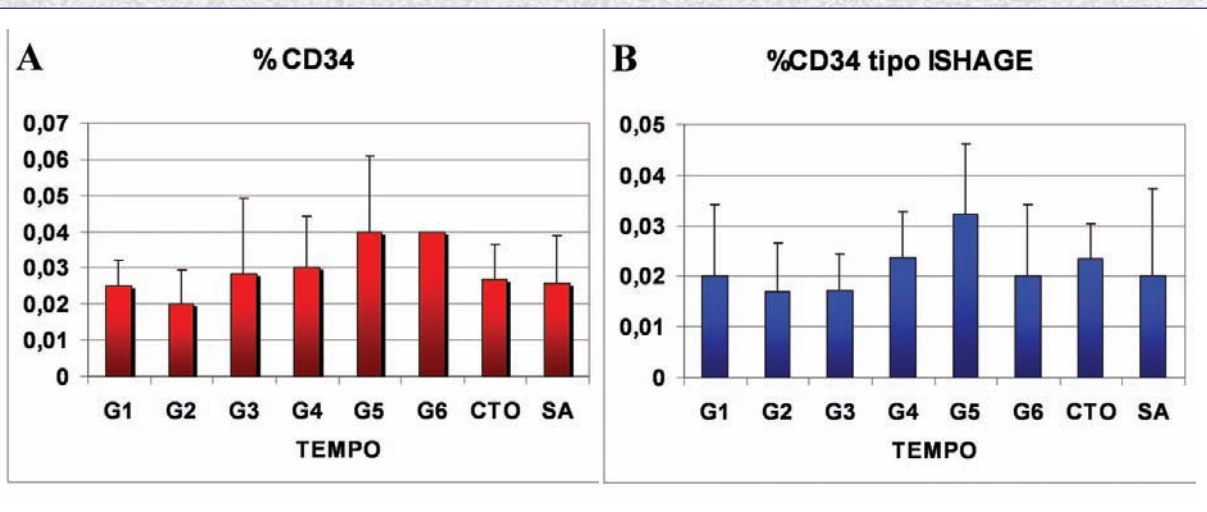
Periodico della Società Italiana di Citometria

*Studio dei progenitori emopoietici circolanti in pazienti con infarto del miocardio*

*Progenitori endoteliali circolanti nelle patologie neoplastiche e cardiovascolari*

*La Citometria a flusso nell'analisi di immunociti di mitilo*

*Impiego del gene PIG-A come gene sentinella per la valutazione delle mutazioni indotte da raggi X su cellule congelate mediante Citometria a flusso*







# Invito alla lettura

a cura di "Ale"

**Haematologica** Open Access Publication  
the hematology journal  
Official Journal of the European Hematology Association

## **Bone marrow mesenchymal stroma cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis**

**Vianello F, Villanova F, Tisato V, Lympéri S, Ka-Kei H, Gomes AR, Marin D, Bonnet D, Apperley J, Lam E W-F, Dazzi F.**

*Haematologica* 2010; 95: 1081-1089

In questo interessante articolo viene approfondito il meccanismo di interazione tra cellule mesenchimali stromali umane (hMSC) di midollo e tumore, in particolare viene valutato il ruolo protettivo svolto da hMSC su cellule di leucemia mieloide cronica (CML) rispetto al processo di apoptosi indotto da imatinib. Le cellule tumorali reclutano attivamente le cellule stromali insieme con cellule infiammatorie e vascolari all'interno della massa tumorale e questo processo è essenziale per la formazione di un microambiente che attivamente favorisce la crescita del tumore stesso. In questo articolo per valutare le vie molecolari coinvolte nell'interazione MSC e cellule di CML a livello midollare, si sono utilizzate coculture di BM-hMSC con cellule BV173 (linea cellulare di CML) o con cellule di CML da sangue periferico di pazienti con CML in fase cronica o con cellule CD34<sup>+</sup> ottenute mediante separazione magnetica da sangue periferico di pazienti con CML, dimostrando con analisi citofluorimetrica dell'apoptosi (ioduro di propidio-annexinaV) l'effetto protettivo esercitato da MSC sull'apoptosi indotta da imatinib; con esperimenti in transwell, è stato poi dimostrato come il meccanismo di protezione dall'apoptosi esercitato dalle MSC richieda il contatto cellulare. Per determinare i "pathways" coinvolti in questo processo, è stata valutata in western blot l'espressione di alcune proteine, implicate nei meccanismi di apoptosi quali Bax e Bcl-XL, Caspasi-3 e CXCR4, su lisati ottenuti da colture di 72 ore di BV173 dopo trattamento con 1 o 5  $\mu$ M di imatinib, con o senza MSC. Bax e Bcl-XL appartengono alla famiglia Bcl-2 delle proteine pro- e anti-apoptotiche che hanno un ruolo chiave nella regolazione della morte cellulare per apoptosi e la modulazione di queste proteine può causare la permeabilizzazione della membrana mitocondriale e quindi il rilascio di molecole solubili responsabili dell'attivazione della cascata delle Caspasi. Il ruolo della chemokina CXCL12/SDF-1 e il suo recettore CXCR4 è stato valutato per altri tumori ematologici. Si è così determinato che la morte delle cellule di CML indotta da imatinib è associata con una pesante attivazione della caspasi-3 mentre

le cellule di CML coltivate con le MSC presentano una più alta espressione di CXCR4, aumentando così l'interazione tra stroma e cellule. Quando le cellule di CML coltivate con MSC sono trattate con imatinib, si osserva che l'attivazione della caspasi-3 è inibita e le MSC sono in grado di aumentare l'espressione di Bcl-XL sulle cellule di CML così revertendo l'effetto inibitorio dell'imatinib su questa proteina antiapoptotica; inoltre l'alta espressione di CXCR4 data dalle MSC non si osserva in presenza di imatinib. Quando le coculture trattate con imatinib sono incubate con AMD1300, che è l'inibitore di CXCR4, l'espressione di Caspasi-3 viene riportata ad alti livelli ma non si osservano effetti sull'espressione di Bcl-XL indotta dalle MSC e questo effetto non correla con la ripristinata sensibilità all'imatinib successiva al blocco di CXCR4 mediante AMD3100. Si può così concludere che l'interazione fisica tra MSC e cellule di CML protegge le cellule tumorali dalla morte indotta dal farmaco secondo una modalità CXCR4/CXCL12, che è uno dei regolatori centrali della sopravvivenza cellulare nei tumori solidi. In relazione a questo aspetto, è stato dimostrato che le hBM-MSCs producono in coltura con cellule leucemiche la chemokina CXCL12 funzionale mentre le BV173 presentano il corrispondente recettore CXCR4 funzionale, valutato in un saggio di tras migrazione con gradiente di concentrazione di CXCL12. Quando le cellule di CML sono esposte all'imatinib mentre sono a contatto con le MSC, la loro capacità di attecchire in topi NOD/SCID è mantenuta, così indicando che le MSC proteggono le cellule di leucemia ripopolanti – e probabilmente le cellule progenitrici di CML – dall'effetto dell'imatinib mediante l'asse CXCR4/CXCL12 in quanto se le coculture di BV173 e MSC sono trattate con l'inibitore AMD3100 prima di essere esposte a imatinib si ottiene una significativa riduzione della percentuale di cellule CD19<sup>+</sup> che attecchiscono nei topi NOD/SCID. Questo articolo pone in luce così il potenziale beneficio di una terapia antagonista di CXCR4 nella CML per distruggere l'asse CXCR4/CXCL12 e rendere così più efficace l'azione dell'imatinib anche nell'eradicare quella popolazione di cellule staminali leucemiche quiescenti BCR/ABL positive (Lin-CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) intrinsecamente resistenti all'imatinib; per cui eventuali agenti che siano indirizzati a quest'asse possono essere in grado di mobilitare le cellule di CML dal loro microambiente protettivo e aumentare l'efficacia terapeutica di imatinib. Il ruolo di CXCL12/SDF-1 e del suo recettore CXCR4 è stato precedentemente studiato in altri tumori ematologici e, in accordo con i risultati, AMD3100 distrugge l'interazione

delle cellule di MM con lo stroma di BM in vitro e in vivo, così migliorando la sensibilità al bortezomib.

**Francesco Lanza e Anna Lisa Pasini**  
[f.lanza@ospedale.cremona.it](mailto:f.lanza@ospedale.cremona.it)

### **Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138<sup>-</sup> and CD138<sup>+</sup> plasma cells**

**Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, Bos NA, Johnsen HE, Orfao A, Perez-Andres M for the Myeloma Stem Cell Network (MSCNET).**

*Haematologica*

Questo lavoro si propone di caratterizzare le popolazioni linfocitarie umane circolanti B usando una tecnica citofluorimetria multiparametrica per definire la migliore combinazione di markers per la loro identificazione e per studiare la loro variazione in relazione all'età. Questo studio si pone inoltre come obiettivo quello di caratterizzare in dettaglio il fenotipo dello status di attivazione e di homing delle plasmacellule circolanti in fase steady-state. Nel sangue periferico esistono 4 diverse popolazioni di cellule B circolanti: 2/3 sono costituiti da linfociti B naive (CD27<sup>-</sup> CD20<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>), 1/3 è rappresentato da linfociti B memory (CD27<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>), rare plasmacellule in fase "steady-state", caratterizzate dal seguente immunofenotipo: CD20<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD38<sup>high</sup>, e una piccola quota (2-4%) di cellule B immature (CD10<sup>+</sup>, CD24<sup>high</sup>, CD38<sup>high</sup>). Questo paper ha valutato il sangue periferico di 106 donatori sani, adulti, mediante citofluorimetria utilizzando come marcatori varie combinazioni basate su il CD10, CD27 e CD38, i quali permettono la identificazione dei linfociti B immaturi (CD10<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>), naive (CD10<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>), e memory (CD10<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>). Il passaggio da linfociti B naive a memory è caratterizzato dall'aumento di CD24, CD25, CD27 e CD53 e down-regolazione di CD5 e CD23. Le plasmacellule (CD20<sup>-</sup>,CD38<sup>++</sup>,CD27<sup>++</sup> e cyIg<sup>+</sup>) hanno una eterogenea positività per CD138 (CD138<sup>-</sup>: 57±12% e CD138<sup>+</sup>: 43±12%). Si è osservato che la produzione di linfociti B immaturi e naive non è significativamente influenzata dall'età mentre la differenziazione di linfociti B naive in linfociti B memory e poi in plasmacellule è chiaramente ridotta con l'età e ciò potrebbe potenzialmente essere dovuto a una più bassa esposizione a nuovi antigeni che si verifica nell'anziano. Per quanto riguarda la caratterizzazione dettagliata delle plasmacellule circolanti, esse mostrano differenze nell'indice di colorazione (Stained Index) delle CD138<sup>+</sup> rispetto alle CD138<sup>-</sup> in relazione ai markers CD38 (↑ 22%), catene leggere κ e λ delle cyIg (↑ 47% e ↑ 98%), CD27 (↑ 117%) e CD45 (↓ 24%). Non sembra che siano di origine mucosale perché solo 40-50% di tutte le plasmacellule del sangue periferico sono IgA<sup>+</sup> e hanno il CCR10 solo debolmente espresso. Per quanto riguarda la loro origine e il loro comportamento, in base alla loro espressione di HLA-DR e CD45, si ritiene generalmente

che siano plasmoblasti di nuova generazione negli organi linfoidi. Ma una frazione delle plasmacellule circolanti potrebbero essere plasmacellule a lunga vita localizzate nel BM e/o nei tessuti linfoidi che sono indotte a ricircolare dalla loro nicchia in competizione con plasmoblasti circolanti di nuova generazione. Lo status di attivazione delle plasmacellule circolanti (KI-67<sup>+</sup>: 66.8 ± 29.7% per CD138<sup>-</sup> e 76.2 ± 12.5% per CD138<sup>+</sup>) potrebbe indicare che sono state indotte a ricircolare da stimolazione locale.

**Francesco Lanza**  
[f.lanza@ospedale.cremona.it](mailto:f.lanza@ospedale.cremona.it)

### **Relationship between minimal residual disease measured by multiparametric flow cytometry prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and outcome in children with acute lymphoblastic leukemia**

**Elorza I, Palacio C, Dapena JL, Gallur L, Sánchez de Toledo J and Díaz de Heredia C**

*Haematologica, 95,6, 936-41*

In questo articolo viene utilizzata la citometria a flusso multiparametrica per valutare quantitativamente la Malattia Minima Residua (MRD) in 31 pazienti pediatrici (range di età: 10 mesi-16 anni) affetti da leucemia linfoblastica acuta (ALL) ad alto rischio, inizialmente resistente o ricaduta, prima di sottoporli a trapianto di cellule staminali (HSCs). La determinazione di MRD in questi pazienti risulta particolarmente importante per valutare la risposta al trattamento e rappresenta un indice prognostico sfavorevole per trapianto di HSC. Negli studi precedenti più recenti, a questo proposito, la valutazione di MRD viene fatta mediante amplificazione dei riarrangiamenti clonali dei geni del TCR e del gene per l'immunoglobulina con PCR ma si può osservare come le due metodologie non presentino discrepanze e inoltre la metodica basata su tecnica citofluorimetria sia rapida, prontamente disponibile e dia una quantificazione accurata della MRD, fornendo nel contempo informazioni sul normale status ematopoietico: dei 31 pazienti analizzati, 10 avevano MRD-positiva prima del trapianto (MRD ≥ 0.01%) mentre 21 non presentavano MRD (MRD < 0.01%). Questo studio conferma che la MRD determinata prima del trapianto costituisce un marker predittivo di ricaduta dopo trapianto stesso con una percentuale di sopravvivenza complessiva del 20% in pazienti MRD-positivi pre-HSCT rispetto ad un valore dell'80% per pazienti MRD-negativi per cui i pazienti con MRD-positiva presentano un più alto RR (risk ratio) di ricaduta di 10.5 e un RR di morte del 4.2 rispetto a pazienti senza MRD. Non è stata evidenziata una correlazione statisticamente significativa con altri fattori analizzati quali sesso, stato di remissione pre-HSCT, tipo e fonte del donatore, grado di GVHD e ricaduta rispetto a presenza di MRD pre-HSCT e GVHD severa che sono invece fattori significativamente predittivi di esito infuosto. Questo approccio di studio permette quindi di identi-