

# LETTERE GIC

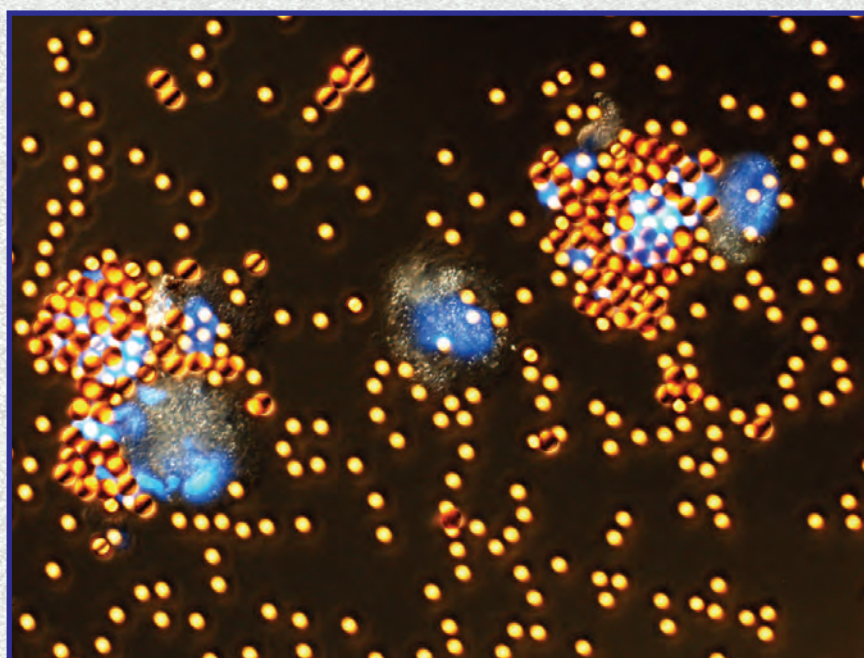
Periodico della Società Italiana di Citometria

*Isolamento e caratterizzazione immunofenotipica di cellule non-emopoietiche presenti in versamenti ascitici e pleurici di pazienti con malattie ematologiche*

*Caratterizzazione morfologica e funzionale di una popolazione cellulare eterogenea presente nel liquido follicolare di ovaio umano*

*La Transizione Epitelio Mesenchimale: modulatore delle "Cancer Stem Cells" nel tumore polmonare non a piccole cellule*

*Approccio morfo-citometrico per lo studio della relazione fra cellule quiescenti e comparsa di recidive in seguito a trattamento con Terapia per Cattura Neutronica del Boro*



# CyFlow<sup>®</sup> Cube

Truly stand-alone.

## HIGH PERFORMANCE FLOW CYTOMETRY

Immunology | Pathology | Cell Biology | Microbiology | Industrial Applications | Agrosiences | Cell Sorting



CUB<sub>8</sub>

### Highlights CyFlow<sup>®</sup> Cube 8

- \_ 8 optical parameters | 6 colors
- \_ Up to 3 lasers + 365 nm UV LED
- \_ Choice of laser excitation wavelengths: 488, 638, 407, 355, 375, 532, 561, 594 nm
- \_ Built-in Windows™ PC and 19" TFT screen
- \_ Superior fluorescence sensitivity:  $\leq 100$  MESF (FITC) |  $\leq 50$  MESF (PE)
- \_ Superior resolution: CV  $\leq 1\%$  (DNA)
- \_ Superior small particle detection  $\leq 50$  nm
- \_ Optional CyFlow<sup>®</sup> Sorter for closed, non-destructive cell and particle sorting with purity up to 99%
- \_ Optional CyFlow<sup>®</sup> Robby Autoloading Station for well plates and sample tubes
- \_ Integrated sheath/waste container

### Contact

Partec GmbH | Otto-Hahn-Straße 32 | D-48161 Münster | Germany  
 Phone +49 (0) 2534 8008-0 | Fax +49 (0) 2534 8008-90 | info@partec.com



CUB<sub>6</sub>

### Highlights CyFlow<sup>®</sup> Cube 6

- \_ 6 optical parameters | 4 colors
- \_ 1 or 2 light sources
- \_ Choice of excitation wavelengths:  
488, 638, 407, 355, 375, 532, 561, 594 nm lasers and 365 nm UV LED
- \_ Built-in Windows™ PC and 15,4" TFT screen
- \_ Superior fluorescence sensitivity:  $\leq 100$  MESF (FITC) |  $\leq 50$  MESF (PE)
- \_ Superior resolution: CV  $\leq 1\%$  (DNA)
- \_ Superior small particle detection  $\leq 50$  nm
- \_ Optional CyFlow<sup>®</sup> Robby Autoloading Station for well plates and sample tubes

Partec GmbH | Am Flugplatz 13 | D-02828 Görlitz | Germany  
 Phone +49 (0) 3581 8746-0 | Fax +49 (0) 3581 8746-70 | mail@partec.com

Centrifughe serie  
58XX con nuova  
generazione di rotori



## Performance affidabili

### Centrifughe Multiuso Eppendorf 5804/R e 5810/R

Le centrifughe Eppendorf vanno oltre alle consuete performance di velocità e capacità, offrendovi il controllo ergonomico, la gestione ottimale della temperatura, la progettazione ecocompatibile a basso consumo di energia, la comprovata affidabilità e la qualità. Tutto questo fa delle Centrifughe 5804/R e 5810/R Eppendorf strumenti ottimali per il vostro laboratorio.

- > Eccezionale versatilità della gamma dei rotori
- > Altezza di accesso ridotta
- > Silenziosa
- > Disegnata per ridurre gli ingombri
- > Ergonomia Eppendorf
- > Chiusure e coperchi con sistema QuickLock®

[www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)

Guardate il video delle centrifughe qui!



# Novità

*Presenza diretta  
di Beckman Coulter sul mercato italiano  
della Citometria a Flusso*



*Analizzatore*  
**AQUIOS CL**  
*"LOAD & GO"*

*Sistema integrato  
di citometria a flusso*

Semplifica l'analisi dell'immunofenotipo: unica operazione manuale richiesta "caricare i campioni"

- Analisi T,B,NK, in un unico strumento totalmente automatizzato: ricezione dati paziente dal LIS
- Dispensazione del campione da provetta primaria, marcatura, incubazione, lisi, lettura citofluorimetrica con conta assoluta volumetrica
- Validazione secondo regole impostate dall'operatore e invio risultati al sistema informatico

 **BECKMAN  
COULTER**  
*Life Sciences*

# LETTERE GIC

Vol. 22, Num. 2

Agosto 2013

## DIRETTORE RESPONSABILE

Raffaele De Vita

## COMITATO EDITORIALE

**Marco Danova**

Dipartimento di Medicina

A.O. di Pavia

S.C. di Medicina Interna e Oncologia Medica

Ospedale Civile di Vigevano

**Raffaele De Vita**

Unità Biologia delle Radiazioni e Salute dell'Uomo

ENEA - Centro Ricerche Casaccia

Roma

**Eugenio Erba**

Istituto Ricerche Farmacologiche "Mario Negri"

Milano

**Giuseppe Starace**

Istituto Medicina Sperimentale CNR

Roma

Volume 22, numero 2 - Agosto 2013

Lettere GIC

Periodico della Società Italiana di Citometria

Autorizz. del trib. di Roma n° 512/92 del 17/9/92

Edizione quadrimestrale

Spedizione in abbonamento postale

Peer Review Journal

ISSN 2280-8663

Grafica: Renato Cafieri

Stampa: **CSP-STAMPA PIGNANI**

Zona Industriale Settevene - Nepi (VT)  
csp.stampa@virgilio.it

Pubblicità:

Redazione:



c/o Unità Biologia delle Radiazioni e

Salute dell'Uomo

ENEA Centro Ricerche Casaccia, s.p. 016

Via Anguillarese, 301 - 00123 ROMA

☎ 06/30484671 Fax 06/30484891

e-mail: gic@enea.it

http://biotec.casaccia.enea.it/GIC/



Associato alla  
Unione Stampa  
Periodica Italiana

## SOMMARIO

Isolamento e caratterizzazione immunofenotipica di cellule non-emopoietiche presenti in versamenti ascitici e pleurici di pazienti con malattie ematologiche 7

D. Campioni, L. Ferrari, S.D. Moretti, F. Lanza, A. Cuneo

Caratterizzazione morfologica e funzionale di una popolazione cellulare eterogenea presente nel liquido follicolare di ovaio umano 13

F. Riva e C. Omes

La Transizione Epitelio Mesenchimale: modulatore delle "Cancer Stem Cells" nel tumore polmonare non a piccole cellule 23

R. Camerlingo, G. Sessa e G. Pirozzi

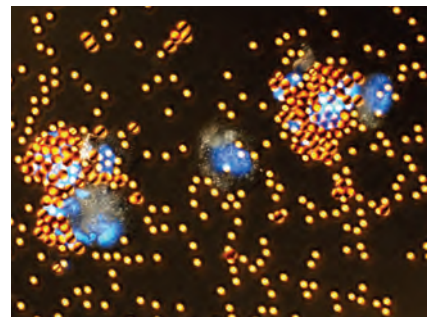
Approccio morfo-citometrico per lo studio della relazione fra cellule quiescenti e comparsa di recidive in seguito a trattamento con Terapia per Cattura Neutronica del Boro (BNCT) 29

C. Ferrari, L. Cansolino, A.M. Clerici, C. Zonta, P. Dionigi, G. Mazzini, S. Altieri, F. Ballarini, S. Bortolussi, N. Prott

In Libreria a cura del "Lettore" 36

Corso di Formazione FAD accreditato ECM Metodologie Citometriche nella Biologia e nella Clinica 37

News in Bibliografia a cura di "Marty DV." 38



In copertina: dal lavoro di F. Riva e C. Omes "Caratterizzazione morfologica e funzionale di una popolazione cellulare eterogenea presente nel liquido follicolare di ovaio umano". Sottopopolazione di cellule CD44+ purificata da liquido follicolare di ovaio umano, isolata direttamente su vetrino mediante il sistema di microsferi magnetiche. Le cellule CD44+ (circa il 20%) sono legate alle microsferi, che si dispongono attorno alla membrana, creando rosetture caratteristiche. I nuclei sono controcolorati con Hoechst 33258 (fluorescenza blu).

**Monoclonal Antibodies to Human CD Antigens**

**Dual Colour-labelled Monoclonal Antibodies to Human CD Antigens**

**Triple Colour-labelled Monoclonal Antibodies to Human CD Antigens**

**Monoclonal Antibodies to Mouse CD Antigens**

**Monoclonal Antibodies to Rat CD Antigens**

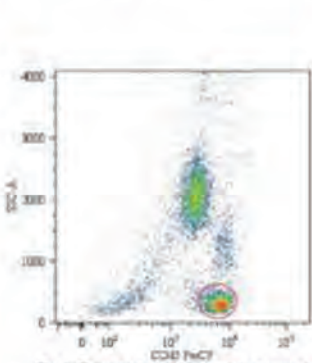


Fig. 1: Delimitation of CD45+ lymphocyte population

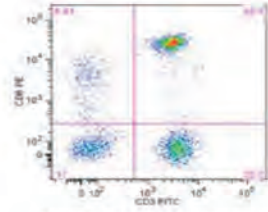


Fig. 2: CD45+ lymphocytes in a dot plot CD8 PE vs. CD3 FITC

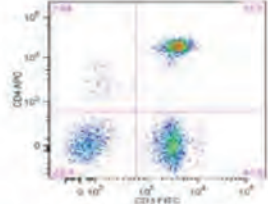


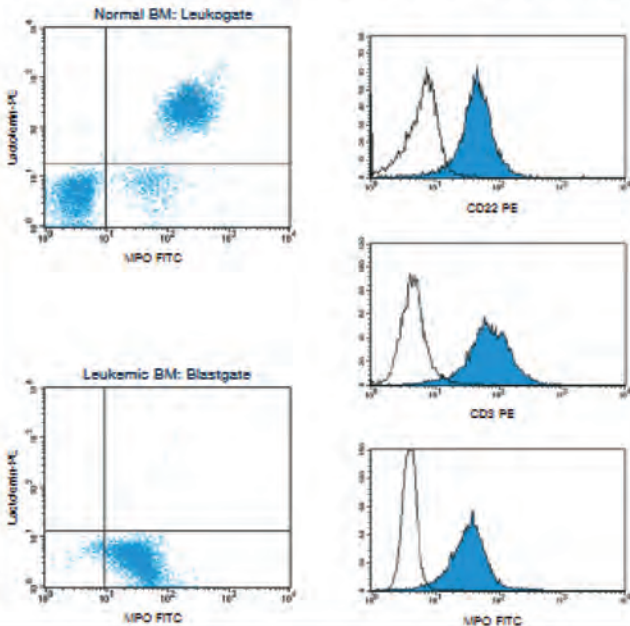
Fig. 3: CD45+ lymphocytes in a dot plot CD4 APC vs. CD3 FITC

**TONBO biosciences**

**FIX&PERM**

**Fixation and Permeabilization Kit**

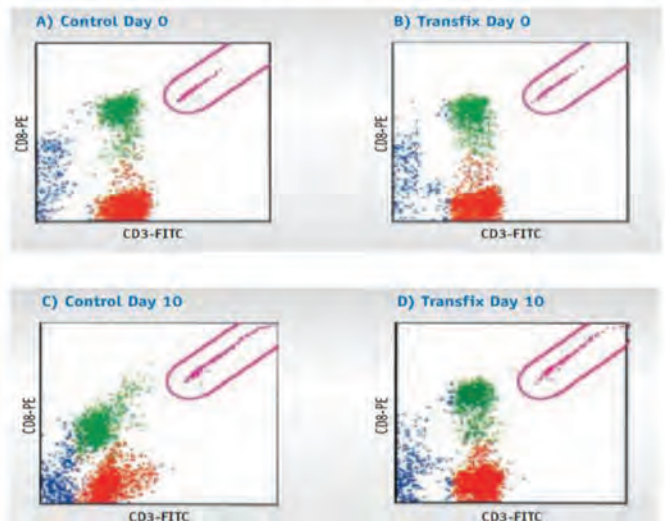
- Well-suited for leukemia and lymphoma immunophenotyping.
- May be used with isolated cells or whole blood.
- For simultaneous detection of intracellular and surface antigens.



**TransFix®**

**A Cellular Antigen Stabilisation Reagent**

TransFix® is a patented, CE marked cellular stabilisation solution that preserves cell surface antigens for a minimum of 10 days at 2-22°C and for 4 days at 37°C (1).



Distributed by:

# Isolamento e caratterizzazione immunofenotipica di cellule non-emopoietiche presenti in versamenti ascitici e pleurici di pazienti con malattie ematologiche

<sup>1</sup>Campioni D, <sup>1</sup>Ferrari L, <sup>1</sup>Moretti S, <sup>2</sup>Lanza F, <sup>1</sup>Cuneo A

<sup>1</sup>Sezione di Ematologia-Azienda Ospedaliera S. Anna - Ferrara

<sup>2</sup>Sezione di Ematologia, Azienda Ospedaliera di Cremona- Cremona

e-mail: cmpdni@unife.it

## RIASSUNTO

Alcuni tipi di tumori inducono la formazione di versamenti delle sierose quali asciti o versamenti pleurici. La malignità o meno del contenuto di questi liquidi viene stabilita di routine dall'indagine citologica che risulta specifica ma a volte poco sensibile, come attesta il follow up clinico di questi pazienti. In questo studio, proponiamo un approccio combinato di citometria a flusso e colture cellulari, in aggiunta all'indagine citologica di routine, al fine di meglio definire la natura reattiva o maligna dei versamenti insorti nei pazienti affetti da patologie onco-ematologiche. Questo protocollo risulta estremamente utile nel classificare l'origine delle cellule non-emopoietiche contenute in questi liquidi soprattutto in campioni ipocellulati ed emorragici.

## INTRODUZIONE

Il liquido ascitico normalmente rappresenta una raccolta di liquido in cavità peritoneale che può avere le caratteristiche del trasudato o dell'essudato, la cui formazione è associata nel 10% dei casi a patologie neoplastiche. Rispetto ai trasudati, gli essudati sono i campioni che risultano essere maggiormente più ricchi di cellule. Le cellule normalmente presenti possono essere cellule infiammatorie, linfociti, mesoteli normali o trasformati e cellule tumorali di diverso tipo (del tumore primario o delle metastasi). Alcuni studi in letteratura hanno dimostrato che la composizione del liquido ascitico è piuttosto eterogenea (1). Ad esempio, nel caso del carcinoma ovarico (2) la composizione del liquido ascitico, oltre a comprendere cellule del carcinoma ovarico stesso, può includere fattori solubili angiogenici e tumorigenici, nonché la presenza di cellule stromali normali come fibroblasti, cellule epiteliali, cellule endoteliali e mesoteliali, cellule di derivazione midollare come adipociti e cellule tipo mesenchimale. L'ascite dunque può rappresentare un microambiente importante nel favorire la crescita del tumore. Anche il versamento pleurico rappresenta un altro tipo di campione biologico interessante da analizzare per capire l'eziopatogenesi di alcuni tipi di patologie che spaziano dai diversi tipi di infezioni batteriche e virali fino ai tumori. L'iter diagnostico di un liqui-

do ascitico e/o di un liquido pleurico è dapprima un esame macroscopico poi culturale e citologico per escludere o confermare soprattutto la presenza o meno di cellule tumorali. Nell'analisi di questi tipi di campioni, soprattutto quando il preparato risulta emorragico, ipocellulato o eterogeneo nella sua composizione, la citometria a flusso può rappresentare un approccio ulteriore più rapido e sensibile, rispetto a quello citologico. Purtroppo però non esiste un protocollo citometrico standardizzato (3-4) per lo studio immunofenotipico dei diversi tipi di cellule stromali che possono essere contenute in questi liquidi biologici e nell'analisi a fresco diventa pertanto difficile distinguere cellule tumorali da altri tipi di cellule normali ad esempio di derivazione mesenchimale, piuttosto che epiteliale, o endoteliale. In questo studio preliminare, attraverso un approccio combinato di citometria a flusso e colture cellulari, abbiamo voluto capire se è possibile accertare la presenza e il fenotipo di cellule non emopoietiche normali o maligne in campioni di ascite e di liquido pleurico.

## MATERIALI E METODI

### Conteggio e indagine morfologica

In questo studio sono stati analizzati campioni di liquido pleurico provenienti da 5 pazienti con versamento pleurico. Tra questi campioni, 2/5 provenivano da pazienti con pregressa leucemia linfatica cronica (LLC), altri 2/5 da pazienti con linfoma non Hodgkin (NHL), e il quinto da una patologia onco-ematologica in fase di accertamento. L'età media dei pazienti con versamento pleurico era di 77+/-14 con una ratio M/F di 4/1. I campioni di ascite pervenuti sono stati invece tre di cui 2/3 provenienti da pazienti con LLC e uno con NHL. L'età media dei pazienti, tutti maschi, con ascite era di 59,5+/-24. I campioni pervenuti in provette addizionate di EDTA sono stati analizzati con contaglobuli del tipo Cell Dyn Sapphire (Abbott) per stabilire la cellularità e poi citocentrifugati e contrastati in May-Grünwald Giemsa per l'analisi morfologica al microscopio ottico.

### Colture cellulari ed espansione ex vivo

In questo studio le frazioni cellulari provenienti dai cam-

pioni di liquido pleurico e ascite sono state isolate dai pazienti e messe in coltura per valutarne le caratteristiche di crescita. I campioni pervenuti sono stati dapprima diluiti con soluzione fisiologica e pellettati a 1200giri/min per 10 minuti. Scartato il supernatante, le cellule sono state risospese in terreno fresco di coltura, e contate in camera di Bürker. Dopo il conteggio sono state seminate  $0,5-1 \times 10^6$  cellule in capsule di Petri da 35 mm collagenate (Biocoat Collagen I Cellwre Petri-Becton-Dickinson, San Jose, CA, US) sia in terreno commercialmente ottenibile e specifico per la sopravvivenza delle cellule staminali emopoietiche ( $M^{5100}$ ) (StemCell Technologies Inc, BIOSPA, Bologna, Italia) sia in terreno EGM ( $M^{EGM}$ ) addizionato di citochine angiogeniche al 2% di SFB (Biowhittaker, Cambrex Bio Science Walkersville, Inc, USA, Lonza s.r.l) per la crescita di cellule endoteliali e mesenchimali (5-6). La crescita delle colture è stata valutata giornalmente, ma soprattutto entro 72 ore dalla semina e a 15 giorni per la valutazione della crescita di colonie tipo CFU-F. La possibile capacità funzionale differenziativa delle cellule in coltura è stata testata in senso adipogenico e condrogenico utilizzando i terreni commerciali del tipo ADIPOdiff e OSTEOdiff (Stem Cell Technologies) (7).

#### **Analisi citofluorimetrica multiparametrica**

##### *Citometria a flusso del campione a fresco.*

In questo studio i campioni di liquido pleurico e di ascite sono stati analizzati in citometria a flusso a fresco entro due ore dal prelievo mediante tipizzazione linfocitaria di base per la ricerca della malattia (LLC o NHL) già nota nel paziente mediante combinazioni note a 4/6 colori come previsto nella routine diagnostica ematologica della LLC e dei NHL (8). Tutti i campioni pervenuti sono stati dapprima contati e poi aliquotati per avere almeno  $3-5 \times 10^5$  cellule per tubo di reazione e incubati con gli anticorpi monoclonali per 20' a temperatura ambiente al buio. Dopo l'incubazione i campioni sono stati lisati in Lysing buffer (BD Pharm Lyse) e poi diluiti con PBS prima dell'acquisizione con FACSCANTO (Becton-Dickinson). Per l'acquisizione sono stati fissati almeno 30/50.000 eventi totali.

Per meglio capire invece quali altri tipi di cellule non-emopoietiche fossero presenti nei campioni a fresco abbiamo aggiunto alla routine altre combinazioni normalmente utilizzate per la caratterizzazione delle cellule mesenchimali, endoteliali ed epiteliali (4-5, 9) nonché dei monociti utilizzando i seguenti anticorpi monoclonali, anti-CD90-FITC coniugato, anti-CD44 FITC, , anti-CD29 FITC, anti-CD31 FITC, anti-CD73 PE, anti-CD146 PE, anti-CD10 PE, anti-CD105 PE, anti-68 PE, anti-CD14 PE, anti-CD80 PE, Anti HLA-A-B-C (I classe) PE, anti-HLA-DR (II-classe) PercP/FITC, anti-CD34 PercP, anti-CD45 APC (Becton Dickinson), anti-vimentina FITC, anti-E-caderina FITC, anti-citokeratina 18/19 FITC, anti EMA-FITC (DAKO). Per l'analisi degli anti-

geni citoplasmatici abbiamo fissato e permeabilizzato con Fix and Perm kit An Der Grub Bio Research GMBH (Immunological Science). L'analisi delle possibili cellule non-emopoietiche a fresco è stata eseguita nel gate delle cellule CD45 negative.

##### *Citometria a flusso del campione dopo coltura ed espansione ex vivo.*

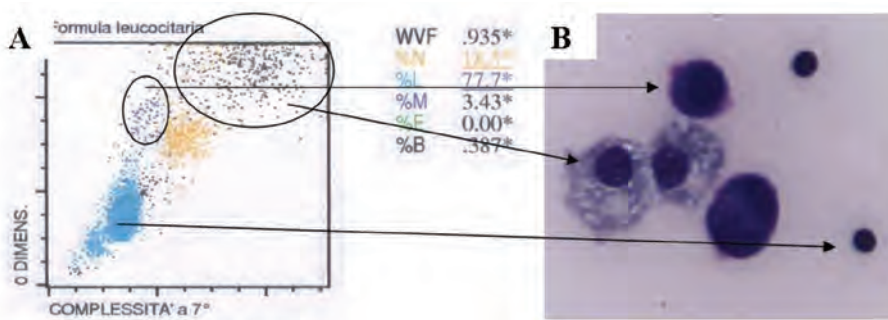
L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita sugli stessi campioni a 48/72 ore, 7-12-30-45 giorni dopo coltura in vitro. In particolare le cellule aderenti espanse da colture primarie (allestite come sopra descritto) sono state staccate con tripsina-EDTA, e poi risospese in 0,5 ml di PBS ed incubate un approccio a quattro colori utilizzando gli anticorpi monoclonali precedentemente descritti (5). Dopo l'incubazione le cellule sono state acquisite con strumento FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose, CA, US) e analizzate con software FACSCanto Diva utilizzando una strategia di "gating" principalmente basata sulla negatività per il CD45 e la 7-AAD.

#### **RISULTATI E DISCUSSIONE**

Per quanto riguarda la caratterizzazione dei campioni a fresco i risultati hanno mostrato che anche solo dopo il conteggio cellulare automatizzato con strumento e tecnologia Abbott Cell Dyn Sapphire, può essere visibile una popolazione sospetta di cellule ad alto scatter fuori dalla consueta area prevista per i campioni normali, come mostrato in figura 1, mentre i linfociti presenti, prevalentemente linfociti T nel liquido pleurico e linfociti B nelle asciti, risultano in genere la popolazione principale. Questi dati di composizione cellulare sono confermati anche dall'indagine morfologica sui citocentrifugati contrastati in Giemsa sui quali è possibile evidenziare quasi sempre la presenza di linfociti monociti e macrofagi ma anche di cellule dalla morfologia atipica, non-emopoietica suggestiva per cellule di tipo mesenchimale /mesoteliale o epiteliale e in alcune casi di cellule tipo schiumose come visualizzato in figura 1. Queste cellule, presenti anche in campioni ipocellulati, risultano grandi, spesso vacuolate e a volte binucleate.

L'analisi citofluorimetrica nei campioni a fresco ha evidenziato la presenza della malattia ematologica già diagnosticata in 2/3 campioni di liquido ascitico (era presente rispettivamente il 70% e il 10% dei linfociti clonali di tipo B appartenenti alla malattia già nota del paziente in ordine LLC e NHL) e in 1/5 campioni di liquido pleurico (presenza del 3% di linfociti clonali di tipo B con le caratteristiche della malattia LLC pregressa) come visibile in figura 2 e 3. Tutti gli altri campioni sono risultati negativi sia per la ricerca della clonalità della malattia già nota sia per un eventuale nuova diagnosi. Nonostante la presenza o l'assenza della malattia ematologica ciò che è risultato però interessante è stata la presenza in tutti i campioni analizzati di una variabile percentuale di cellule CD45negative (più limitata nel liqui-





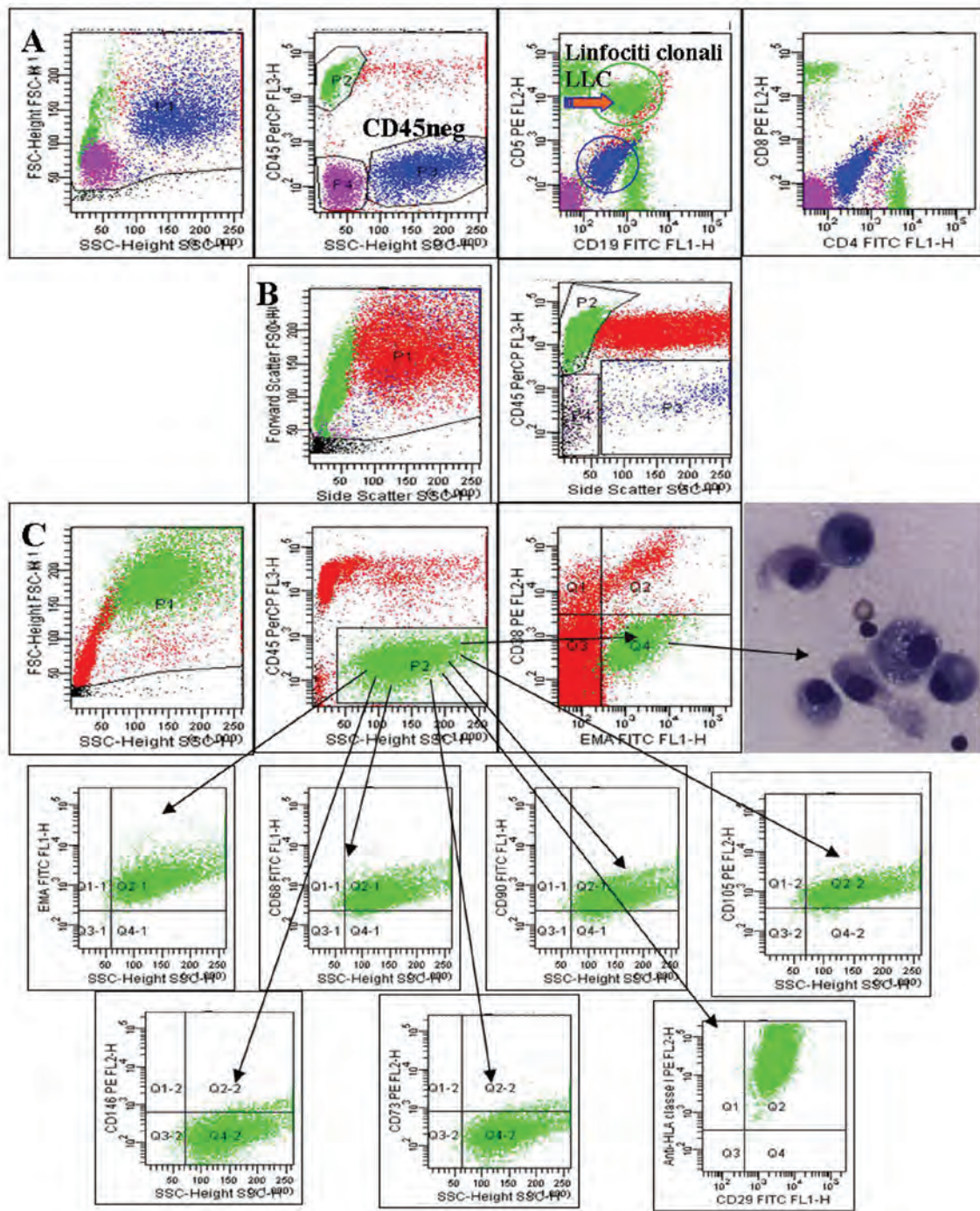
**Fig. 1. Conteggio e morfologia dei liquidi biologici.** Nella figura è visibile in A il plot relativo alla conta automatizzata in questo caso specifico di un liquido ascitico con lo strumento conta globuli automatico Cell Dyn Sapphire (Abbott) dal quale è visibile nell'area più alta (cerchietto) una popolazione ad alto scatter relativa alla presenza di cellule grandi e con vacuoli dalla morfologia evidente nella figura accanto (B) dopo citospin e contrasto in May-Grunwald Giemsa. E' da notare nella formula l'alta percentuale di linfociti. Nella tabella sottostante sono descritte alcune caratteristiche relative alla composizione immunofenotipica sia dei campioni di liquido ascitico (ASC) che di liquido pleurico (V.PL) analizzati.

	GLOB. BIANCHI 10 <sup>3</sup> /μL	LINFOCITI (%)	% CD3+	%CD19+	CD4/CD8 ratio	IgGκ/IgGλ ratio	%CD45-
V.PL (5)	1,9+/-2,7	74,2+/-21,4	69,7+/-9,9	15+/-10	2,8+/-1,3	9,3+/-14,4 1/5 clonale Con 3% malattia	4,6+/-3,7 (0,4-9)
ASC. (3)	4,25+/-2,9	79+/-31	39,4+/-37	48,51	1,6+/-0,2	18+/-2 2/3 clonale 70 e 10% malattia	13,8+/-17 (1,7-26)

do pleurico, range 0,4-9 %, e più alta nel liquido ascitico, range 1,7-26% figura 1) ad alto e/o basso scatter (figura 2-3), spesso non rilevata nella parallela indagine citologica.

La caratterizzazione a fresco di questa frazione CD45<sup>neg</sup> in entrambi i tipi di liquido biologico, in genere depone per la presenza di cellule con immunofenotipo compatibile con quello di cellule sia di tipo mesenchimale che epiteliale-simile risultando infatti queste cellule genericamente e parzialmente positive per il CD90, CD105, CD29, HLA-A-B-C, e per il CD68 mentre oltre ad essere negative per il CD45 risultano anche negative per il CD34, e il CD14 (figura 2). La positività invece per l'EMA e talora per le citocheratine o l'E-caderina nonché la negatività per il CD73 e per il CD146 in alcuni casi fanno pensare ad una natura comunque non mesenchimale delle cellule presenti, mentre la positività per il CD31, il CD146, il CD105 e il CD106 confermano in altri casi la presenza di cellule possibilmente endoteliali. Queste cellule CD45 negative sono comunque sempre risultate CD38 e CD138 negative pertanto non confondibili con le plasmacellule (figura 2) mentre la loro natura non emopoietica è stata confermata anche dalle colture in vitro. Da tutti i campioni analizzati infatti è stato possibile espandere e stabilizzare colture di cellule aderenti in vitro. In particolare però, in 3/5 campioni di liquido pleurico la crescita e l'espansione in coltura delle colonie di cellule non-emopoietiche è stata normale poiché solo dopo 15 giorni è stato possibile individuare rare colonie (da 1 a 3/0,5-1x 10<sup>6</sup>) di cellule mesenchimali-simili (con fenotipo confermato al FACS) con potenziale plastico sia in senso osteogenico che adipogenico. In uno di questi campioni è stato possibile isolare inoltre cellule di natura più mesoteliale e/o endoteliale. Interessante invece il fatto che in 3/3 campioni di liqui-

do ascitico e in 2/5 campioni di liquido pleurico sia stato possibile ottenere monostrati di cellule aderenti con un elevato turn-over replicativo anche solo dopo 48-72 ore dalla semina. Queste cellule però non hanno presentato plasticità differenziativa in senso osteogenico ed adipogenico come invece classicamente osservato per le cellule mesenchimali normali. Queste cellule in coltura presentavano una morfologia poligonale piuttosto che allungata fibroblasto-simile, nonché la presenza di numerose inclusioni citoplasmatiche, mentre il loro immunofenotipo, anche solo dopo 72h di coltura, è risultato quasi sovrapponibile a quello studiato a fresco sebbene con alcune differenze immunofenotipiche dovute anche al diverso terreno di coltura (figura 4). Oltre a confermare l'espressione di alcuni antigeni considerati "mesenchimali" come il CD90,CD105,CD29,HLA-A-B-C, CD44 e CD10 è stata evidenziata la variabilità di espressione per il CD73, CD146, per l'EMA, per le citocheratine di tipo 18-20 e per l'HLA-DR e il CD80 nonché la negatività per la vimentina e il CD31 suggerendo la presenza di cellule con un fenotipo misto "atipico" non completamente compatibile con quello di cellule mesenchimali o epiteliali normali ma forse simile a quello di cellule neoplastiche. D'altra parte la caratterizzazione fenotipica delle MSC rimane ancora un campo di approfondimento (10) poiché il loro profilo immunofenotipico è quasi sovrapponibile a quello di altre popolazioni cellulari come ad esempio i fibroblasti normali o appunto le cellule neoplastiche (2, 11). In questi casi l'immunofenotipo "misto e atipico", l'elevato ritmo replicativo dopo 48-72 dalla semina e la mancata prova di plasticità ci hanno suggerito di sospettare della presenza di popolazioni di cellule verosimilmente di natura più neoplastica e secernente piuttosto che normale in tutti e tre i campioni di ascite e nei 2 campioni di liquido pleurico, sospetto confermato



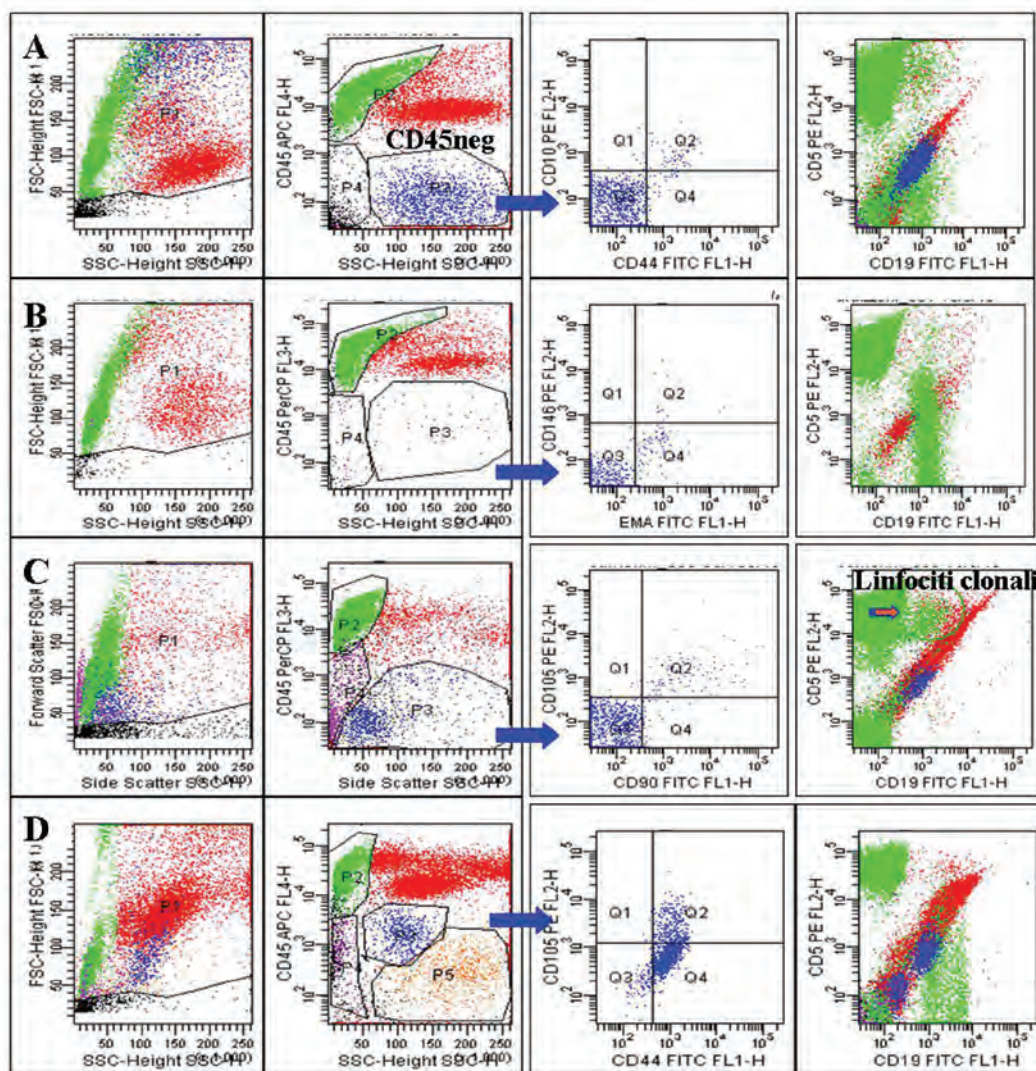
**Fig. 2. Analisi citofluorimetrica del liquido ascitico a fresco.** Nella figura è rappresentata l'analisi a fresco al citofluorimetro di 3 diversi casi (A-B-C) di liquido ascitico. In A, oltre ai parametri morfologici di FSC e SSC, attraverso una strategia di gating, sono messe in evidenza le diverse popolazioni presenti come i linfociti (verde) in questo caso clonali (CD19+/CD5+) segno di infiltrazione nel liquido ascitico della malattia ematologica LLC progressa, eritroblasti (viola) e cellule CD45 negative (blu) frazione cellulare (18% del totale) probabilmente contenente le cellule non-emopoietiche. In B è rappresentato un secondo caso in cui la popolazione di cellule CD45<sup>neg</sup> è molto minore (1% del totale). In C è rappresentato un terzo caso in cui la frazione di cellule CD45<sup>neg</sup> (verde) è molto rappresentata (26% del totale). Queste cellule CD45<sup>neg</sup>, la cui morfologia al contrasto in Giemsa (riquadro) risulta simile a quella di cellule mesoteliali/mesenchimali, mostrano un fenotipo a fresco compatibile almeno parzialmente con quello di cellule mesenchimali essendo CD90+CD105+CD29++HLA-A-B-C+CD68+ ma EMA+CITOK-18+CD73-CD34- e CD146-. L'analisi citologica di questi tre campioni ha confermato la presenza di cellule di carcinoma gastrico oltre alle cellule della malattia progressa LLC solo nel caso C. Negli altri due casi da noi analizzati a fresco la diagnosi citologica di carcinoma è stata confermata purtroppo solo successivamente nel follow up del paziente.

dall'indagine citologica parallela però solo su 1/3 campioni di ascite e su nessun campione di liquido pleurico al momento del prelievo e della nostra indagine ma sospetto che è stato però confermato su tutti dopo circa

3-6 mesi di follow-up del paziente.

### CONCLUSIONI

L'impiego della citometria a flusso policromatica in



**Fig. 3. Analisi citofluorimetrica del liquido pleurico a fresco.** Nella figura sono rappresentati 4 diversi casi (A-B-C-D) di liquido pleurico analizzati a fresco al citofluorimetro. Oltre ai parametri morfologici di FSC e SSC, attraverso una strategia di gating sono messe in evidenza in tutti i casi le diverse popolazioni presenti come i linfociti (verde), eritroblasti (viola) e una variabile quantità di cellule CD45 negative (blu). All'analisi a fresco queste cellule CD45- mostrano in parte una certa positività ad antigeni tipicamente "mesenchimali" essendo CD44+CD10+CD90+CD105+. Solo nel caso C dal punto di vista citometrico è stata rilevata una popolazione di linfociti B clonali appartenenti alla malattia pregressa (LLC). L'indagine citologica di questi campioni è risultata negativa per la ricerca di cellule tumorali.

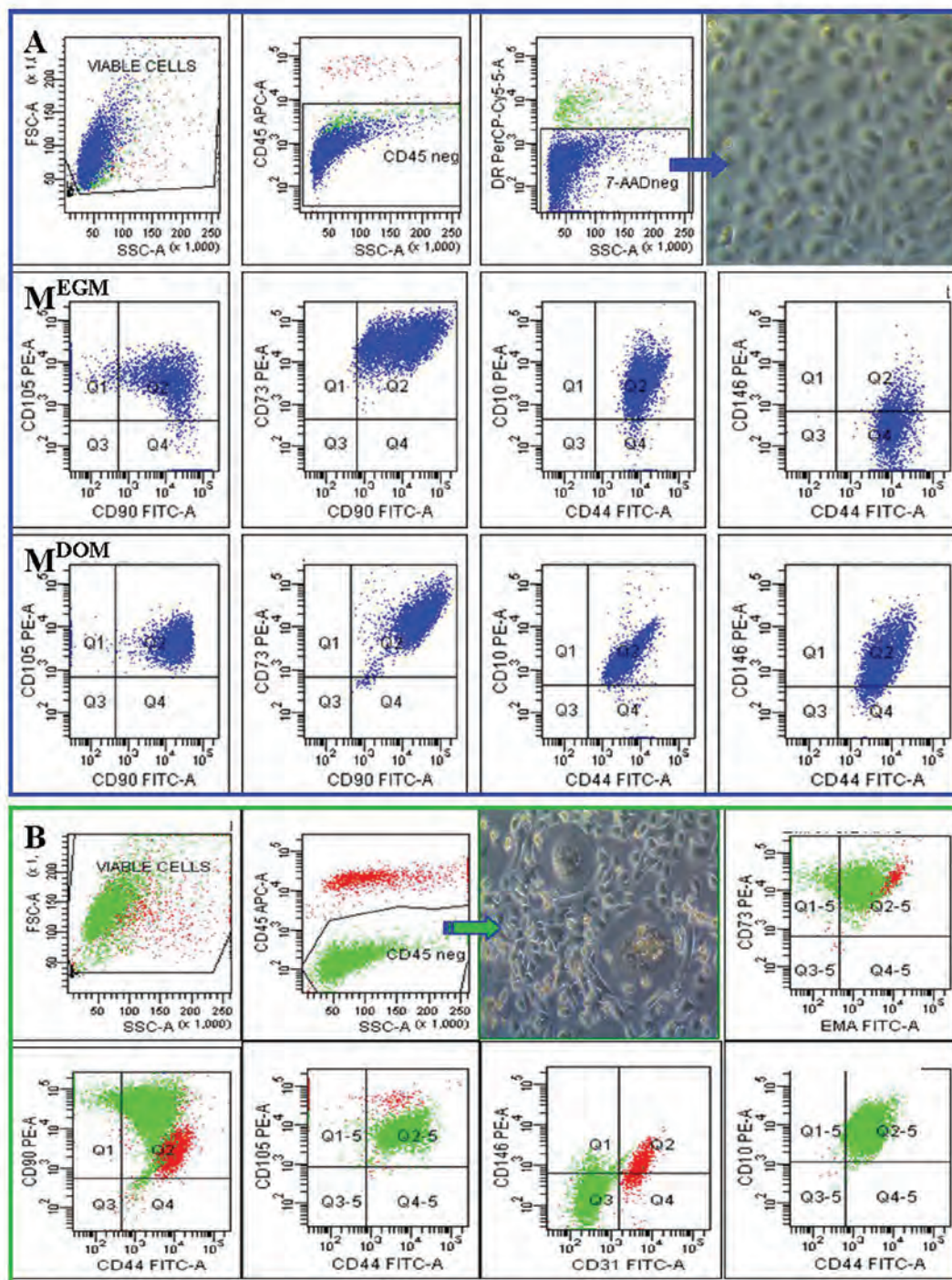
associazione a colture cellulari può rappresentare un valido supporto nell'analisi e nell'arricchimento di popolazioni di cellule neoplastiche presenti anche in bassissima percentuale in campioni di liquidi pleurici e ascitici, soprattutto in quei casi un cui l'indagine citologica è risultata negativa al momento del prelievo. La percentuale di cellule CD45 negative, il loro immunofenotipo a fresco e dopo espansione, nonché la valutazione del loro ciclo replicativo in coltura entro le 72h, e infine la loro mancata plasticità differenziativa possono costituire un'indicazione utile e tempestiva per selezionare quei pazienti candidati a rivalutazioni seriate di tipo diagnostico citologico, essenziali per chiarire la natura maligna e l'istotipo neoplastico delle cellule identificate.

#### BIBLIOGRAFIA

1) Pasquet M, Golzio M, Mery E, Rafii A, Benabbou N, Mirshahi P,

Hennebelle I, Bourin P, Allal B, Teissie L, J, Mirshahi M, Couderre B. Hospicells (ascites-derived stromal cell) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer* 2009; 126:2090-2101

- 2) Ho CM, Chang SF, Hsiao CC, Chien TY, Shih D TB. Isolation and characterization of stromal progenitor cells from ascites of patients with epithelial ovarian adenocarcinoma. *J Biomed Sc* 2012; 19:23-28
- 3) Pillai V, Cibas ES, Dorfmann DM. A simplified flow cytometric immunophenotyping procedure for the diagnosis of effusions caused by epithelial malignancies. *Am J Clin Pathol.* 2013; 139:672-681
- 4) Kentrou NA, Tsagarakis NJ, Tzanetou K, Damala M, Papadimitriou KA, Skoumi D, Stratigaki A, Anagnostopoulos NI, Malamou-Lada E, Athanassiadou P, Paterakis G. An improved flow cytometric assay for detection and discrimination between malignant cells and atypical mesothelial cells, in serous cavity effusions. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011 80:324-34.
- 5) Campioni D, Moretti S, Ferrari L, Punturieri M, Castoldi GL, Lanza F. Immunophenotypic heterogeneity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients with hematological disorders: correlation with bone marrow microenvironment. *Haematologica* 2006; 91: 364-368.
- 6) Campioni D, Moretti S, Ferrari L, Baricordi R, Rizzo R, Cuneo A.



**Fig. 4. Immunofenotipo dopo espansione in coltura.** Nel pannello A della figura è rappresentato il confronto immunofenotipico tra le cellule del carcinoma gastrico isolate dall'ascite coltivate parallelamente in due terreni di coltura dopo 7 giorni. L'analisi è stata condotta su cellule vitali, CD45-7AAD-. Si noti la variazione di espressione in particolare del CD90 e del CD146 a seconda se le cellule sono coltivate in terreno con citochine angiogeniche ( $M^{EGM}$ ) o con siero ( $M^{DOM}$ ). Nel pannello B invece è riportato un esempio di cellule mesoteliali normali coltivate e isolate da un liquido pleurico risultato negativo per la ricerca di cellule tumorali.

Aberrant expression of HLA-DR on MSC from patients affected by hematological disorders. Lanza F. *Leukemia* 2007 21:378-81.

- 7) Campioni D, Lanza F, Moretti S, Ferrari L, Cuneo A. Loss of Thy-1 (CD90) antigen expression on mesenchymal stromal cells from haematological patients may be induced by in vitro angiogenic stimuli and is associated with peculiar functional and phenotypic characteristics. *Cytotherapy* 2008; 10:69-82.
- 8) Bèné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, Lacombe F, Lemez F, Marinov I, Matutes E, Maynadiè M, Oelschlagel U, Orfao A, Schabath R, Solenthaler M, Tschurtschenthaler G, Vladareanu AM, Zini G, Faure GC, Porwit A. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferati-

ve disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet work package 10. *Leukemia* 2011; 25:567-574

- 9) Campioni D, Moretti S, Ferrari L, Spano C, Dominici M, Lanza F. Eterogeneita' immunofenotipica di cellule staminali mesenchimali dopo espansione ex vivo. *Lettere GIC* 2005 14:14-17
- 10) Esposito MT, Di Noto R, Mirabelli P, Gorrese M, Parisi S, Montanaro D, Del Vecchio L, Pastore L.. Culture conditions allow selection of different MSC progenitors from adult mouse bone marrow. *Tissue Eng. Part A* 2009; 15:124
- 11) Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD et al. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 2009; 94:258-263.

# Caratterizzazione morfologica e funzionale di una popolazione cellulare eterogenea presente nel liquido follicolare di ovaio umano

Federica Riva<sup>1</sup> e Claudia Omes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Unità Istologia ed Embriologia generale, Università di Pavia;

<sup>2</sup>Fondazione IRCSS Policlinico S. Matteo, Centro di Ricerca per la Procreazione Medicalmente Assistita, Ostetricia e Ginecologia, Pavia

e-mail: federica.riva01@unipv.it

## INTRODUZIONE

Il campo della biologia delle cellule staminali ed in particolare le ricerche sulle cellule staminali somatiche sono in continua evoluzione, con la caratterizzazione di molteplici tipi cellulari e con lo studio delle loro potenziali applicazioni sperimentali e cliniche (1).

Nei tessuti adulti la riserva di cellule staminali rappresenta una fonte di progenitori cellulari che operano *in vivo* nella riparazione tissutale e nel rinnovamento cellulare.

Tra le cellule staminali adulte, quelle mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells* o MSC), denominate anche cellule stromali midollari o cellule staminali stromali mesenchimali, costituiscono uno dei più promettenti tipi cellulari nell'ambito della medicina rigenerativa, grazie alla loro facile disponibilità da vari distretti tissutali umani, alla notevole capacità di generazione clonogenica *in vitro* e all'elevato potenziale di differenziamento cellulare in senso osteogenico, condrogenico, adipogenico (2). Si tratta di cellule immature multipotenti derivanti dal foglietto embrionale mesodermico e con un alto grado di staminalità, che garantisce sia la capacità di *self-renewal* sia la capacità di differenziarsi in un'ampia varietà di tipi cellulari. Queste proprietà hanno portato ad un largo impiego delle MSC nella medicina rigenerativa. Nonostante si conosca ancora relativamente poco sulla loro biologia e sul loro reale potenziale terapeutico, la metodologia usualmente impiegata per caratterizzarle *in vitro* è quella che sfrutta una combinazione di proprietà fisiche, morfologiche e funzionali (3). Sulla base delle loro caratteristiche immunologiche, della loro capacità di differenziare in molti tipi cellulari diversi e della relativa facilità con cui possono essere espanse in coltura, le cellule staminali mesenchimali possono così essere considerate una promettente fonte di cellule staminali da impiegare nel campo clinico della rigenerazione dei tessuti e della terapia genica (1). Questo anche grazie all'ampio e consolidato sviluppo di tecniche di coltura e amplificazione *in vitro* nonché di metodi innovativi di indagine.

Tra le cellule staminali mesenchimali derivanti da distretti anatomici differenti, le più studiate sono quelle isolate dal midollo osseo. Quest'ultimo contiene, oltre alle cellule staminali emopoietiche, che daranno origine ai progenitori ematici, e oltre ai progenitori endoteliali implicati nell'angiogenesi, anche cellule staminali stro-

mali non-ematopoietiche di tipo mesenchimale (4). È da tempo riconosciuto che le cellule staminali derivate da midollo osseo giocano un ruolo fondamentale nei processi di cicatrizzazione delle ferite *in vivo*, contribuendo al rinnovamento cellulare del pool di cellule staminali richieste per il mantenimento e la riparazione del tessuto e/o dell'organo (5).

Un'ampia letteratura scientifica documenta che progenitori cellulari multipotenti, in grado di esibire un fenotipo mesenchimale e capaci di differenziare in distinti tipi cellulari, sono stati isolati da vari distretti tissutali diversi dal midollo osseo quali la polpa dentaria, il tessuto adiposo, il sangue di cordone ombelicale, il liquido amniotico, le membrane fetali e i tessuti placentari (5,6,7). Da recenti interessanti ricerche è emerso che progenitori mesenchimali possono risiedere anche nella tonaca albuginea dell'ovaio umano adulto, andando incontro, attraverso una transizione mesenchimale-epiteliale, ad un differenziamento sequenziale nei componenti di nuovi follicoli primari, quali le cellule della granulosa o addirittura cellule germinali (8), rimettendo così in discussione il dogma in base al quale tutti gli ovociti presenti nelle femmine adulte di mammifero si originano esclusivamente durante il periodo di sviluppo fetale. È stato inoltre mostrato che presunte cellule staminali della teca follicolare esistono nell'ovaio neonatale, da dove possono essere isolate e clonate *in vitro* (9). Derivato dal processo di maturazione del follicolo ovarico primario, il follicolo ovarico maturo di Graaf è costituito da 3 componenti peculiari, ovvero il liquido follicolare, un unico ovocita maturo e qualche migliaia di cellule della granulosa (GC). Il liquido follicolare rappresenta il liquido contenuto nel follicolo ovarico maturo che viene parzialmente espulso con l'ovocita al momento dell'ovulazione in condizioni fisiologiche. Per quanto riguarda le cellule GC luteinizzanti a livello del follicolo di Graaf, si tratta di cellule con numerose funzioni specializzate per l'attività follicolare, dalla produzione di una grande quantità di estradiolo al controllo dell'attività dell'ormone FSH, dal nutrimento dell'ovocita alla mediazione della comunicazione dell'ovocita stesso con le cellule della teca. Le cellule GC pertanto sono state a lungo considerate cellule differenziate a livello terminale e destinate a degenerare dopo l'ovulazione, per essere rimpiazzate da piccole cellule della teca follicolare circostante. Un recente lavoro ha però

dimostrato che cellule GC luteinizzanti, se coltivate *in vitro* con opportuni fattori di crescita, mostrano una potenzialità proliferativa e differenziativa propria delle cellule staminali mesenchimali (10,11).

Alla luce di questi recenti studi sulla localizzazione di cellule staminali a livello ovarico e vista la dibattuta questione sulla derivazione degli ovociti umani e dei follicoli primari è nata l'idea di analizzare la componente cellulare del liquido follicolare di ovaio umano maturo, scartato di routine durante le normali procedure di prelievo di ovociti per la fecondazione medicalmente assistita. Tale liquido biologico viene normalmente eliminato a seguito dell'isolamento degli ovociti e pertanto potrebbe diventare una fonte alternativa di MSC.

La nostra ricerca ha focalizzato l'interesse sulla caratterizzazione morfologica e funzionale delle popolazioni cellulari isolate dal liquido follicolare raccolto durante le procedure di *pick-up* ovocitario da pazienti infertili (n = 165) sottoposte a tecniche di fertilizzazione *in vitro* (12). Le cellule sono state mantenute *in vitro* in condizioni standard di coltura, ma con terreno privo di fattori di crescita specifici per le cellule staminali mesenchimali (come il *leukemia-inhibiting factor*, LIF). È stata effettuata una valutazione comparativa con cellule staminali mesenchimali isolate da midollo osseo umano (BM-MSC), come controllo positivo.

Per studiare questa popolazione cellulare, i campioni sono stati analizzati mediante l'impiego di diverse tecniche tra cui il saggio clonogenico, l'analisi immunohistochimica e citofluorimetrica e l'uso di tecniche immunomagnetiche (13) (vedi Pannello Materiali e Metodi). È stata verificata la plasticità delle cellule isolate mediante l'induzione del differenziamento in senso osteogenico e condrogenico, verificando rispettivamente la formazione di depositi di calcio con colorazione Von Kossa e la presenza di proteoglicani e glucosaminoglicani rivelata con Alcian blue. Esperimenti preliminari di screening molecolare basato sulla tecnica dell'RT-PCR sono stati inoltre avviati parallelamente a supporto ed integrazione delle analisi morfologiche, per un pannello di marcatori più ampio al fine di meglio caratterizzare la popolazione dei precursori isolati e di individuare sottopopolazioni specifiche scarsamente rappresentate nel campione (14). L'RNA totale è stato estratto da campioni paralleli a quelli su cui sono state condotte le indagini immunocitochimiche, operando su cellule appena isolate o mantenute a breve o lungo termine in terreno di coltura minimo. Gli RNA sono stati retrotrascritti in cDNA che costituiscono il materiale di partenza per lo screening per RT-PCR. Per la popolazione cellulare con potenzialità staminale è stata effettuata una valutazione comparativa con le MSC derivate da midollo osseo umano, utili come controllo positivo di reazione.

Per confermare questa caratteristica plasticità cellulare sono in corso studi per testare la capacità delle cellule isolate da liquido follicolare di crescere su scaffold tridi-

dimensionali di cryogel gelatinoso, materiale molto promettente per la sua biocompatibilità, in particolare nel campo della chirurgia ricostruttiva dell'osso (15,16).

## MATERIALI E METODI

### **Campionamento e raccolta dei liquidi follicolari.**

Liquidi follicolari di ovaio umano raccolti durante le procedure di *pick-up* ovocitario da pazienti infertili (n = 165) sottoposte a tecniche di fertilizzazione *in vitro*. Prelievo transvaginale con ago per *pick-up* ovocitario eseguito sotto guida ecografica. Liquidi follicolari residui (FL), privati degli ovociti e sottoposti a centrifugazione in gradiente di densità (Lymphoprep) per 30 min a 1800 rpm. Recupero del *buffy coat* contenente la popolazione cellulare. 2 centrifugazioni da 15 min a 1200 rpm. Risospensione del pellet cellulare con terreno di coltura.

**Colture cellulari.** Cellule isolate suddivise in aliquote (~10<sup>6</sup> cellule) per analisi in sospensione con citometro a flusso, oppure semina *in vitro* a concentrazioni differenti su vetrino (12 mm Ø) o in fiasche di plastica. Terreno di coltura: D-MEM (Sigma-Aldrich) addizionato con 10% siero fetale bovino (EuroBio), 2mM L-glutamina, 100 µg/ml penicillina/streptomicina (EuroBio). BM-MSC nelle stesse condizioni di coltura.

**Saggio di Formazione delle Colonie (CFU-F).** Cellule seminate in triplo in piastre multiwell da 6 pozzetti (35mmØ) a differenti concentrazioni e in terreno completo. Dopo 13 giorni, fissazione con PFA 4% e colorazione con 0.5% Crystal Violet (Sigma-Aldrich).

**Analisi dell'attività proliferativa: incorporazione di BrdU.** Incubazione con Bromodesossiridina (BrdU) [30 µM] aggiunta al terreno durante l'ultima ora di coltura. Fissazione con EtOH 70% e idrolisi con HCl 2N. Immunomarcatura con anticorpo primario monoclonale anti-BrdU (Amersham) (1:100) e anticorpo secondario anti-mouse FITC-coniugato (1:100). Controcolorazione nucleare con Hoechst 33258 (0,5 µg/ml).

**Immunocitochimica.** Fissazione cellule su vetrino con 4% paraformaldeide (15 min) e post-fissazione con 70% EtOH. Soluzione PTA (1% BSA e 0.02% Tween20 in PBS) per bloccare siti aspecifici. Incubazione per 1h a T ambiente con anticorpi primari, diluiti 1:100 in PTA [anti-pan-citocheratine (Bachem,UK); anti-vimentina (Biogenex, USA); anti-CD105, anti-CD44 e anti-CD34 (Biogenex); anti-neurofilament 200 (Sigma-Aldrich); anti-PGP 9.5 (Dako)]. Incubazione per 30 min con anticorpi secondari anti-mouse e anti-rabbit FITC-coniugati, diluiti 1:100 in PTA. Colorazione nucleare con Hoechst 33258 (0,5 µg/ml). Vetrini montati con Mowiol (Sigma-Aldrich). Osservazioni con microscopio a fluorescenza Zeiss Axiophot e immagini acquisite con camera digitale Coolpix 950 (Nikon).

**Citometria a flusso.** Fissazione cellule in sospensione con 70% EtOH per 10 min a -20°C. Blocco con soluzione PTA per 20 min. Incubazione (1 h) con anticorpi primari per CD105, CD44, CD90, CD66 (Biogenex),

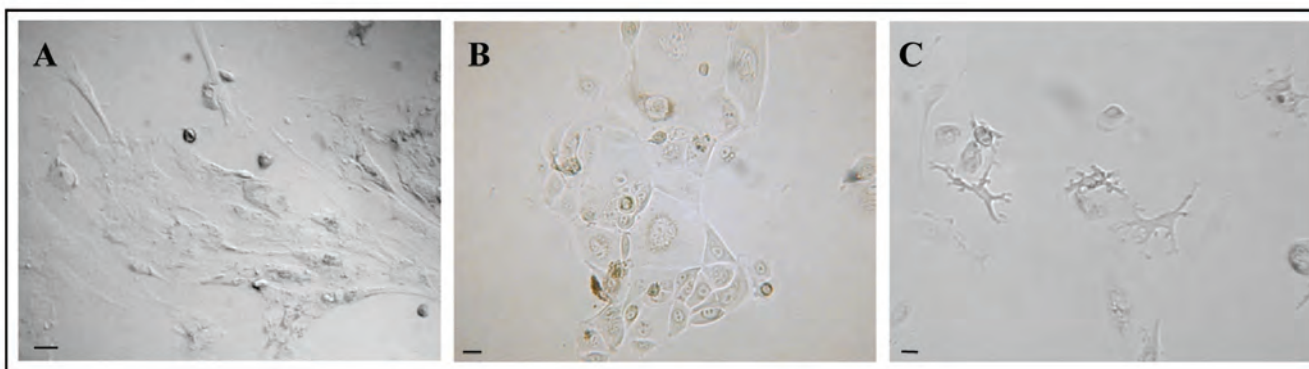


Fig. 1 Colture cellulari primarie derivate da liquido follicolare di ovaio umano seminate su vetrino e mantenute *in vitro* per tempi differenti in condizioni minime di coltura. A 7 giorni le colonie sono costituite da una popolazione cellulare eterogenea che contiene almeno 2 tipi cellulari, con morfologia allungata fibroblastoide (A) e con aspetto epiteliale (B). Alcune cellule presentano protrusioni citoplasmatiche e un ampio corpo cellulare sferico simile al fenotipo neurale (C). Scale bar 10  $\mu\text{m}$ .

CD90, (BioCompare), CD34 (BD PharMingen) e CD45 (Diacione), diluiti 1:100. Incubazione (30 min) con anticorpo secondario FITC-coniugato (1:100). Analisi citofluorimetrica con citometro a flusso Partec PAS II.

**Separazione immunomagnetica.** Separazione cellule CD44<sup>+</sup> mediante reagenti CELLection Dynabeads (Invitrogen) e sistema di microseparazione magnetica su vetrino "Microcount" proposto da Mazzini (27,28). Incubazione (1h, 4°C) del campione cellulare con anticorpo primario anti-CD44 (BioGenex), diluito 1:100 in PTA. Incubazione per 30 min con microsferi di polistirene superparamagnetiche (25  $\mu\text{l}$  per ogni campione), di dimensioni uniformi (4,5  $\mu\text{m}$  Ø), rivestite con anticorpo monoclonale anti-mouse.

**Induzione differenziamento.** In senso *osteogenico*: DMEM con 10% FBS, 0.1 mM acido ascorbico 2-fosfato,  $10^{-2}$  M  $\beta$ -glicerofosfato,  $10^{-8}$  M dexametasone (Sigma) per 2 settimane. Colorazione Von Kossa (Bio-Optica) (10). In senso *condrogenico*: DMEM con 10% FBS, 0.1 mM acido ascorbico 2-fosfato, 10 ng/ml TGF  $\beta$ 1,  $10^{-7}$  M dexametasone, ITS-1 (Sigma) per 2 settimane. Colorazione con Alcian blue (BioCare).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Da una prima osservazione microscopica delle colture di cellule isolate da liquido follicolare di ovaio umano e cresciute spontaneamente *in vitro* in terreno contenente soltanto il siero bovino è emerso che tali cellule presentano la capacità di aderire al substrato di coltura. Questa capacità risulta essere una caratteristica distintiva delle cellule mesenchimali stromali rispetto alle cellule ematopoietiche del midollo osseo (17). L'analisi morfologica delle colture ottenute ha rivelato una crescita cellulare in *cluster* di dimensioni differenti, costituiti da una popolazione cellulare eterogenea, con cellule dal fenotipo epiteliale, fibroblastoide e neurale (Fig.1). Queste osservazioni corrispondono alle caratteristiche morfologiche comunemente descritte per definire le MSC *in vitro* (3) e sono confrontabili con i risultati di recenti studi relativi alle colture *in vitro* di cellule staminali mesenchimali isolate da midollo osseo umano, che indicano un'eterogeneità morfologica delle colonie derivate da una singola cellula, contenenti almeno due differenti tipi cellulari, rispettivamente dalla forma fusata e prismatica (18).

L'attività proliferativa e la capacità di formare colonie

sono state valutate a differenti tempi di coltura in condizioni minime di crescita, come precedentemente descritto. Un metodo standard *in vitro* per valutare il potenziale proliferativo mesenchimale è rappresentato dal saggio delle unità formanti colonie fibroblastiche (CFU-F), in cui le MSC umane espanse in coltura danno origine a colonie che possiedono un'estesa capacità proliferativa (19), caratterizzata dalla formazione di piccole cellule che rigenerano rapidamente e grandi cellule che si rinnovano lentamente (20). Poiché questa proprietà è spesso considerata caratteristica peculiare delle cellule dotate di staminalità mesenchimale è stato effettuato un saggio clonogenico sui campioni di cellule isolate dai liquidi follicolari per verificarne la rispondenza rigenerativa. La formazione di colonie è stata osservata a 13 giorni di coltura partendo da un'elevata concentrazione iniziale di cellule, che hanno originato numerosi piccoli cluster (con un numero di cellule inferiore a 50) ed estese colonie ( $n^{\circ}$  cellule > 200). (Fig.2)

Per cercare un riscontro tra l'intensa attività proliferativa associata alla staminalità mesenchimale delle cellule BM-MSc e le cellule isolate da liquido follicolare di ovaio umano è stata effettuata un'analisi morfologica immunofluorescente dell'incorporazione nucleare di bromodesossitimidina (BrdU), un analogo della timidina che viene incorporato nella molecola di DNA dalle cellule in fase S del ciclo cellulare. I quadri morfologici relativi ai differenti tempi di coltura delle cellule cresciute su vetrino sono risultati paragonabili tra loro per l'intensa positività di marcatura, presente sempre in oltre il 50% delle cellule considerate. Dal calcolo dell'indice proliferativo è emerso un andamento percentuale a decorso ondulatorio, in base al quale le cellule mostrano un'attività proliferativa elevata nei primi 10 giorni di coltura (come atteso per le caratteristiche di staminalità mesenchimale) (21), per poi ridursi significativamente del 20% circa nella settimana successiva e subire un'ulter-

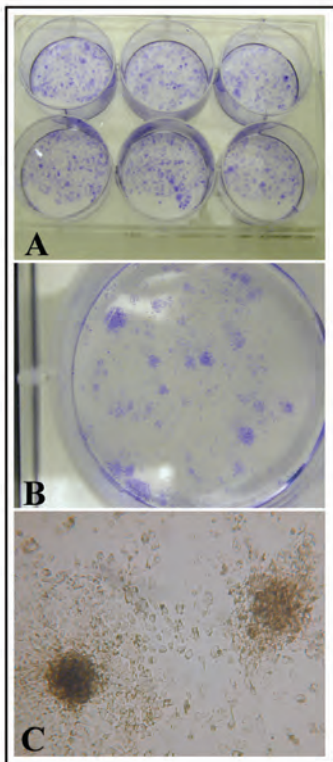


Fig. 2 CFU-F (Unità Formanti Colonie Fibroblastoidi) ottenute dopo 13 giorni dalla semina (in triplo per 2 volte) della popolazione cellulare eterogenea presente nel liquido follicolare di ovaio umano. La capacità clonogenica delle cellule è stata valutata analizzando sia i piccoli cluster cellulari sia le colonie espanse, facilmente identificabili in seguito a colorazione con Crystal violetto (A,B). Colonie in coltura osservate al microscopio rovesciato (C). Obiettivo 10X.

riore aumento negli ultimi giorni di coltura. Questo dato potrebbe trovare spiegazione

nell'impiego del protocollo sperimentale adottato, che prevede l'assenza di fattori di crescita cellulare, con il conseguente rallentamento dell'attività proliferativa in un arco di tempo di 15 giorni. Dopo 3-4 settimane, le cellule degenerano e, staccandosi dalla plastica, vengono eliminate con i successivi cambi di terreno, creando una significativa diminuzione del numero totale di cellule presenti ed adese al vetrino, che giustifica l'aumento percentuale di positività relativa alle cellule restanti.

L'espressione di caratteristiche proteine citoplasmatiche presenti nelle cellule di origine mesenchimale è stata dimostrata mediante reazioni immunofluorescenti sulle cellule isolate e cresciute su vetrino a tempi differenti di coltura. L'analisi morfologica ha rivelato che già a pochi giorni dalla semina, tutte le cellule adese hanno mostrato una positività citoplasmatica per vimentina, marcatore caratteristico delle cellule mesenchimali (Fig. 3A,F). Tutte le cellule sono risultate negative per l'espressione di citocheratine (CK), proteine specifiche del tessuto epiteliale (Fig. 3B,G). Queste osservazioni sono state supportate da una valutazione quantitativa delle cellule positive per vimentina e negative per citocheratine sul totale delle cellule contate. I dati raccolti rivelano che tutte le cellule risultano sempre positive alla vimentina (100%) e negative per l'espressione di citocheratine, se non per una minima percentuale di cellule positive CK+ apprezzabile nelle prime 24h; percentuale che si riduce drasticamente già a partire dalle 48h e per i tempi successivi, fino quasi a scomparire a 20 giorni. I risultati ottenuti sono stati convalidati mediante analisi con t test, che ha permesso di evidenziare differenze statisticamente significative ( $3,30 \times 10^{-10}$ ). Ciò può essere attribuito ad una contaminazione del liquido follicolare di cellule della

superficie epiteliale dell'ovaio durante la procedura di prelievo degli ovociti ed aspirazione del follicolo. E' probabile che in presenza di cellule mesenchimali vimentina-positiv e caratterizzate da un'intensa attività proliferativa, le poche cellule CK+ in coltura perdano le proprie capacità replicative e degenerino staccandosi dalla fiasca. Diversamente, queste cellule citocheratine-positiv potrebbero rappresentare l'esiguo numero di quelle cellule progenitrici mesenchimali CK+ che risiedono nella tonaca albuginea ovarica (22).

L'immunofenotipo è stato analizzato osservando anche la presenza di espressione di alcuni antigeni di superficie specifici delle MSC, quali CD44 ed endoglina CD105. L'analisi morfologica in immunofluorescenza mostra una spiccata positività di membrana per l'antigene CD44 e un'intensa espressione citoplasmatica di endoglina CD105 (Fig. 3 C,H,D,I). Le cellule mostrano una negatività per CD34, antigene normalmente espresso dalle cellule endoteliali ed emopoietiche umane, utilizzato in questa analisi come controllo negativo (23) (Fig. 3 E,L).

Alcune tra le cellule con morfologia *neural-like* mostrano un'intensa immunomarcatura citoplasmatica per i neurofilamenti e il fattore PGP 9.5, marcatori di tipi cellulari di origine nervosa. Sono ancora in corso di studio analisi immunocitochimiche ed ultrastrutturali per comprenderne in dettaglio l'organizzazione citologica.

L'analisi in citometria a flusso ha confermato i dati immunocitochimici per quanto riguarda l'elevata espressione di CD105, CD44 e CD90 (molecola di adesione associata alla staminalità mesenchimale) (2, 24) (Fig. 4). Sebbene sussista un 25% di cellule positive a CD45, la maggior parte delle cellule analizzate non esprime l'antigene. È stato quindi ipotizzato che questa positività possa essere dovuta alla presenza contaminante di residui ematici rimasti nelle provette nonostante il campione di liquido follicolare sia stato sottoposto a separazione per gradiente di densità (25). La popolazione cellulare isolata da liquido follicolare ovarico non esprime positività per gli antigeni CD66 e CD34, analogamente alle cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo.

Dati preliminari di screening molecolare per specifici *markers* di linee cellulari hanno confermato la presenza di differenti citotipi nei campioni di liquido follicolare ovarico.

La multipotenza della popolazione cellulare derivata da liquido follicolare ovarico è stata saggiata *in vitro* mediante l'induzione del differenziamento in senso osteogenico e condrogenico, successivamente evidenziato con le colorazioni Von Kossa e Alcian blue. In particolare, tutte le cellule osteo-differenziate sono risultate positive alla colorazione Von Kossa, a dimostrazione della presenza di depositi di calcio così come risulta nel controllo positivo impiegato (BM-MS) (Fig. 5). Per il differenziamento condrogenico si evidenzia la formazione di gruppi isogeni in coltura e tutte le cellule differenziate in senso condrogenico presentano un'elevata attivi-



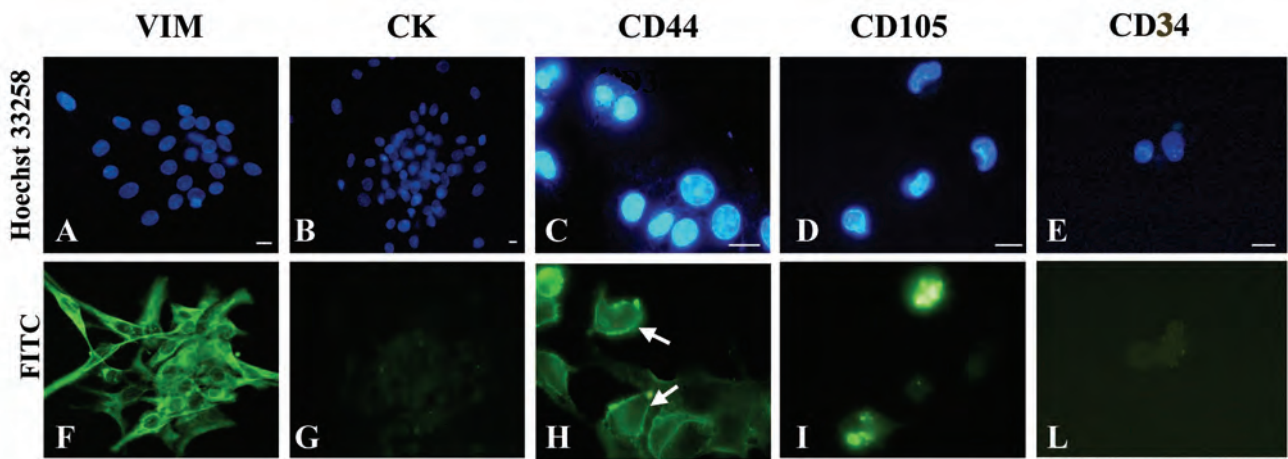


Fig. 3 Cellule isolate da liquido follicolare umano ed espanse in vitro su vetrino per 7 giorni. Immunomarcatura per vimentina (VIM), citocheratine (CK), CD44, CD105, CD34 (FITC, fluorescenza verde). Nuclei controcolorati con Hoechst 33258 (fluorescenza blu). Le cellule mostrano un'intensa positività per CD44, identificata sulla membrana plasmatica (H, frecce), e per CD105 citoplasmatica. Tutte le cellule sono negative per CD34 (L). Scale bar: 10  $\mu$ m.

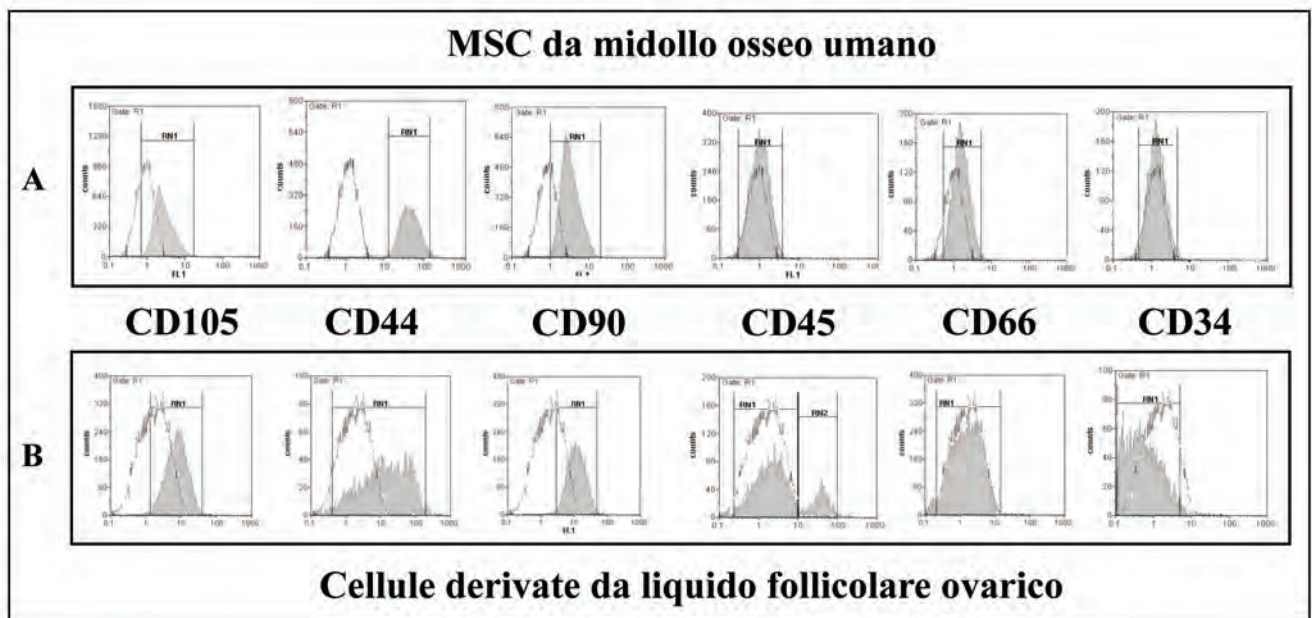


Fig. 4 Analisi citofluorimetrica dell'espressione degli antigeni di superficie CD105, CD44, CD90, CD45, CD66 e CD34 in cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo (A) e in cellule presenti nel liquido follicolare di ovaio umano al momento del prelievo  $t=0h$  (B). L'analisi è stata effettuata con citometro a flusso Partec PAS II. Gli istogrammi indicano l'espressione di immunofluorescenza dell'intera popolazione cellulare (grafico grigio) relativa ai differenti markers considerati (asse delle ascisse FL1): la percentuale delle cellule positive è delineata dalla regione rettangolare confrontata con il profilo citometrico del background (grafico "bianco").

tà di sintesi di proteoglicani e glicosaminoglicani, evidenziata in blu con colorazione Alcian.

Nell'ambito dell'ingegneria tissutale e della rigenerazione tissutale *in situ*, le cui potenzialità hanno determinato un notevole impulso alla ricerca negli ultimi anni, ulteriori analisi hanno avuto come obiettivo di verificare l'adesione delle cellule staminali mesenchimali da liquido follicolare al supporto tridimensionale di cryogel (supporto gelatinoso in dischi del  $\varnothing$  10mm e spessore 2mm), identificando le cellule sulla base di colorazioni nucleari fluorescenti (Hoechst 33258). Analisi preliminari al microscopio confocale e al microscopio elettronico a scansione (strumenti che permettono tra l'altro di valutare il grado di penetrazione cellulare nello spessore

della matrice) hanno inoltre dimostrato che le cellule del liquido follicolare sono capaci di crescita cellulare su supporti 3D di cryogel, interagendo perfettamente con la struttura del biomateriale, aderendo sia alla superficie superiore sia addentrandosi negli interstizi fino agli strati sottostanti per una profondità di 60 $\mu$ m. Le cellule sono state successivamente immunomarcate per vimentina e l'analisi al microscopio confocale dell'espressione citoplasmatica della proteina ne suggerisce l'effettiva natura mesenchimale. Come naturale sviluppo della ricerca, si potrà procedere alla verifica di un eventuale miglioramento delle capacità proliferative e differenziative di queste cellule multipotenti da liquido follicolare su altri supporti tridimensionali. Utilizzando opportune condi-

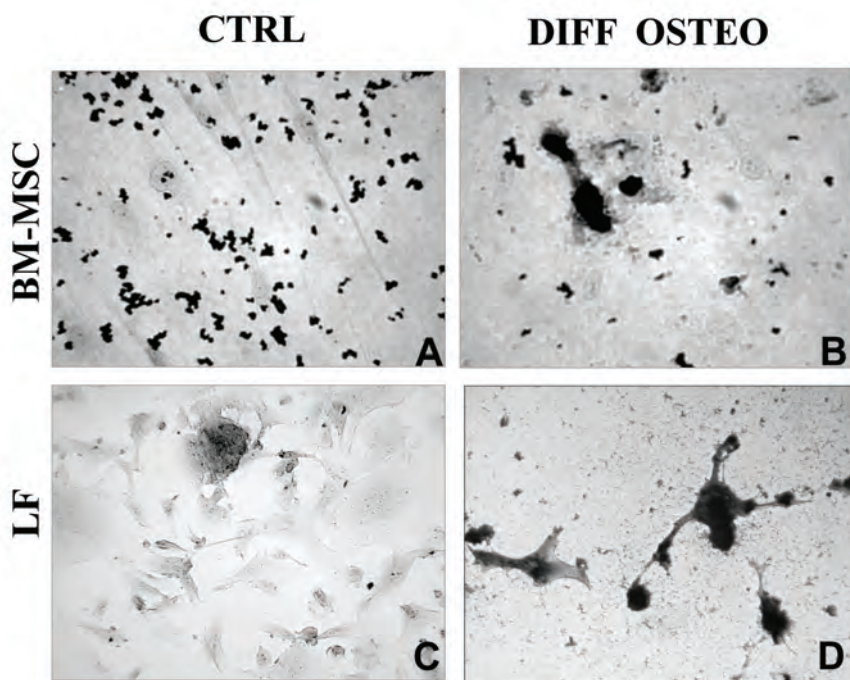


Fig. 5 Differenziamento osteogenico indotto in cellule staminali mesenchimali da midollo osseo (BM-MSC) e in cellule isolate da liquido follicolare ovarico (LF). Colorazione Von Kossa nel controllo (CTRL) e nei campioni indotti (DIFF OSTEO).

zioni di crescita, si indurrà in seguito il differenziamento cellulare in senso osteogenico delle cellule adese al supporto, con l'intento di ottenere dei costrutti tridimensionali ossei, da analizzare morfologicamente mediante le colorazioni istochimiche menzionate in precedenza.

Il metodo di marcatura con microsferi magnetiche ha permesso di individuare e di isolare la sottopopolazione di cellule CD44+ purificata dal campione fresco di liquido follicolare ovarico, separandola direttamente su vetrino dalle restanti cellule, per un'ulteriore caratterizzazione in microscopia sia convenzionale che in fluorescenza (Fig. 6). La marcatura è facilmente riconoscibile in quanto le microsferi si legano alle cellule positive CD44+ disponendosi attorno alla membrana in modo da formare delle rosetture caratteristiche. I risultati hanno mostrato numerose cellule rivestite da almeno 4-5 microsferi associate alla superficie, che ne determinano la positività di espressione dell'antigene e l'efficienza di separazione della procedura.

Rispetto alla tradizionale separazione immunomagnetica tramite colonna (26), in questo caso il supporto è costituito da una piastra multipozzetti con i magneti alloggiati al fondo degli stessi pozzetti. La cattura delle cellule positive d'interesse può quindi avvenire direttamente al fondo dei pozzetti oppure su vetrini adagiati direttamente al fondo di questi. Il vantaggio di questo nuovo approccio di separazione immunomagnetica è proprio mirato ad ottimizzare la cattura di sottopopolazioni cellulari numericamente scarse il cui recupero diventa difficile se "catturate" nelle tradizionali colonne di separazione commerciali. Un ulteriore aspetto di innovazione è la possibilità di ottenere le rare cellule separate direttamente su vetrino, per una loro ulteriore caratterizzazione morfologica.

In conclusione, sebbene già studi precedenti abbiano dimostrato la presenza di cellule staminali mesenchimali nei follicoli ovarici umani, risulta comunque di notevole interesse l'osservazione che sia possibile ottenere tali cellule da

un liquido biologico di solito scartato durante le consuete procedure per la fecondazione medicalmente assistita. Nonostante rappresenti ad oggi ancora un punto di discussione e controversie il problema di come definire le cellule MSC, poiché non esistono saggi quantitativi per verificarne la presenza in una data popolazione né peculiarità comuni tra tutte le specie e in tutti i laboratori, tali cellule sono classificate sulla base di una combinazione di proprietà fisiche, morfologiche, fenotipiche e funzionali (27). I risultati morfologici e immunofe-

notipici finora ottenuti in questo lavoro di ricerca e relativi al contenuto cellulare dei liquidi follicolari di ovaio umano suggeriscono la presenza di una popolazione cellulare eterogenea, contenente anche cellule staminali mesenchimali che, in minime condizioni di coltura, presentano caratteristiche sovrapponibili alle MSC derivate da midollo osseo. Per questo, il liquido follicolare potrebbe essere considerato una fonte alternativa di MSC. Non si può comunque escludere che le altre sottopopolazioni cellulari contenute nel liquido prelevato possano influenzare il potenziale clonogenico e differenziativo delle stesse cellule staminali mesenchimali co-presenti.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Barry F. P. and Murphy J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 568-584 (2004).
- 2) Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. . Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
- 3) Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells, *Cell tissue Kinet.* **3** (4): 393-403 (1970).
- 4) Deans R.J. and Moseley A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.* **28**, 875-874 (2000).
- 5) Klingemann H., Matzilevich D., Marchand J. Mesenchymal stem cells-sources and clinical applications. *Transfus. Me. Hemother.* **35**, 272-277 (2008).
- 6) Erices A., Conget P., Minguell J.J. Erices A., Conget P., Minguell J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* **109**: 235-242 (2000).
- 7) Tsai M.S., Lee J.L., Chang Y.J., Hwang S.M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human Reproduction*, **19** (6): 1450-1456 (2004).
- 8) Bukovsky A., Svetlikova M., Caudle M.R. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **3**: 17 (2005a).
- 9) Honda A., Hirose M., Hara K., Matoba S., Inoue K., Miki H., Hiura H., Kanatsu-Shinohara M., Kanai Y., Kono T., Shinohara T., Ogura A. Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentia-

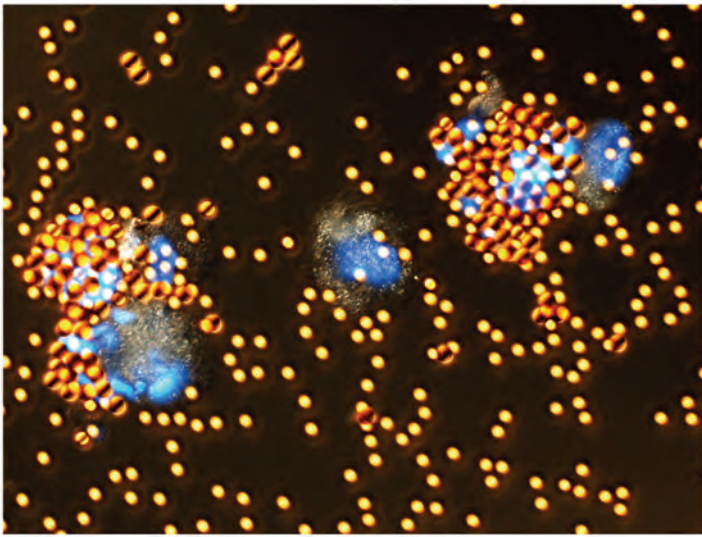


Fig. 6 Sottopopolazione di cellule CD44+ purificata da liquido follicolare di ovaio umano, isolata direttamente su vetrino mediante il sistema di microsferre magnetiche. Le cellule CD44+ (circa il 20%) sono legate alle microsferre, che si dispongono attorno alla membrana, creando rosetture caratteristiche. I nuclei sono controcolorati con Hoechst 33258 (fluorescenza blu).

- tion of putative thecal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12389-12394 (2007).
- 10) Kossowska-Tomaszczuk K., De Geyter C., De Geyter M., Martin I., Holzgreve W., Scherberich A., Zhang H. The multipotency of luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian follicles. *Stem Cells* **27**, 210-219 (2009).
  - 11) Heng B.C., Cao T., Basted S.M., Tong G.Q., Ng S.C. "Waste" follicular aspirate from fertility treatment-a potential source of human germline stem cells? *Stem Cells Dev.* **14**, 11-14 (2005).
  - 12) Riva F., Omes C., Bassani R., Nappi R.E., Mazzini G., Icaro Cornaglia A., Casasco A. Heterogeneous cell populations with clonal potential derived from waste human ovarian follicular fluid. *In Submission* 2013.
  - 13) Riva F., Omes C., Icaro Cornaglia A., Casasco M., Casasco A., Tinelli C., Calligaro A., Mazzini M. A new immunomagnetic separation approach applied to the separation of mesenchymal stem cells subpopulation. *Cytometry Part A*, **77A**: 191, 2010. ISSN 1552-4922.
  - 14) Polimeni M., Omes C., Mazzini G., Riva F. Heterogeneous cell population derived from human ovarian follicular liquid: morphological studies and molecular screening. *It J Anat. Embryol.* Vol. **117**, suppl. 1, 147, 2012; ISSN 1122-6714.
  - 15) Dubruel P., Unger R., Vlierberghe S.V., Cnudde V., Jacobs P.J., Schacht E. Porous gelatin Hydrogels: 2. In vitro cell interaction study. *Biomacromolecules* **8**: 338-344 (2007).
  - 16) Kossowska-Tomaszczuk K., Pelczar P., Güven S., Kowalski J., Volpi E., De Geyter C., Scherberich A. A novel three-dimensional culture system allows prolonged culture of functional human granulosa cells and mimics the ovarian environment. *Tissue Eng Part A*. **16**(6): 2063-2073 (2010).
  - 17) Abedin M., Tintut Y., Dener L.L. Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circul Res.* **95**(7): 671-676 (2004).
  - 18) Bobis S., Jarocha D., Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* **44**(4): 215-230 (2006).
  - 19) Dazzi F., Ramasamy R., Glennie S., Jones S.P., Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haematopoiesis. *Blood Rev.* **20** (3):161-171 (2006).
  - 20) Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C.M. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* **98** (9): 2615-2626 (2001).
  - 21) Weissman I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**(1): 157-168 (2000).
  - 22) Bukovsky A., Caudle M.R., Svetlikova M., Upadhyaya N.B. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* **2**: 20 (2004)
  - 23) Stella C.C., Cazzola M., De Fabritius P., De Vincentiis A., Gianni A.M., Lanza F., Lauria F., Lemoli R.M., Tarella C., Zanon P., Tura S. CD-34 positive cells: biology and clinical relevance. *Haematologica* **80**: 367-387 (1995).
  - 24) Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. Human

- adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* **13**(12): 4279-4295 (2002).
- 25) Kucia M., Reza R., Jala V.R., Dawn B., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Bone marrow as a home of heterogeneous populations of non hematopoietic stem cells. *Leukemia* **19**(7): 1118-1127 (2005).
  - 26) Aslan H., Zilberman Y., Knadel L., Liebergall M., Oskouiab R.J., Gazit D., Gazit Z. Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD05+ cells. *Stem Cells* **24**(7): 1728-1737 (2006).
  - 27) Javazon E.H., Beggs K.J., Flake A.W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passagin. *Exp Hematol.* **32**(5): 414-425 (2004).
  - 28) Della Porta M.G., Malcovati L., Rigolin G.M., Rosti V., Bonetti E., Travaglino E., Boveri E., Galli A., Boggi S., Ciccone M., Pramparo T., Mazzini G., Invernizzi R., Lazzarino M., Cazzola M. immunophenotypic, cytogenetic and functional characterization of circulating endothelial cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **22**(3): 530-537 (2008).
  - 29) Danova M., Torchio M., Mazzini G. Isolation of rare Circulating Tumour Cells in cancer patients: technical aspects and clinical implications. *Exp Rev Mol Diagn*, **11**: 473-485 (2011).

**Il presente lavoro è stato sostenuto dalla Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, Ricerca Corrente 2007 (Prot. # 20070000260, 2007) e approvato dal Comitato Bioetico IRCCS (Prot. # 20080002153, 2008).**

**Tutte le procedure sperimentali e cliniche sono state effettuate dopo appropriata informazione e consenso della paziente, in accordo con il Comitato Etico IRCCS e conformi agli standard etici internazionali sulla sperimentazione. I protocolli relativi all'impiego delle cellule staminali sono in accordo con le regole internazionali del Good Clinical Practice e con la normativa vigente in ambito nazionale.**

#### RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro [estratto di tesi di Dottorato di Ricerca in Bioingegneria e Bioinformatica (XXIV CICLO-2011) della Dr.ssa Claudia Omes] è stato realizzato grazie all'attiva collaborazione tra la Sezione di Istologia ed Embriologia generale dell'Università degli Studi di Pavia (Dip. Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università di Pavia) e il Laboratorio del Centro di Ricerca per la Procreazione Medicalmente Assistita, Ostetricia e Ginecologia, della Fondazione I.R.C.C.S Policlinico S. Matteo, Pavia. Lo studio multidisciplinare ha inoltre coinvolto il Dr. Giuliano Mazzini (IGM-CNR Dip. Biologia & Biotecnologie "L. Spallanzani", Università di Pavia), la Dr.ssa Mariarosa Polimeni (Dip. Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Unità di Anatomia Umana Normale, Università di Pavia), la Dr.ssa Marcella Reguzzoni (Dip. Scienze Chirurgiche e Morfologiche, Università dell'Insubria) e la Dr.ssa Patrizia Vaghi (Centro Grandi Strumenti, Università di Pavia).

**Premio POSTER GIC 2011 al 29° Convegno Nazionale di Citometria (Salerno, 5-8 Ottobre, 2011).**



# Pure Quality

## La perfezione nella Qualità – Consumabili Eppendorf Tissue Culture e Eppendorf Cell Imaging

Se utilizzi il microscopio inverso, se fai cell imaging o analisi basate sulla fluorescenza:

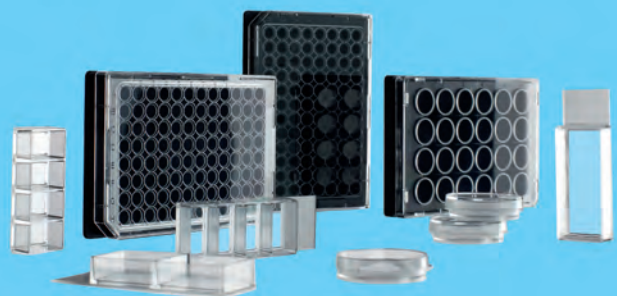
Scopri soluzioni ad hoc per analisi singole, in parallelo e per High Content Analysis (HCA) con i Consumabili Eppendorf Cell Imaging. L'eccezionale disegno e produzione di tutti i Consumabili Eppendorf Cell Imaging comprende:

- > Prestazioni superiori delle superfici del vetro e del film per le cellule adese dovute al trattamento innovativo TC
- > Bassa fluorescenza intrinseca per un eccezionale rapporto segnale-rumore
- > Facile accesso all'area completa di imaging con lenti ad immersione per una manipolazione ridotta ed un'avanzata compatibilità con i microscopi



## I Prodotti Eppendorf Cell Imaging:

- > Capsule con fondo in vetro con una cavità centrale che aiuta a ridurre i costi di anticorpi e coloranti
- > Piastre con fondo in vetro e film con un'eccellente planarità per un imaging ottimale
- > Camerette e vetrini con fondo in vetro Cell Imaging che mostrano un'elevata resistenza chimica anche quando viene usato acetone per la fissazione



[www.eppendorf.it/tcc](http://www.eppendorf.it/tcc)

Eppendorf® e il logo Eppendorf sono marchi registrati di Eppendorf AG, Amburgo, Germania. Tutti i diritti riservati, grafica e immagini comprese. Copyright © 2013 Eppendorf AG.



# Dako

An **Agilent Technologies** Company

With a heritage of over 45 years, Dako is a leading global provider of high-quality cancer diagnostic reagents and instruments used by pathologists, hospital labs and researchers around the world. Today, Dako is headquartered in Denmark with manufacturing and research sites in Denmark and the United States and more than 1,200 committed employees. Dako's reagents, instruments and software are sold in more than 100 markets.

Our main focus areas :

Nephrology  
Cardiovascular  
Cancer  
Diabetes  
Leukemia  
Lymphoma  
Patient Profiling



## FLOW CYTOMETRY

Flow cytometric immunophenotyping is becoming an important tool for diagnosing acute and chronic leukemia. Dako offers a broad panel of high-quality products for this area which are widely used in hospitals as well as in research laboratories.

Our major product categories within Flow Cytometry:

- FITC/RPE/APC Reagent Line
- FITC/RPE/RPE-Cy5 Reagent Line
- Secondary Antibody Conjugates
- CD34+ Cells, Enumeration Kit and Count Kit
- Lysing, Fixation and Permeabilization Reagents
- Primary Single-Color Reagents
- Conjugated Control Reagents
- Single-Color Mouse Isotype Reagents
- Single-Color Rabbit Ig Reagents
- MultiMix™ Dual and Triple-Color Reagents
- MultiMix™ Dual and Triple-Color Isotype Reagents
- Calibration Beads



**Dako Italia S.p.A.**  
Via Piero Portaluppi,  
11/2 I-20138 Milano  
el. +39 02 58 078 1  
Fax +39 02 58 078 294  
Web [www.dako.it](http://www.dako.it)  
E-mail [info.it@dako.com](mailto:info.it@dako.com)

# La Transizione Epitelio Mesenchimale: modulatore delle “Cancer Stem Cells” nel tumore polmonare non a piccole cellule

Rosa Camerlingo, Giuseppe Sessa e Giuseppe Pirozzi

I.N.T. – IRCCS Fondazione “G. Pascale” - Dipartimento della Ricerca - U.O.S. Cellule Staminali Tumoralì.

e-mail: r.camerlingo@istitutotumori.na.it; g.sessa@istitutotumori.na.it

## La Transizione Epitelio Mesenchimale

La transizione epitelio-mesenchimale (EMT) è un importante meccanismo cellulare che avviene durante il normale sviluppo di un organismo.

Processi come la gastrulazione e la formazione di organi e tessuti (cresta neurale, cuore, tessuto muscolare scheletrico, strutture cranio-facciali, sistema nervoso periferico) originano proprio dalla transizione plastica tra l'epitelio e il mesenchima.

Le cellule epiteliali e le cellule mesenchimali rappresentano due delle principali tipologie cellulari presenti nei mammiferi.

Un tessuto epiteliale è costituito da singole cellule epiteliali adiacenti senza interposizione di matrice extracellulare. Le cellule epiteliali sono cellule che ricoprono le superfici, rivestono le cavità e gli organi, permettono la secrezione e il trasporto e regolano diverse funzioni.

Sono caratterizzate da:

- interazioni coesive tra le cellule, principalmente giunzioni aderenti mediate da E-caderina, che facilitano la formazione di strati cellulari continui;
- esistenza di tre domini di membrana: apicale, laterale e basale;
- presenza di tight junctions tra i domini apicali e laterali;
- distribuzione apico-basale polarizzata dei vari organelli e delle componenti del citoscheletro;
- mancanza di mobilità.

Le cellule mesenchimali, invece, sono cellule di origine mesodermica, capaci di svilupparsi nei tessuti connettivi, negli elementi cellulari del sangue, nei vasi sanguigni e linfatici.

Differiscono dalle architetture multicellulari epiteliali per:

- perdita o assenza delle interazioni tra le cellule, caratteristica che impedisce la formazione di uno strato cellulare continuo;
- assenza della distribuzione polarizzata apico-basale degli organelli e delle componenti del citoscheletro;
- elevata mobilità e/o invasività;
- presenza di markers mesenchimali specifici, come la vimentina.(1)

La migrazione delle cellule mesenchimali è meccanica-

mente diversa da quella delle cellule epiteliali: queste si muovono come un foglio in blocco, mentre le cellule mesenchimali si muovono autonomamente e possono distaccarsi dalle regioni di partenza.

Durante lo sviluppo, alcune cellule possono subire uno switch da uno stato epiteliale a uno mesenchimale attraverso un processo rigidamente controllato definito EMT, che è associato a eventi cellulari e molecolari specifici. In alcuni casi, l'EMT è reversibile e le cellule subiscono la transizione reciproca MErT, da mesenchimale a epiteliale (1, 2, 3).

Trasformare una cellula epiteliale in una cellula mesenchimale richiede alterazioni nella morfologia, architettura cellulare, adesione, e capacità di migrazione. Comunemente sono analizzate le espressioni di marcatori molecolari per l'EMT e tra queste:

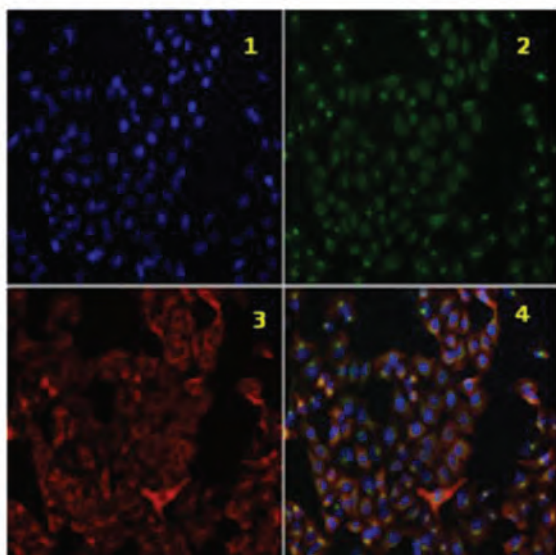
- up-regulation di N-caderina, vimentina e, in alcuni casi, dell'  $\alpha$ -actina del muscolo liscio (ACTA2);
- down-regulation di citocheratine epiteliali (KRT19 KRT8, KRT18);
- localizzazione nucleare di  $\beta$ -catenina e un aumento della produzione dei fattori di trascrizione come Snail2 (Slug), Twist, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2 e/o E47 che inibiscono la produzione di E-caderina (Fig.1)

Marcatori fenotipici per l'EMT includono:

- perdita di adesione cellula-cellula e di polarità apicale-basale che coinvolgono E-caderina (CDH1) in giunzioni aderenti, ocludina (OCLN) e claudina (CLDN) in giunzioni strette, desmoplakina (DSP) in desmosomi;
- maggiore capacità migratoria e invasiva, come conseguenza della riorganizzazione del citoscheletro causa anche dell'acquisizione di una morfologia fibroblast-like;
- resistenza all'apoptosi.

È possibile valutare il verificarsi di tale processo mediante l'impiego della citometria a flusso utilizzando anticorpi monoclonali quali: CD326 (EpCAM) e CD324 (E-Caderina) per il fenotipo epiteliale; CD90 per il fenotipo mesenchimale (Fig.2) (4).

1a



1b

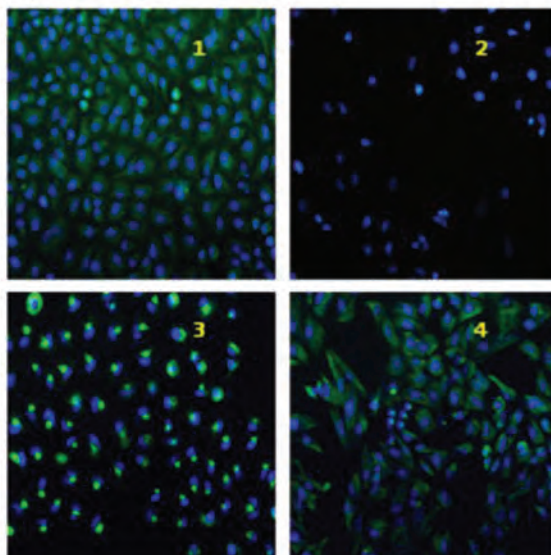


Fig. 1a: Analisi per Immunofluorescenza di Citocheratina e Vimentina nella linea di adenocarcinoma polmonare A549: 1 nuclei colorati con DAPI; 2 espressione della Vimentina; 3 espressione della Citocheratina; 4 Merge.

Fig. 1b: Analisi per Immunofluorescenza di Citocheratina (1-2) e Vimentina (3-4) nella linea di adenocarcinoma polmonare A549 prima (1-3) e dopo (2-4) trattamento con TGF- $\beta$ 1 per 48h.

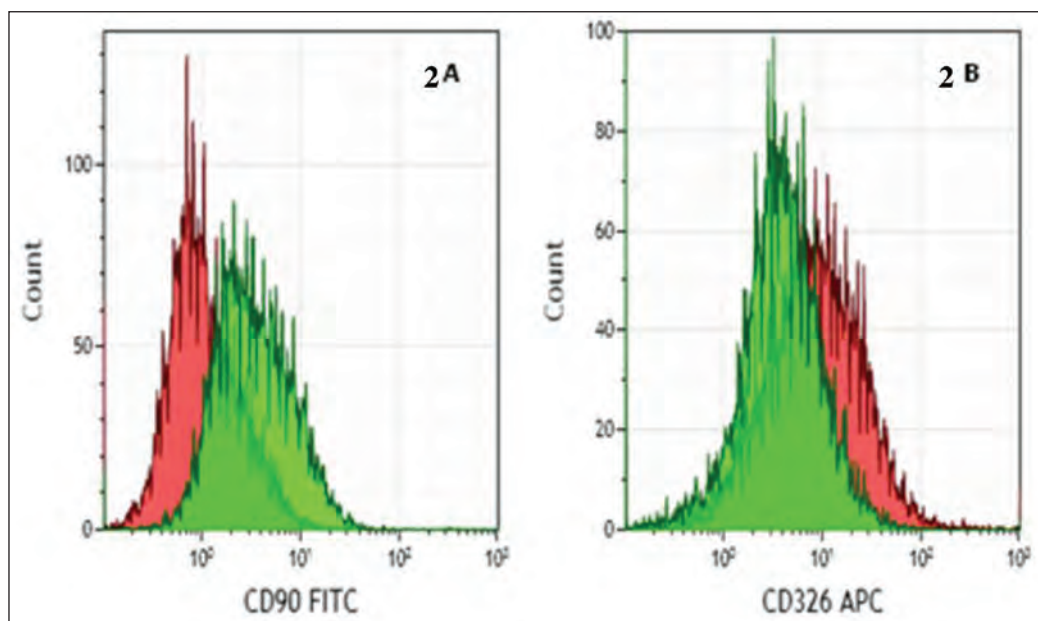


Fig. 2: Espressione citometrica dei marcatori CD90 (A) e CD326 (B) nella linea cellulare di adenocarcinoma polmonare A549 prima (rosso) e dopo (verde) trattamento con TGF- $\beta$ 1 per 48h.

### EMT – CSCs- Metastasi

La principale differenza tra lo sviluppo normale e i processi di trasformazione tumorale è che durante lo sviluppo normale gli eventi cellulari e molecolari seguono dei piani spaziali e temporali altamente regolati, mentre durante la trasformazione l'ordine degli eventi può essere casuale ed indipendente dal tempo oppure particolari eventi possono essere bypassati. Hay (Harvard University, Boston, MA), che per primo descrisse l'EMT, ha illustrato le differenze fondamentali di tale processo nell'embriogenesi (sottile/controllata) e nella tumorigenesi (aggressivo/non controllata) (5). Nella genesi del

tumore l'EMT ha un ruolo chiave. Originariamente descritti durante il normale sviluppo embrionale, i fenotipi EMT e i pathways di segnali coinvolti sono stati riportati anche in cellule tumorali coltivate in vitro. Il significato e il contributo dell'EMT nei tumori epiteliali umani è ancora una questione d'intenso dibattito in oncologia molecolare e clinica. Recenti progressi in questo campo supportano l'idea che l'EMT contribuisca alla plasticità delle cellule tumorali e al potenziale invasivo delle cellule epiteliali trasformate.

Il verificarsi dell'EMT durante la progressione tumorale permette alle cellule tumorali, di acquisire la capacità di



infiltrare il tessuto circostante e di metastatizzare in sedi lontane. La prova più convincente per il coinvolgimento dell'EMT in oncogenesi è la capacità di regolare questo processo per migliorare la formazione del tumore e/o metastasi (6). La progressione neoplastica nei tumori epiteliali determina l'acquisizione di caratteristiche EMT transienti e reversibili, accompagnate dalla perdita e rilocizzazione di markers epiteliali, come l'E-caderina, la  $\beta$ -catenina e l'acquisizione di markers mesenchimali come l'N-caderina, la vimentina e l' $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA); l'EMT può contribuire all'intenso rimodellamento delle diverse componenti della matrice extracellulare, come la fibronectina, con conseguenze patologiche sulla sopravvivenza delle cellule tumorali, sulle metastasi e sulla resistenza dei tumori agli agenti antitumorali. Alla base dell'EMT ci sono complessi meccanismi molecolari e cellulari che conferiscono caratteristiche trasformanti, quali la sopravvivenza delle cellule tumorali e la resistenza all'apoptosi, l'invasione e l'angiogenesi, le metastasi e la resistenza ai farmaci, tutti aspetti comuni anche alle cancer stem cells (CSCs). Sia la EMT che le CSCs giocano un ruolo critico nella genesi, formazione, crescita e metastasi tumorale. Le cellule tumorali che subiscono EMT acquisiscono la capacità di migrare, invadere lo stroma e di auto rinnovarsi, attivando così meccanismi necessari per la formazione di micro e macrometastasi; le CSCs o Tumor Initiating Cells (TICs) mostrano proprietà associate alle cellule staminali quali l'autorinnovamento e capacità migratorie. (1, 7, 8, 9, 10)

L'eccessiva proliferazione delle cellule epiteliali e l'angiogenesi sono segni di garanzia per l'avvio e la rapida crescita di tumori epiteliali primari. La successiva acquisizione di capacità invasiva, annuncia l'inizio delle ultime fasi del processo multi-step che porta alla diffusione metastatica. (2, 11) Studi recenti indicano che sia l'invasione sia le metastasi possono dipendere dall'acquisizione da parte delle cellule inizianti il tumore (CSCs) di caratteristiche EMT.

Molti studi condotti su topi ed esperimenti di colture cellulari hanno dimostrato che le cellule cancerose sono in grado di acquisire un fenotipo mesenchimale, nonché capacità migratoria e quindi favorire il processo metastatico. Brablez et al. propongono un modello integrato di migrazione di cellule staminali del cancro che spiega tutti gli aspetti della progressione del tumore. Le CSCs dotate di movimento si trovano prevalentemente all'interfaccia tra tumore-ospite e derivano da CSCs stazionarie che acquisiscono il fenotipo EMT (12).

La metastatizzazione è un processo multistep caratterizzato dalla dissociazione delle cellule tumorali dallo strato epiteliale, dalla distruzione della membrana basale e dalla penetrazione nel tessuto connettivo adiacente, dall'entrata nei vasi sanguigni, dalla sopravvivenza in circolo, dallo stravasamento in un sito distante e dalla crescita di cellule metastatiche in siti distanti con la stimolazione della neoangiogenesi. Dal momento che i primi steps

sono caratterizzati da un'elevata motilità e invasività, è stato ipotizzato che essi siano associati con l'EMT. Nel caso di molti carcinomi, l'EMT è indotta da segnali provenienti dallo stroma associato al tumore, in particolare HGF, EGF, PDGF, TGF- $\beta$ 1 che sembrano essere responsabili dell'induzione o attivazione funzionale, in cellule tumorali, di una serie di fattori di trascrizione coinvolti nell'EMT, in particolare Snail, Slug, zinc-finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1), Twist, Goosecoid e FOXC2. Una volta espresso e attivato, ciascuno di questi fattori di trascrizione può agire pleiotropicamente per regolare l'EMT.

La presenza di marcatori EMT all'interfaccia tumore-ospite è una forte evidenza che l'EMT si verifica durante lo sviluppo del tumore e che ne regola l'aggressività e l'invasività. La somiglianza istologica del tumore secondario a quello primario indica che lo sviluppo mediato dall'EMT deve essere seguito da un processo di transizione mesenchimale-epiteliale (MErT) per permettere la colonizzazione di siti secondari (1).

Questa plasticità potrebbe anche essere una spiegazione per la difficoltà nell'osservare EMT nello sviluppo del cancro in quanto l'acquisizione di caratteristiche mesenchimali può essere transitoria e subire una inversione durante la tumorigenesi.

Questi dati indicano che l'EMT è coinvolto negli steps iniziali delle metastasi, quindi nella migrazione delle cellule inizianti il tumore primario (CSCs) ai vasi, ma è necessario anche negli steps più tardivi, come a livello dell'entrata in circolo e dello stravasamento in siti distanti (1, 2, 3).

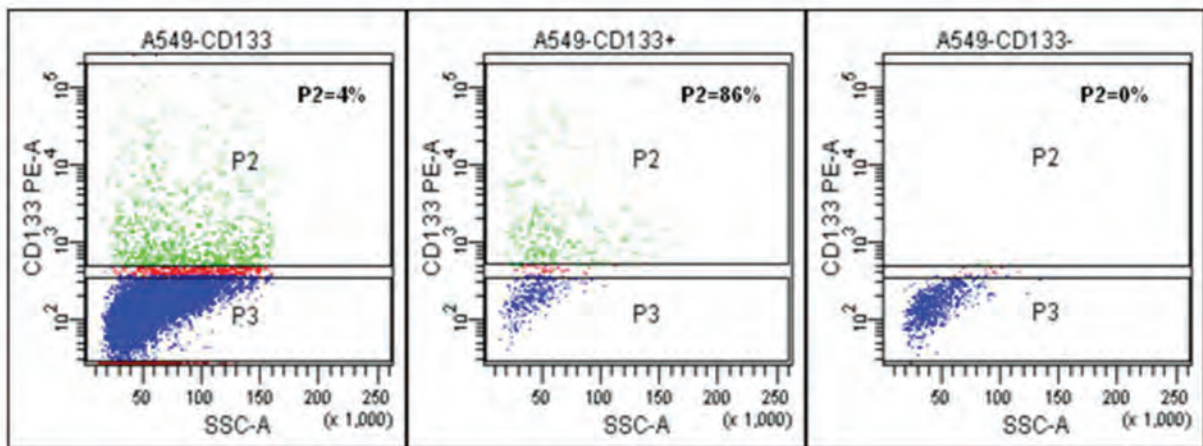
Gli studi sulla EMT sono stati effettuati soprattutto nel carcinoma mammario e polmonare.

Mani et al. (2008) dimostrano che trattando la linea HMLE, linea immortalizzata di mammella, con TGF- $\beta$ 1 o inducendo un'espressione ectopica di Snail e Twist si ottiene una linea mesenchimale che ha subito un processo EMT. Tale linea presenta cellule con morfologia fibroblast-like, alta espressione di vimentina e down-regolazione di E-caderina. Egli dimostra che la linea mesenchimale ottenuta mostra un fenotipo staminale: presenza di marcatori staminali, elevata capacità di formare sfere, elevata capacità tumorigenica (13).

Nel 2011 Pirozzi et al. confermano l'avvenuta EMT indotta dal TGF- $\beta$ 1 in una linea primaria di adenocarcinoma polmonare, osservando una down-regolazione di CD326, Citocheratina, E-Caderina ed una up-regolazione di CD90, Vimentina, Slug, Twist,  $\beta$ -Catenina (Fig. 1a-1b) e ne evidenziano l'aumento delle caratteristiche di staminalità, valutando l'espressione del CD133, dei fattori trascrizionali NANOG, OCT4, SOX2 e della capacità ed efficienza di formare pneumosfere. Inoltre verificano la capacità tumorigenica delle cellule che hanno subito EMT con saggi *in vitro* (Soft Agar) ed *in vivo* (Injection in NOD/SCID mice) (4).

Tutti questi dati dimostrano che all'interno della eterogenea massa tumorale epiteliale risiedono le CSCs e che il

3a



3b

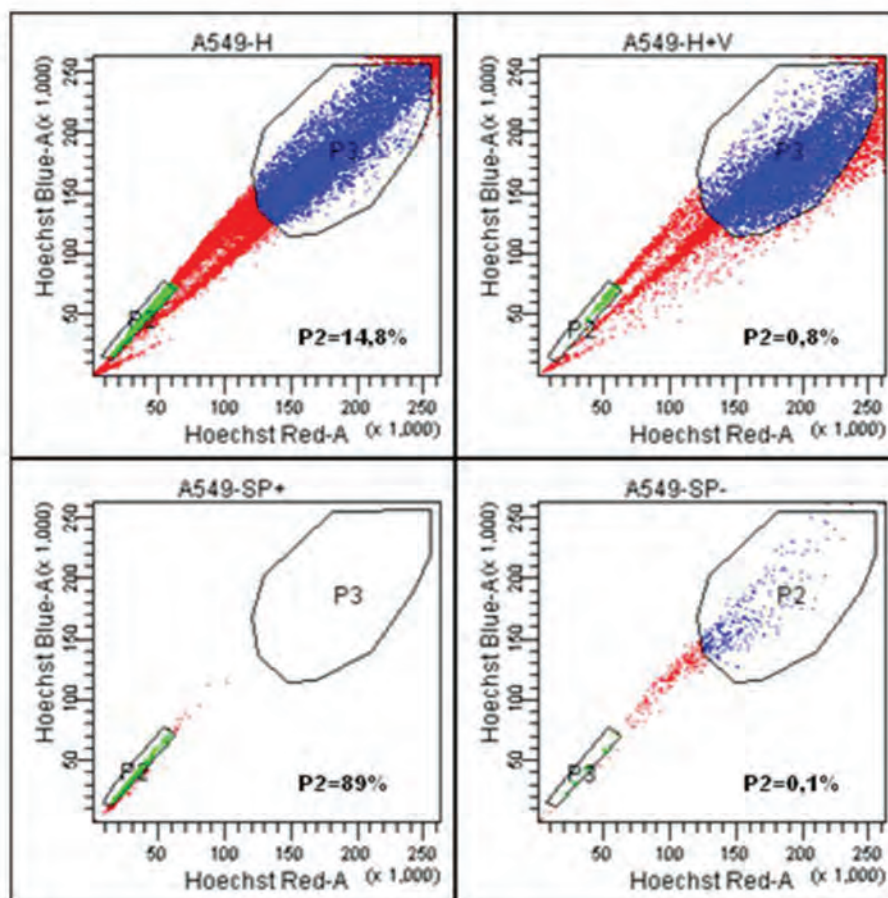


Fig. 3: Analisi Citometrica dell'espressione del CD133 e della Side Population. (a) La percentuale di espressione del CD133 è stata di circa il 4%; La purezza del sorting della popolazione CD133+ è stata di circa il 90%. (b) La Side Population riscontrata nelle A549 è stata di circa il 15%; la purezza del sorting della popolazione SP è stata di circa il 90%.

processo EMT è responsabile dell'aumento delle caratteristiche di staminalità tumorali.

Da qui l'interesse degli scienziati ad approfondire lo studio dell'EMT indotto nelle sottopopolazioni CSCs e NON-CSCs. (Fig. 3)

Tirino et al. hanno indotto l'EMT, mediante trattamento con TGF- $\beta$ 1, nelle frazioni CSCs e NON-CSCs (15) della linea cellulare di adenocarcinoma polmonare A549. La frazione CSCs è rappresentata da cellule positive per CD133 e/o quelle Side Population (SP); la frazione NON-CSCs è rappresentata da cellule negative per CD133 e/o

NON-SP. Dopo aver verificato l'avvenuta EMT e l'aumento delle caratteristiche di staminalità (4), gli autori sono poi passati ad analizzare il potenziale migratorio e la motilità delle singole frazioni. I risultati mostrano un aumento di migrazione e di motilità in tutte le frazioni trattate con TGF- $\beta$ 1 rispetto alle corrispettive non trattate ad eccezione della frazione CD133- e solo per i saggi di motilità anche per la frazione NON-SP. Questi dati sono stati confermati da RT-PCR per MMP-9, responsabile della degradazione della matrice extracellulare.

È stato infine valutato il potenziale tumorigenico di tutte

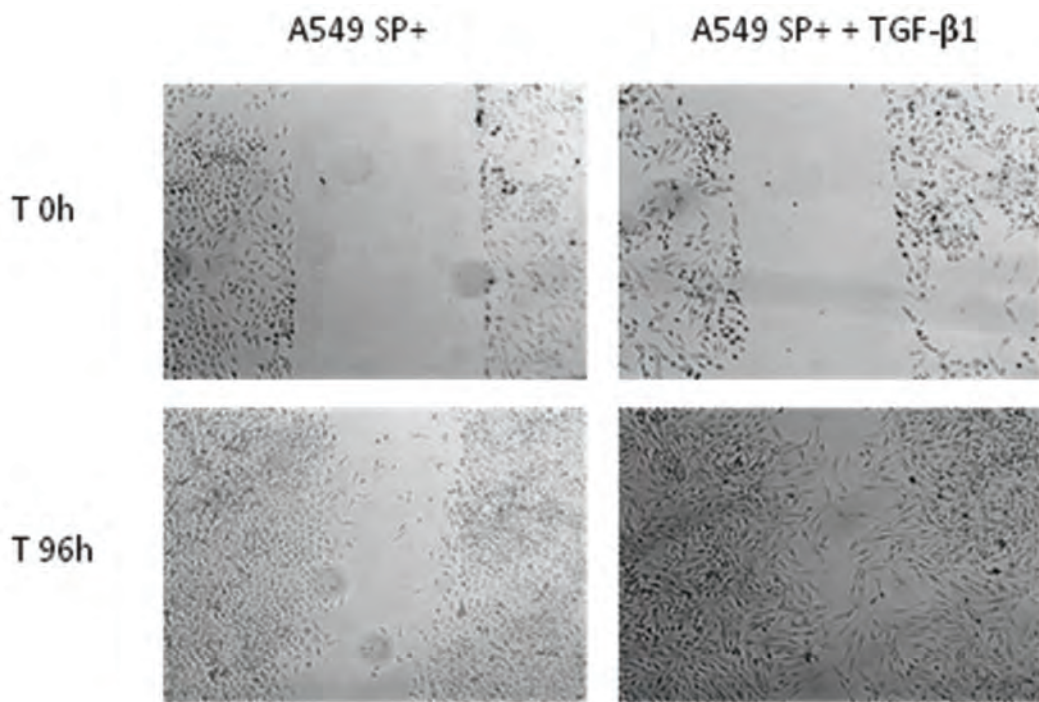


Fig. 4: Wound Healing sulla frazione Side Population (SP+) ottenuta dalla linea cellulare di adenocarcinoma polmonare A549 prima e dopo trattamento con TGF- $\beta$ 1. Dopo 96h le cellule che hanno subito il trattamento mostrano una maggiore capacità di rimarginare la ferita e una maggiore capacità motile.

le frazioni mediante saggi di Soft Agar; i risultati collimano con i dati di migrazione, in quanto in tutte le frazioni trattate si osserva una maggiore efficienza nella formazione di colonie rispetto alle corrispettive non trattate ad eccezione della frazione CD133- (14).

Sia le CSCs sia le NON-CSCs che subiscono EMT acquisiscono maggiore capacità migratoria e di motilità (Fig. 4), processi alla base delle metastasi tumorali, ed aumentano la loro capacità tumorigenica. In particolare le cellule che esprimono il CD133 potrebbero essere quelle capaci di migrare mentre quelle SP potrebbero essere considerate le CSCs stazionarie (12). Inoltre visti i cambiamenti funzionali indotti dal TGF- $\beta$ 1 sulle NON-SP (aumento della migrazione, della formazione di colonie e dell'espressione di OCT4 ma non della motilità), queste potrebbero essere considerate una riserva di CSCs in particolari condizioni (14).

Secondo quanto detto, lo studio e la conoscenza dei pathways coinvolti nell'EMT e della correlazione di questo processo con le CSCs stazionarie e/o mobili, potrebbero portare allo sviluppo di nuove strategie di terapie farmacologiche capaci di aumentare la sopravvivenza e migliorare la qualità della vita dei malati di cancro, soprattutto per chi soffre di malattia metastatica.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Jonathan M. Lee, I Shoukat Dedhar, *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*, The Journal of Cell Biology, 2006.
- 2) Moreno et al. *Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer*. Oncogene 2008.
- 3) Huber M. et al. *Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression*. Curr Opin Cell Biol 2005..

- 4) Pirozzi G. et al. *Epithelial to mesenchymal transition by TGF- $\beta$ 1 induction increases stemness characteristics in primary non small cell lung cancer cell line*. PLoS One 2011.
- 5) Hay E. *The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it*. Dev Dyn 2005
- 6) Thiery JP. *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer. 2002;2:442-454.
- 7) Eger A, Mikulits W: *Models of epithelial-mesenchymal transition*. Drug Discovery Today: Disease Models. 2005.
- 8) Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Hermann R, Foisner R, Beug H, Mikulits W: *Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis*. Mutat Res 2004.
- 9) Radisky et al. *Epithelial-mesenchymal transition and the stem cell phenotype*. Cell Stem Cell 2008.
- 10) Akiro Naito et al. *Progressive features accompany epithelial-mesenchymal transition induced in mitochondrial DNA depleted cells*. Cancer Sci 2008.
- 11) Aigner et al. *The transcription factor ZEB1 promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity*. Oncogene 2007.
- 12) Brabletz T. et al. *Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression*. Nat Rev Cancer 2005
- 13) Mani SA. et al *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell 2008
- 14) Tirino V. et al. *TGF- $\beta$ 1 exposure induces epithelial to mesenchymal transition both in CSCs and non-CSCs of the A549 cell line, leading to an increase of migration ability in the CD133(+) A549 cell fraction*. Cell Death Dis. 2013
- 15) Tirino V. et al. *The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer*. Eur J Cardiothorac Surg. 2009
- 16) Rosivatz E. et al. *Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer*. Am J Pathol. 2002

# Any patient. Any time. Any place.

*The future of flow cytometry is now – with Beckman Coulter*

If stubbornly large testing backlogs, a scarcity of skilled operators, infrastructure challenges, and tight budgets are affecting your lab's productivity, get relief with cutting edge flow cytometry solutions from Beckman Coulter.



## AQUIOS CL

Aquios will be the first true "load & go" flow cytometer available to clinical labs. With its fully integrated sample prep module, automated reagent management and barcode scanning capability, all you will need to do is load controls and samples. For HIV testing and other routine applications, Aquios will be simplicity itself to operate.

Learn more about Aquios: [www.AquiosNow.com](http://www.AquiosNow.com)

## DURACLONE



DuraClone is Beckman Coulter's proprietary line of dry reagents for T cell counts, available for several instrument platforms. Shelf-stable at room temperature, ready-to-use, affordable, and accurate, DuraClone reagents simplify your workflow, minimize your hands-on time, and provide robust T cell counting for HIV analysis in resource-poor settings.

Learn more about DuraClone:  
[www.DuraClone.com](http://www.DuraClone.com)



 **BECKMAN  
COULTER**  
*Life Sciences*

Aquios is in development, pending achievement of CE compliance; not yet available for in vitro diagnostic use. Aquios is pending submission and clearance by the United States Food and Drug Administration, and is not yet available in the U.S. for in vitro diagnostic use.

The diagnostics DuraClone reagents are not currently available or cleared for use in the United States.

Beckman Coulter, the stylized logo, Aquios and Load & Go are trademarks of Beckman Coulter, Inc. and are registered with the USPTO.

# Approccio morfo-citometrico per lo studio della relazione fra cellule quiescenti e comparsa di recidive in seguito a trattamento con Terapia per Cattura Neutronica del Boro (BNCT)

C. Ferrari<sup>1</sup>, L. Cansolino<sup>1,2</sup>, A.M. Clerici<sup>1</sup>, C. Zonta<sup>1</sup>, P. Dionigi<sup>1,2</sup>, G. Mazzini<sup>3</sup>,  
S. Altieri<sup>4,5</sup>, F. Ballarini<sup>4,5</sup>, S. Bortolussi<sup>4,5</sup>, N. Protti<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Clinico-Chirurgiche, Diagnostiche e Pediatriche

<sup>2</sup>IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia

<sup>3</sup>IGM-CNR e Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

<sup>4</sup>Dipartimento di Fisica

<sup>5</sup>Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN), Sezione di Pavia - Università di Pavia

e-mail: cinzia.ferrari@unipv.it

## Introduzione

Fra i numerosi campi applicativi della citometria a flusso, la determinazione della ploidia e della frazione di cellule proliferanti presenti all'interno di una popolazione in esame è stata una fra le prime e principali ad essere impiegate (1). La quantificazione delle cellule in fase di sintesi (S), inizialmente effettuata mediante analisi monoparametrica del DNA, negli anni '80 è stata ottimizzata grazie allo sviluppo di un anticorpo monoclonale anti-bromodesossiridina (BrdU) (2). E' noto che quest'ultima, come analogo della timidina, viene incorporata nel DNA di cellule in fase S e trasmessa alle cellule figlie dimezzandosi ad ogni duplicazione (3). L'analisi biparametrica a flusso DNA/BrdU, che fornisce informazioni dettagliate, oltre che sulla frazione di cellule in fase S anche sulla loro cinetica proliferativa, ha trovato ampia applicazione soprattutto nel campo dell'oncologia clinica (4-6). L'esperienza precedentemente acquisita in tali ambiti ci ha suggerito di sfruttare le potenzialità offerte dalla BrdU e dalla citometria a flusso affiancandole ai test di sopravvivenza per verificare l'esistenza di una relazione tra quiescenza e refrattarietà di cellule neoplastiche al trattamento con Terapia per Cattura Neutronica del Boro (BNCT).

La BNCT è un approccio radioterapeutico non convenzionale dove l'azione curativa viene esercitata dalla dose di radiazioni rilasciata in seguito alla cattura neutronica da parte dell'isotopo <sup>10</sup>B del boro. Il trattamento, che mira a distruggere selettivamente le cellule neoplastiche risparmiando i tessuti sani, è di tipo binario ovvero prevede due fasi sequenziali ed inscindibili: l'arricchimento selettivo dei tessuti neoplastici con un'adeguata concentrazione di atomi di <sup>10</sup>B, seguito dall'irraggiamento con un fascio di neutroni termici a bassa energia. La reazione di cattura neutronica da parte dell'isotopo <sup>10</sup>B del boro produce due particelle ad alto LET (Linear Energy Transfer): uno ione <sup>7</sup>Li ed una particella  $\alpha$ , aventi la

peculiarità di dissipare la loro energia in un range di pochi  $\mu$ m. Pertanto, se la reazione avviene all'interno di una cellula opportunamente arricchita in <sup>10</sup>B, la dose di radiazioni ionizzanti prodotta, inducendo rotture ad entrambi i filamenti del DNA, ne compromette le capacità riparative risultando letale per la cellula stessa. Date queste premesse fisiche e biologiche, la disponibilità di vettori del <sup>10</sup>B che, iniettati nel paziente, siano in grado di concentrarsi preferenzialmente nel tumore rispetto al circostante tessuto sano, possono fare della BNCT una radioterapia cellulare altamente selettiva, da considerare come possibile alternativa per il trattamento di tumori diffusi, non aggredibili con le convenzionali procedure chirurgiche o non rispondenti alla radio o chemioterapia convenzionali (7-10).

I composti del boro attualmente disponibili per la pratica clinica sono la borofenilalanina (BPA) ed il sulfidril borano (BSH). La BPA è un derivato borato dell'aminoacido essenziale fenilalanina, e viene pertanto incorporato attivamente a livello cellulare seguendo la via metabolica degli aminoacidi (11,12). Il BSH è un composto sulfidrilico, che non attraversa la barriera ematoencefalica intatta, ma quando questa è compromessa per la presenza di neoplasie, può diffondere passivamente dal sangue al tumore, risultando pertanto particolarmente indicato per il trattamento dei tumori cerebrali (13,14).

Requisiti essenziali per l'applicabilità della BNCT sono che la concentrazione di <sup>10</sup>B all'interno della cellula raggiunga livelli di almeno 20 ppm e che le concentrazioni nel tessuto tumorale e sano stiano in rapporto di 4:1 (15,16).

Le prime applicazioni cliniche della BNCT, rivolte al trattamento di gliomi cerebrali maligni, risalgono agli anni '50 ma hanno fornito risultati deludenti a causa della scarsa selettività dei vettori del boro impiegati (17). Negli anni '90 sono stati avviati nuovi trial clinici destinati principalmente al trattamento di tumori cerebrali e di

melanomi cutanei impiegando rispettivamente BSH e BPA, ovvero i composti del boro di seconda generazione, caratterizzati da maggior selettività e minor tossicità rispetto a quelli precedentemente impiegati di prima generazione. I risultati conseguiti sulle neoplasie cerebrali hanno confermato l'elevata capacità distruttiva del trattamento BNCT, in grado di indurre in una sola applicazione gli effetti citolesivi riscontrabili solo in seguito a ripetute somministrazioni di radioterapia convenzionale. A fronte di un deciso miglioramento della qualità di vita del paziente non si è però riscontrato un allungamento della sopravvivenza media, principalmente a causa dell'insorgenza di recidive neoplastiche locali derivate da cellule sfuggite all'azione citolesiva dei fasci neutronici collimati. Studi clinici su tumori cerebrali e glioblastomi sono tuttora in corso in Giappone, Finlandia e Svezia. Il trattamento dei melanomi cutanei effettuato mediante l'impiego di BPA ha fornito risultati promettenti con livelli di tossicità accettabili e benefici clinici (18-19). Presso l'Università di Pavia è stata messa a punto un'originale tecnica per il trattamento mediante BNCT delle metastasi epatiche diffuse da carcinoma del colon. Essa prevede la perfusione del fegato con BPA, il prelievo biotico di campioni su cui verificare le concentrazioni di  $^{10}\text{B}$  raggiunte dal tessuto sano e neoplastico, l'espanto, l'irraggiamento neutronico ed il successivo autotrapianto. Dopo molti anni di ricerche sperimentali ed una minuziosa messa a punto della metodica, nel 2001 è stato effettuato per la prima volta al mondo il trattamento extracorporeo di metastasi epatiche mediante BNCT, seguito da un secondo trattamento avvenuto nel 2003. Nel primo paziente si è ottenuta una sopravvivenza di 4 anni contro un'aspettativa di vita di pochi mesi, nel secondo, invece, essendo affetto anche da una cardiopatia dilatativa, si è purtroppo registrato il decesso dopo 33 giorni. In entrambi i casi, oltre alla conferma di fattibilità dell'approccio terapeutico si è avuto l'evidente riscontro clinico ed anatomo-patologico di distruzione degli ammassi neoplastici. Nonostante il miglioramento dell'aspettativa e della qualità di vita, nel primo paziente si è verificata una ripresa di malattia che ne ha causato il decesso (20). Dato che l'esposizione completa ed uniforme dell'organo metastatico al fascio neutronico non ha comunque prodotto un effetto terapeutico radicale e riconsiderati i requisiti richiesti per l'efficacia della BNCT, la comparsa di recidive può essere unicamente riconducibile all'inadeguata quantità di boro accumulata da alcune cellule neoplastiche al momento dell'irraggiamento neutronico. Riveste quindi carattere di primaria importanza la caratterizzazione di tale frazione cellulare. Dal momento che la BPA è un aminoacido di cui sono particolarmente avidi le cellule neoplastiche in attiva fase proliferativa, è ragionevole ipotizzare che cellule quiescenti, incapaci di accumulare e trattenere quantità di boro sufficienti, possono risultare refrattarie al trattamento BNCT.

L'esistenza di una piccola sottopopolazione cellulare refrattaria alla BNCT è stata sperimentalmente osservata anche negli studi preclinici *in vitro* (21,22).

Al fine di validare questa ipotesi, ovvero l'esistenza di una relazione fra captazione intracellulare di BPA, stato proliferativo cellulare e sopravvivenza al trattamento BNCT, è stato condotto uno studio in cui le cellule neoplastiche di coloncarcinoma sono state sottoposte ad irraggiamento neutronico previo trattamento simultaneo con  $^{10}\text{BPA}$  e bromodeossiridina (BrdU), di seguito indicato con BPA+BrdU.

La sopravvivenza cellulare ad un trattamento può essere valutata mediante il test di clonogenicità che si basa sul conteggio dei soli cloni formati da almeno cinquanta cellule, condizione necessaria perché la cellula di origine possa essere considerata sopravvissuta al trattamento.

L'immunorivelazione della BrdU mediante lo specifico anticorpo fluorescinato consente di evidenziarne la presenza anche nelle cellule figlie fino alla sesta divisione cellulare, quindi anche in cloni costituiti da cinquanta cellule.

Combinando il test di clonogenicità con l'immunorivelazione della BrdU è pertanto possibile verificare se i cloni cellulari derivanti da cellule sopravvissute all'irraggiamento neutronico dopo esposizione a BPA+BrdU, sono BrdU negativi, cioè se derivano da cellule che non essendo proliferanti al momento del trattamento non hanno incorporato la quantità necessaria di BPA per poter essere danneggiate dal fascio neutronico.

#### Materiali e metodi

La sperimentazione è stata effettuata sulla linea cellulare di coloncarcinoma murino DHDK12TRb (DHD), da noi già ampiamente utilizzata nell'ambito della fase sperimentale preclinica in cui era stata per l'appunto rilevata la presenza di una frazione di cellule resistenti. Le cellule sono state coltivate in terreno composto da Ham's F10 e DMEM (1:1) addizionato con 10% di siero fetale bovino e 40 mg/ml di gentamicina. Considerate le caratteristiche di crescita della linea DHD, 48 h prima dell'esposizione al trattamento le cellule sono state seminate alla concentrazione di  $3 \times 10^6$  in fiasche T75.

Cellule trattate con BPA, BrdU e BPA+BrdU, esposte e non al fascio neutronico, sono state studiate sia con il classico test di clonogenicità che abbinando quest'ultimo alla rivelazione in immunofluorescenza della BrdU.

La metodologia standard del test di clonogenicità prevede la semina delle cellule a bassa concentrazione in cinque capsule Petri ciascuna e, trascorso un tempo di coltura variabile in funzione delle caratteristiche proliferative delle cellule impiegate e del trattamento effettuato, si procede alla fissazione ed alla successiva colorazione con blu di toluidina o ematosilina/eosina dei cloni cellulari derivanti da cellule vitali ed al loro successivo conteggio. Il rapporto fra il numero di cloni ottenuti ed il numero di cellule seminate fornisce l'efficienza di piastramento (EP). Il rapporto fra EP del campione trattato ed EP del controllo

fornisce la sopravvivenza al trattamento.

La semina degli stessi campioni cellulari è stata inoltre effettuata su vetrini coprioggetto, sui quali, al termine del periodo di coltura, è stata eseguita la rivelazione della BrdU e la successiva controcolorazione dei nuclei cellulari con Ioduro di Propidio (IP), intercalante del DNA a fluorescenza rossa.

Il disegno sperimentale è stato articolato come di seguito riportato.

#### *Trattamento con BPA*

L'arricchimento con boro della linea DHD è stato effettuato coltivando le cellule per 4 h con terreno addizionale di BPA in modo tale da raggiungere una concentrazione di  $^{10}\text{B}$  pari ad 80 ppm.

Tali condizioni di trattamento sono state stabilite sulla base dei risultati acquisiti da precedenti studi inerenti la citotossicità e la citocinetica di captazione intracellulare di BPA. Il trattamento per 4 h con 80 ppm di  $^{10}\text{B}$  non risulta citotossico e garantisce che la cellula trattenga e quindi disponga al momento dell'irraggiamento neutronico di una quantità di boro intracellulare adeguata per ricevere una dose di radiazione letale.

Trascorso il periodo di contatto con BPA, dopo la rimozione del terreno arricchito, le cellule sono state lavate tre volte con PBS per eliminare i residui di composto, tripsinizzate, contaminate e trasferite in idonee provette per essere trasportate al reattore dove sono state sottoposte e non ad irraggiamento neutronico. Si è quindi proceduto alla loro semina come sopra descritto a concentrazioni comprese in un range fra 50 e 200 cellule per Petri/vetrino nel caso di campioni non irraggiati e di  $1 \times 10^3$  -  $1 \times 10^4$  nel caso di cellule irraggiate. La scelta di tali range di concentrazione solitamente stabiliti sulla base di ipotetiche stime di sopravvivenza è in questo caso stata dettata anche da dati di sopravvivenza acquisiti in precedenti esperimenti dai quali era emersa l'esistenza della popolazione refrattaria alla BNCT, la cui caratterizzazione è oggetto del presente studio. Trascorsi 7 giorni dalla semina si è proceduto alla fissazione con etanolo 70% dei cloni cellulari, cresciuti nelle Petri e su vetrino, ed alla loro colorazione rispettivamente con blu di toluidina e con IP 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Per la valutazione della sopravvivenza, il conteggio dei cloni delle Petri è stato effettuato mediante microscopio rovesciato Olympus CK2. I cloni cresciuti su vetrino sono stati invece osservati e fotografati mediante microscopio a fluorescenza Olympus BX-51 collegato ad una macchina fotografica digitale Camedia C4040.

#### *Trattamento con BrdU*

Preliminarmente è stato necessario verificare la concentrazione di BrdU a minor tossicità, con cui trattare le cellule in modo da poter essere rivelata anche dopo sei cicli replicativi ovvero quelli necessari per ottenere cloni di almeno 50 cellule.

Cellule della linea DHD in crescita esponenziale sono state coltivate per 4h in terreno arricchito con BrdU alla concentrazione di 10, 20 e 50  $\mu\text{M}$  e di seguito, dopo l'eliminazione del terreno arricchito e gli opportuni lavaggi con PBS, tripsinizzate e contaminate per essere sottoposte al test di clonogenicità secondo la procedura standard che ha identificato nella concentrazione di 10  $\mu\text{M}$  quella idonea allo scopo prefissato.

Nell'ambito del presente studio le cellule sono state quindi sottoposte a trattamento di 4 h con BrdU 10  $\mu\text{M}$ . Al termine del periodo di contatto le cellule sono state trattate come sopra descritto per quelle esposte a BPA, fatta eccezione per la concentrazione di cellule seminate, che in presenza di sola BrdU è rimasta invariata, ovvero nel range di 50-200 cellule anche in caso di esposizione all'irraggiamento neutronico.

#### Immunorivelazione su vetrino

Trascorsi 7 giorni dalla semina, dopo la fissazione con etanolo 70% dei cloni cellulari, si è proceduto alla immunorivelazione indiretta della BrdU secondo la seguente procedura:

- denaturazione del DNA mediante idrolisi acida con 2 ml HCl 2N per 15' a temperatura ambiente;
- neutralizzazione con 2 ml di  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  0,1 M per 5';
- permeabilizzazione con 2 ml di PBS/0,5% tween 20/0,1% BSA (PBS/tween) per 10';
- incubazione per 1 h con 200  $\mu\text{l}$  di anti-BrdU (BD, 347580) diluito 1:20 in PBS/tween;
- incubazione per 1 h con 200  $\mu\text{l}$  di anticorpo secondario anti-mouse coniugato con FITC (Sigma, F2012) diluito 1:50 in PBS/tween;
- lavaggi con PBS dopo ogni passaggio descritto;
- controcolorazione con 200  $\mu\text{l}$  di PBS contenente 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  di IP/100 U RNasi /0,1% Igepal (Sigma);
- osservazione microscopica della fluorescenza verde/FITC e rossa/PI, mediante microscopio Olympus BX-51 con eccitazione LED nel blu a 480 nm (FRAEN).

#### BrdU labelling index (LI)

Un'aliquota delle stesse cellule trattate per 4h con BrdU 10  $\mu\text{M}$  è stata altresì destinata all'analisi biparametrica DNA/BrdU, effettuata mediante citometria a flusso, per la determinazione della frazione di cellule proliferanti presenti nella coltura studiata (LI). La rivelazione della BrdU è stata effettuata sulla sospensione cellulare impiegando la metodica precedentemente descritta per la sua immunorivelazione su vetrino. L'analisi bivariata DNA/BrdU è stata eseguita impiegando un citometro a flusso PARTEC PAS II, equipaggiato con un laser ad argon da 20 mW a 488 nm. L'elaborazione dei dati acquisiti è stata effettuata mediante il programma FlowMax fornito da PARTEC.

#### *Trattamento con BPA+ BrdU*

Le cellule DHD sono state contemporaneamente esposte per 4 h a BPA e BrdU alle concentrazioni precedente-

mente riportate nelle modalità di trattamento descritte per i singoli composti. Anche in questo caso, come per il singolo trattamento, l'elevata mortalità ottenuta in presenza di BPA, rende necessaria la semina delle cellule irraggiate a maggiori concentrazioni ovvero nel range fra  $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^4$  cellule.

#### Irraggiamento neutronico

Aliquote di cellule non trattate e trattate con BPA, BrdU e BPA+BrdU sono state esposte al fascio neutronico per 10' ad una potenza di 75 kW, presso il reattore TRIGA Mark II dell'Università di Pavia. Identici campioni non esposti al fascio neutronico sono stati processati analogamente a quelli irraggiati.

#### Risultati

Il trattamento delle cellule DHD con BrdU 10, 20 e 50  $\mu\text{M}$  per 4h ha evidenziato un moderato effetto citotossico concentrazione dipendente, come riportato in Fig. 1. Sulla base di tale preliminare riscontro gli esperimenti sono stati eseguiti impiegando la BrdU 10  $\mu\text{M}$ , che è risultata essere quella a minor tossicità.

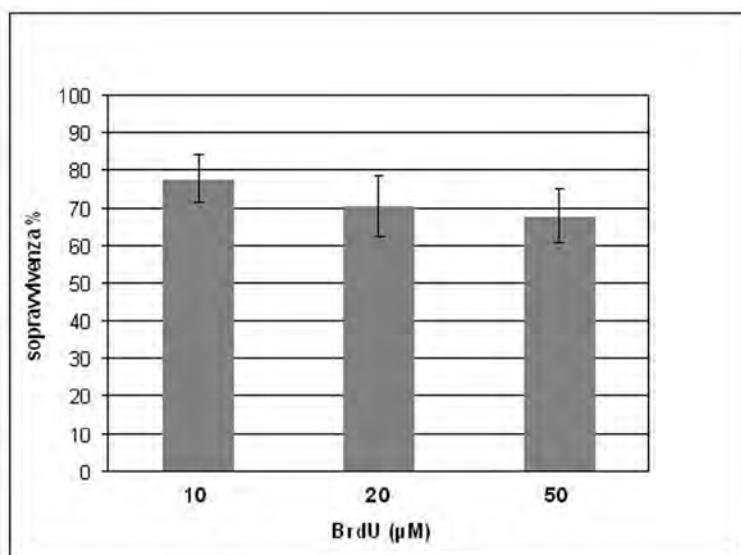


Fig. 1: istogramma relativo alla sopravvivenza di cellule della linea DHD in seguito a trattamento di 4 h con BrdU 10, 20 e 50  $\mu\text{M}$ .

La rivelazione della BrdU, effettuata sui cloni cellulari derivanti da cellule precedentemente trattate con BrdU 10  $\mu\text{M}$  per 4h, ha dimostrato che questa può essere evidenziata anche dopo le sei successive divisioni cellulari necessarie per ottenere un clone di almeno 50 cellule ovvero derivante da una cellula vitale (Fig. 2).

L'analisi biparametrica DNA/BrdU, effettuata mediante citometria a flusso, su cellule trattate con BrdU 10  $\mu\text{M}$  per 4h, ha evidenziato che nelle condizioni sperimentali utilizzate per questo studio la frazione di cellule effettivamente proliferanti presenti nella coltura è pari al 52% (Fig. 3).

I dati di sopravvivenza relativi ai campioni trattati con BPA hanno confermato quanto da noi già osservato in

precedenti studi *in vitro*, ovvero che una frazione di cellule, seppur esigua, riesce a sfuggire al trattamento BNCT. Alle condizioni sperimentali adottate, cioè trattamento con 80 ppm di  $^{10}\text{B}$  per 4 h ed irraggiamento neutronico di 10' a potenza di 75 kW, le cellule sopravvissute sono risultate essere l'1%. Il solo irraggiamento neutronico, in assenza di BPA, determina una riduzione della sopravvivenza pari al 30%. I valori di sopravvivenza sono risultati invariati anche in presenza di BrdU.

L'immunorivelazione della BrdU effettuata sui vetrini su cui sono state coltivate le cellule trattate con BPA, BrdU e BPA+BrdU, esposte e non al fascio neutronico e la loro successiva osservazione microscopica hanno consentito di trarre le seguenti informazioni (Fig. 4):

l'irraggiamento neutronico effettuato, secondo le modalità descritte, su cellule DHD in sospensione, non trattate con BPA e/o BrdU, non induce alterazioni morfologiche rilevabili a carico dei cloni (CTR; IR<sup>+</sup>);

cellule trattate con sola BrdU e sottoposte ad irraggiamento neutronico hanno originato sia cloni positivi alla immunorivelazione con BrdU che cloni negativi, come prevedibile dal valore di LI ottenuto dall'analisi citofluorimetrica pari a circa il 50%. Anche in presenza di BrdU l'irraggiamento neutronico non ha prodotto danni morfologici rilevabili (BrdU; IR<sup>+</sup>);

il trattamento BNCT, ovvero l'irraggiamento neutronico in presenza di BPA, ha evidenziato la massiva presenza di cellule singole estremamente danneggiate e di piccoli cloni abortivi (BPA; IR<sup>+</sup>, dx- sn). È stata però rilevata la presenza di qualche clone composto dal numero di cellule richiesto per poter ritenere vitali le cellule di origine (BPA; IR<sup>+</sup>, centro). Sono quindi effettivamente presenti cellule refrattarie al trattamento BNCT, come già precedentemente osservato;

il trattamento BNCT di campioni esposti a BPA+BrdU evidenzia che i cloni sopravvissuti sono negativi alla BrdU (BPA+BrdU; IR<sup>+</sup>, sn) Cellule positive alla BrdU sono gravemente danneggiate e alcune evidenziano marcati caratteri apoptotici (BPA+BrdU; IR<sup>+</sup>, dx).

#### Conclusioni

I risultati conseguiti hanno innanzitutto dimostrato la validità dell'approccio metodologico utilizzato per validare l'ipotesi dell'esistenza di una relazione fra stato proliferativo cellulare, captazione intracellulare di BPA e resistenza al trattamento BNCT. L'impiego di BrdU si è rivelato ininfluente sulla sopravvivenza cellulare, sia in assenza che in presenza di irraggiamento, ed estremamente efficace per individuare i cloni cellulari derivati da cellule proliferanti. L'evidenza che gli unici cloni sopravvissuti al trattamento BNCT sono negativi alla BrdU conferma quanto da noi ipotizzato, ovvero



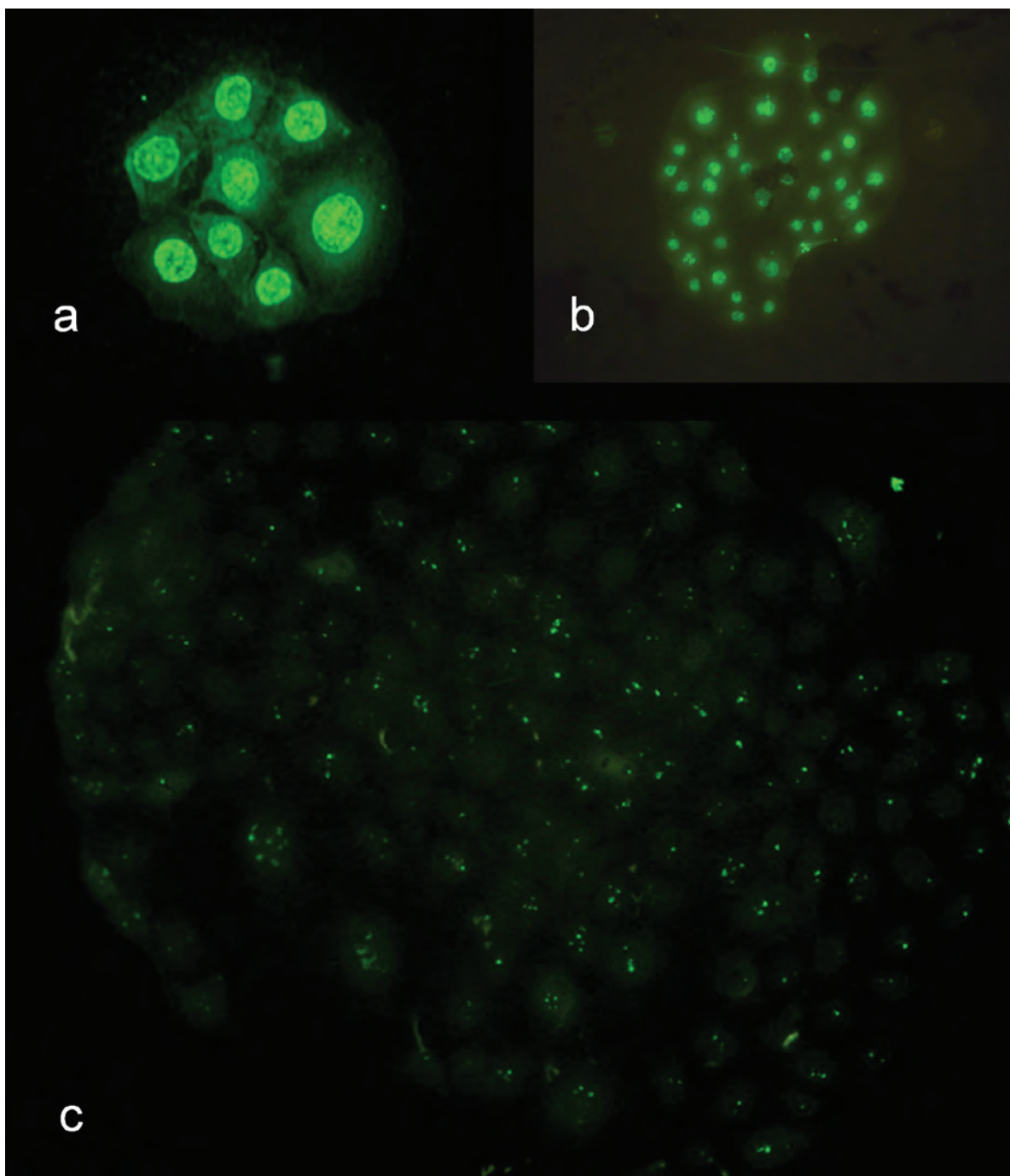


Fig. 2: Cloni cellulari positivi alla immunorivelazione indiretta della BrdU con anticorpo secondario coniugato con FITC, derivanti da cellule in origine trattate con BrdU 10  $\mu$ M per 4 h: microfotografie in fluorescenza effettuate a giorni successivi dalla semina: a) tre giorni (40x); b) cinque giorni (20x) e c) sei giorni (40x), corrispondenti a sei divisioni cellulari in cui è ancora ben riscontrabile la presenza di marcatura.

l'incapacità di alcune cellule non proliferanti di captare quantità sufficienti di BPA per poter essere distrutte dal trattamento neutronico. Viceversa, cellule in fase proliferativa, quindi BrdU positive al momento dell'esposizione a BPA, evidentemente in grado di captare adeguate quantità di  $^{10}\text{B}$ , risultano irreversibilmente danneggiate dal trattamento neutronico e di conseguenza non riescono a sopravvivere. Non si evidenziano infatti cloni positivi alla BrdU bensì solo cellule singole altamente danneggiate. I cloni derivanti da cellule esposte ad irraggiamento neutronico a seguito di trattamento con

BPA+BrdU appaiono marcati unicamente con IP, quindi derivano da cellule non proliferanti che riescono ad accumulare quantità di boro insufficienti per l'efficacia della terapia.

È pertanto possibile confermare quanto ipotizzato, ovvero che esiste una relazione fra stato proliferativo cellulare, entità di accumulo di BPA e presenza di una frazione di cellule refrattaria al trattamento BNCT che ne compromette la radicalità. Tali cellule potrebbero essere riconducibili a cellule staminali tumorali che in quanto quiescenti non necessitano di accumulare elevati quanti-

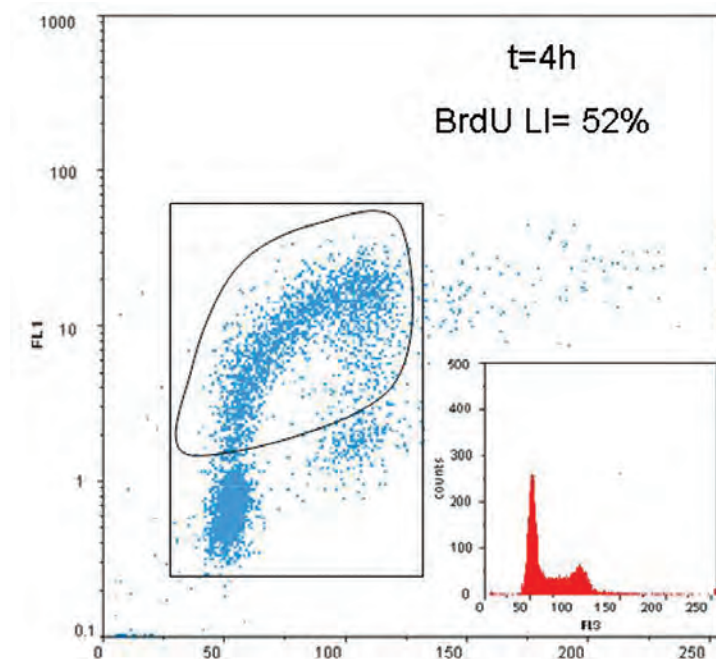


Fig. 3: tracciato dell'analisi biparametrica a flusso DNA/Brdu e del relativo istogramma del DNA di cellule della linea DHD esposte per 4 h a Brdu 10  $\mu$ M.

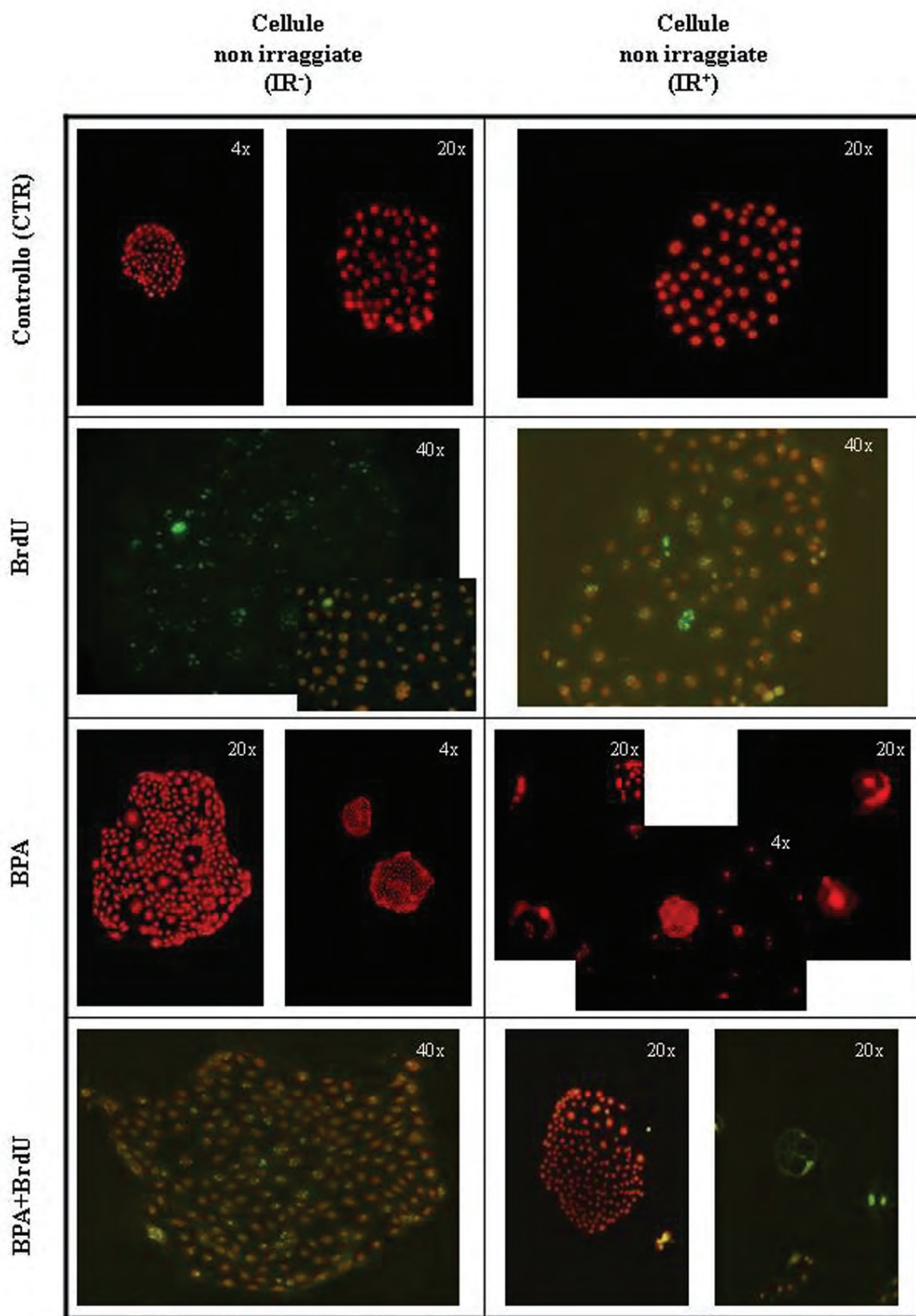
tivi di aminoacidi e quindi neppure del derivato aminoacidico BPA.

Nell'ambito dell'ottimizzazione della BNCT, riveste quindi carattere di primaria importanza, l'identificazione di nuovi trasportatori del  $^{10}\text{B}$  il cui accumulo da parte delle cellule neoplastiche sia indipendente dal loro stato proliferativo.

### Bibliografia

- 1) Manuale GIC "Citometria a flusso" (1998) a cura di Giuseppe Starace.
- 2) Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*. 1982; 218(4571):474-475.
- 3) Dolbear F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. *Histochem*. 1995; 27(5):339-369.
- 4) Wilson GD, McNally NJ, Dunphy E, Kärcher H, Pfragner R. The labelling index of human and mouse tumours assessed by bromodeoxyuridine staining in vitro and in vivo and flow cytometry. *Cytometry*. 1985; 6(6):641-647.
- 5) Mazzini G, Danova M, Ferrari C, Giordano M, Dionigi P, Riccardi A. Cell proliferation and ploidy of human solid tumours: methodological experience with in vivo bromodeoxyuridine and DNA flow cytometry. *Anal. Cell. Pathol*. 1996; 10(2):101-113.
- 6) Dionigi P, Ferrari A, Jemos V, Luinetti O, Vai L, Guizzetti M, Ferrari C, Jemos K, Spada M, Mazzini G. Tumor cell proliferation in early gastric cancer: biological and clinical behavior. *Hepatogastroenterology*. 2004; 51(55):264-268.
- 7) Locher GL. Biological effects and therapeutical possibilities of neutrons. *Am. J. Roentgenol. Radium. Ther.* 1936; 36:1-13.
- 8) Coderre JA, Turcotte JC, Riley KJ, Binns PJ, Harling OK, Kiger WS, 3rd. Boron Neutron Capture Therapy: Cellular targeting of high linear energy transfer radiation. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2003; 2(5):355-375.
- 9) Barth RF, Coderre JA, Vicente MGH, Blue TE. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11:3987-4002.

- 10) Søyland C, Hassfjell SP. Survival of human lung epithelial cells following in vitro alpha-particle irradiation with absolute determination of the number of alpha-particle traversals of individual cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 2000; 76(10):1315-1322
- 11) Capala J, Makar MS, Coderre JA. Accumulation of boron in malignant and normal cells incubated in vitro with boronophenylalanine, mercaptoborane or boric acid. *Radiat. Res.* 1996;146(5):554-560.
- 12) Dorn RV. Boron neutron capture therapy (BNCT): a radiation oncology perspective. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1994; 28:1189-1201.
- 13) Ono K, Masunaga S, Suzuki M, Kinashi Y, Takagaki M, Akaboshi M. The combined effect of borophenylalanine and boro captate in boron neutron capture therapy for SCCVII tumors in mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1999; 43:431-436.
- 14) Panov V, Salomon Y, Kabalka GW, Bendel P. Uptake and washout of borocaptate sodium and borono-phenylalanine in cultured melanoma cells: a multi-nuclear NMR study. *Radiat Res* 2000; 154 (1): 104-112.
- 15) Wittig A, Malago M, Collette L, Huiskamp R, Bührmann S, Nievaart V, Kaiser GM, Jöckel KH, Schmid KW, Ortmann U, Sauerwein WA. Uptake of two  $^{10}\text{B}$ -compounds in liver metastases of colorectal adenocarcinoma for extracorporeal irradiation with boron neutron capture therapy (EORTC Trial 11001). *Int J Cancer*. 2008; 122(5):1164-1171.
- 16) Farr LE, Sweet WH, Robertson JS, Forster GS, Locksley HB, Sutherland DL, Mendelsohn ML, Stickey EE. Neutron capture therapy with boron in the treatment of glioblastoma multiforme. *Am. J. Roentgenol.* 1954; 71:279-291.
- 17) Capala J, Stenstam BH, Sköld K, Munck af Rosenschöld P, Giusti V, Persson C, Wallin E, Brun A, Franzen L, Carlsson J, Salford L, Ceberg C, Persson B, Pellettieri L, Henriksson R. Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme: clinical studies in Sweden. *J. Neurooncol.* 2003; 62(1-2):135-144.
- 18) González SJ, Bonomi MR, Santa Cruz GA, Blaumann HR, Calzetta Larriue OA, Menéndez P, Jiménez Rebagliati R, Longhino J, Feld DB, Dagrosa MA, Argerich C, Castiglia SG, Batistoni DA, Liberman SJ, Roth BM. First BNCT treatment of a skin melanoma in Argentina: dosimetric analysis and clinical outcome. *Appl. Radiat. Isot.* 2004; 61(5):1101-1105.
- 19) Zonta A, Prati U, Roveda L, Ferrari C, Zonta S, Clerici AM, Zonta C, Pinelli T, Fossati F, Altieri S, Bortolussi S, Bruschi P, Nano R,



**Fig. 4:** Microfotografie in fluorescenza di cellule e cloni cellulari dopo sette giorni di coltura, derivanti da campioni cellulari non trattati (prima riga) e trattati con BrdU, BPA e BPA+BrdU sottoposti ad irraggiamento neutronico (colonna dx) e da corrispettivi campioni non irradiati (colonna sn). Fluorescenza rossa derivante da nuclei cellulari colorati con ioduro di propidio (IP) e fluorescenza verde derivante dalla immunomarcatura della BrdU con anticorpo secondario coniugato con FITC. Le immagini che si riferiscono a campioni BPA/IR<sup>+</sup> evidenziano, accanto a cellule altamente danneggiate, la presenza di cloni derivanti da cellule refrattarie al trattamento. Quelle relative a campioni BPA+BrdU/IR<sup>+</sup> dimostrano che i cloni, derivanti da cellule sfuggite al trattamento, non presentano fluorescenza verde, quindi sono costituiti da cellule in cui la BrdU è assente e che hanno avuto quindi origine da cellule non proliferanti al momento del trattamento BPA+BrdU. Al contrario è evidente come le cellule altamente danneggiate, positive alla immunorivelazione della BrdU, dimostrano l'esistenza di una relazione fra stato proliferativo cellulare, captazione di BPA e sopravvivenza al trattamento BNCT.

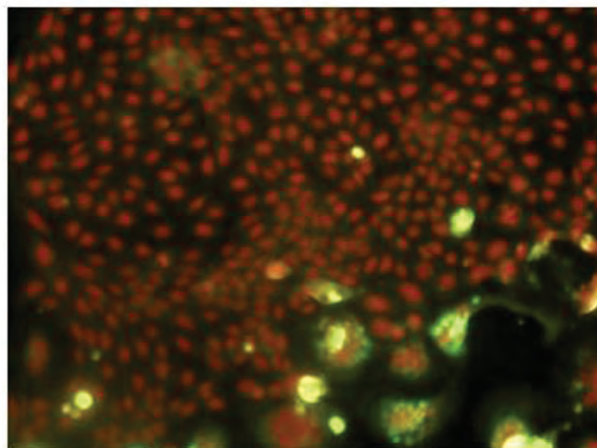
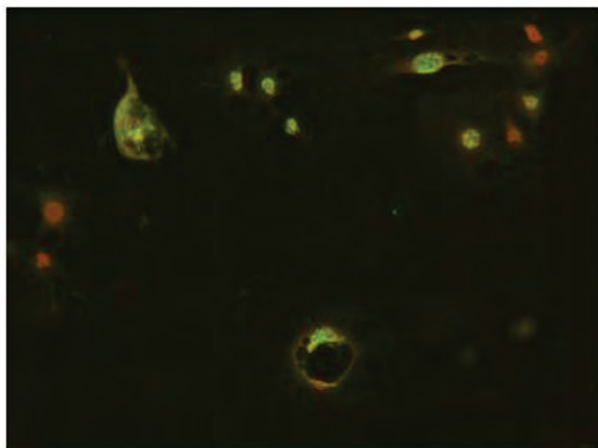


Fig. 5: Microfotografie in fluorescenza (20x) di cellule sottoposte ad irraggiamento neutronico previo trattamento con BPA+BrdU. Le immagini si riferiscono a campioni di cellule coltivate per tre giorni (sn) e per dieci giorni (dx) dopo il trattamento. E' evidente come le cellule maggiormente danneggiate siano quelle positive alla BrdU, in quanto, il loro stato proliferativo ha determinato, al momento del trattamento, l'accumulo di una quantità sufficiente di boro per poter poi assorbire una dose letale di radiazioni in seguito all'irraggiamento neutronico. Al contrario i cloni cellulari derivanti da cellule sopravvissute al trattamento risultano negativi alla BrdU, quindi derivano da cellule non proliferanti e incapaci di accumulare le quantità di boro necessarie per rendere efficace il trattamento.

Barni S, Chiari P, Mazzini G. Clinical lessons from the first applications of BNCT on unresectable liver metastases. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2006; 41:484-495.

20) Zonta A, Pinelli T, Prati U, Roveda L, Ferrari C, Clerici AM, Zonta C, Mazzini G, Dionigi P, Altieri S, Bortolussi S, Bruschi P, Fossati F. Extra-corporeal liver BNCT for the treatment of diffuse metastases: what was learned and what is still to be learned. *Appl. Radiat. Isot.* 2009; 67(7-8 Suppl):S67-75.

21) Ferrari C, Bakeine J, Ballarini F, Boninella A, Bortolussi S, Bruschi P, Cansolino L, Clerici AM, Coppola A, Di Liberto R, Dionigi P, Protti N, Stella S, Zonta A, Zonta C, Altieri S. In vitro and in vivo studies of boron neutron capture therapy: boron uptake/washout and cell death. *Radiat. Res.* 2011; 175(4):452-462.



## In libreria

a cura del "Lettore"

### CHIMICA ANALITICA QUALITATIVA

#### Metodo Periodale - 3<sup>a</sup> Edizione

A. Aràneo

Casa Editrice Ambrosiana Milano pag. 661

Sito web: [www.ceaedizioni.it](http://www.ceaedizioni.it)

Questo libro si propone di rendere lo studio dell'analisi qualitativa, il più possibile concorde e parallelo a quello della chimica inorganica. Pertanto in esso viene adottata una nuova suddivisione degli elementi chimici in gruppi analitici, suddivisione basata sul sistema periodico degli elementi, donde il nome di "metodo di analisi sistematica periodale"; con questa suddivisione viene adottato anche un nuovo procedimento analitico, rapido e moderno.

Questa nuova edizione presenta interessanti innovazioni, innanzitutto è cambiata la veste tipografica, arricchita di colori con intendimenti didattici, con un criterio di funzionalità.

È stata accentuata l'importanza degli aspetti ecologici della materia, e pertanto è stato aggiunto un breve capitolo in cui viene descritto un metodo per il trattamento degli scarichi dei laboratori che permette di recuperare e riutilizzare le sostanze più inquinanti.

"Chimica Analitica Qualitativa" è un libro che si caratterizza per completezza di informazioni e semplicità di trattazione, insieme a schemi facilmente interpretabili.



# Metodologie Citometriche nella Biologia e nella Clinica

## CORSO DI FORMAZIONE A DISTANZA FAD

### Accreditato ECM 25 crediti

La seconda edizione 2013/2014 del corso di Formazione a Distanza ECM FAD “Metodologie Citometriche nella Biologia e nella Clinica” che proponiamo è composto da 4 moduli didattici, ciascuno ottenuto dalla rielaborazione di alcuni articoli già pubblicati sulla nostra Rivista, e corredati con le immagini che vi sono pubblicate ad alta definizione che trattano argomenti di Biologia Cellulare, Ematologia, Immunologia e Oncologia, in cui le metodologie citometriche svolgono un ruolo significativo.



La “rielaborazione”, curata dal PROVIDER, consiste nella creazione di un “libro sfogliabile” consultabile in rete, o scaricabile sul proprio PC, con tutti i riferimenti bibliografici interrogabili.

Ai fini dei crediti ECM il TEST di VERIFICA dell'APPRENDIMENTO è composto da 4 domande per ogni credito attribuito a scelta quadrupla con una sola risposta esatta. Ogni iscritto è tenuto a svolgere completamente il TEST online, entro la data di scadenza del Corso, il 30 aprile 2014, attraverso la piattaforma del Provider dalla quale è possibile poi stampare autonomamente l'attestato. La formazione a distanza nella formulazione qui proposta:


- offrirà agli iscritti un nuovo modo di fare formazione, efficace e certamente più economico (in termini di costo/credito ECM).
- consentirà a ciascun discente una formazione allineata con le proprie disponibilità di tempo e riconoscerà agli autori il ruolo di docenti e formatori.

Al corso sono stati concessi 25 crediti ECM.

Il corso può essere svolto anche dai Partecipanti alla prima edizione ed è riservato ai soci GIC in regola con le quote associative ed agli iscritti alla Conferenza 2013 e avrà validità 12 mesi dalla data di attivazione, 1 maggio 2013; i crediti saranno assegnati per l'anno solare in cui il Partecipante svolge il test di apprendimento.

Per informazioni e per ricevere la scheda per la domanda d'iscrizione rivolgersi alla Segreteria GIC e alla Segreteria Italymeeting.

#### Segreteria Scientifica

Società Italiana di Citometria   
c/o Unità Biologia delle Radiazioni e Salute dell'Uomo  
ENEA Centro Ricerche Casaccia s.p. 016  
Via Anguillarese, 301 - 00123 Roma  
e-mail: gic@enea.it - <http://biotec.casaccia.enea.it/GIC/>

#### Segreteria Organizzativa

Italymeeting s.r.l.   
Via Parsano, 6/b - 80067 Sorrento NA  
tel. 081 8073525 – 081 878460 - fax 081 807193  
e-mail: [citometriaGIC@italymeeting.it](mailto:citometriaGIC@italymeeting.it)  
<http://www.italymeeting.it>



## **Isolation and Analysis of Rare Cells in the Blood of Cancer Patients Using a Negative Depletion Methodology**

Wu Y, et Al.

Department of Chemical and Biomolecular Engineering,  
The Ohio State University, Columbus,  
*Methods* 2013 Sep 19. pii: S1046-2023(13)00366-6

..... a negative depletion process is presented and discussed which consists of red blood cell (RBC) lysis and the subsequent removal of CD45 expressing cells through immunomagnetic depletion. .... The necessity of exploring different anti-CD45 antibody clones to label CD45 expressing cells in this enrichment scheme ..... An optimized, four-color immunofluorescence staining is conducted on the cells retained after the CD45-based immunomagnetic depletion process. Different types of rare non-hematopoietic cells are found in these enriched peripheral blood samples .....

## **Upregulation of CD11b on Eosinophils in Aspirin Induced Asthma**

Isogai S, et Al.

Division of Respiratory Medicine and Clinical Allergy,  
Department of Internal Medicine, Fujita Health  
University School of Medicine, Aichi, Japan.  
*Allergol Int.* 2013 Sep;62(3):367-73

Although a challenge test using non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is crucial for diagnosis of aspirin-induced asthma (AIA), ..... were examined using flowcytometry. Aspirin induced a significant increase in CD11b expression on eosinophils (CD16 negative granulocytes)..... The measurement of CD11b expression on peripheral-blood eosinophils showed very high sensitivity and specificity of (-95%) in diagnosing AIA.....

## **Donor hematopoietic stem cells confer long-term marrow reconstitution by self-renewal divisions exceeding to that of host cells**

Roy S, et Al.

Stem Cell Biology, National Institute of Immunology,  
New Delhi, India.  
*PLoS One.* 2012;7(12):e50693. doi: 10.1371/journal.pone.0050693. Epub 2012 Dec 5

Dormant hematopoietic stem cells (HSCs) are activated by microenvironmental cues of the niche in response to the injury of bone ..... The presence of donor cells initially stimulated the proliferation of host LSK cells compared with control mice without transplantation. This was expected due to pro-mitotic and anti-apoptotic factors ..... Activation of donor LSK cells was found to be dynamically controlled by BM cellularity. Long-term study showed .....

## **The study of epigenetic mechanisms based on the analysis of histone modification patterns by flow cytometry**

Watson M, et Al.

Ontario Cancer Institute/Princess Margaret Hospital,  
Toronto, ON M5G 2M9, Canada.  
*Cytometry A.* 2013 Aug 26. doi: 10.1002/cyto.a.22344.  
[Epub ahead of print]

Epigenetic regulation of genes involved in cell growth, survival, or differentiation through histone modifications is an important determinant of cancer development ..... Significant cellular heterogeneity in H3K9ac and H3K27me3 staining was seen in normal peripheral blood, ..... H3K27me3 in particular showed considerable inter-patient heterogeneity in the leukemia cell populations. .... fully optimize sample staining protocols, "flow epigenetics" appears to be technically feasible, and to have potential .....

## **Flow cytometry and sorting in Arabidopsis**

Galbraith DW.

School of Plant Sciences, University of Arizona, Tucson,  
AZ, USA.  
*Methods Mol Biol.* 2014;1062:509-37.

Higher plants offer unique challenges in terms of flow cytometric analysis..... This chapter focuses on the use of flow cytometry and cell sorting with the model species *Arabidopsis thaliana*, in particular addressing: fluorescence in vivo labeling of specific cell types; fluorescence-activated sorting of protoplasts and nuclei, and transcriptome analyses using sorted protoplasts and nuclei .....

## **Analysis of spatial correlations between patterns of DNA damage response and DNA replication in nuclei of cells subjected to replication stress or oxidative damage**

Bernas T, et Al.

Division of Cell Biophysics, Faculty of Biochemistry,  
Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University,  
Krakow, Poland; Nencki Institute of Experimental  
Biology, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland.  
*Cytometry A.* 2013 Jul 30. doi: 10.1002/cyto.a.22325.  
[Epub ahead of print]

Sites of DNA replication (EdU incorporation) and DNA damage signaling ( $\gamma$ H2AX) induced by ..... The damage and replication foci are imaged in 3D with confocal microscopy and their respective positions within nuclei are determined with adaptive image segmentation. Using correlation functions spatial proximity of the resultant point patterns .....



**STEMCELL**  
TECHNOLOGIES

*Ready·Sep·Go*

## Ready·Sep·Go

### Cell Separation in as Little as 15 Minutes

Isolate highly purified cells from a wide range of sample sources and sizes in as little as 15 minutes with the fast, easy and column-free cell separation platforms by STEMCELL Technologies.

**FAST AND EASY.** Cells are ready in as little as 15 minutes with no columns.

**VERSATILE.** Isolate cells directly from virtually any sample source, including whole blood and leukapheresis samples.

**GENTLE.** Highly purified viable cells are immediately ready for functional and biological studies.



### +EasySep™

#### Fast and Easy Immunomagnetic Cell Separation

The EasySep™ system isolates cells quickly and easily without the use of columns in as little as 15 minutes. With a simple pour, isolated functional cells are immediately ready for downstream use.



### ⚙️RoboSep™

#### Fully Automated Immunomagnetic Cell Separation

RoboSep™ fully automates all cell labeling and separation steps of the EasySep™ procedure, minimizing sample handling and freeing up technician time.



### ⚙️RosetteSep™

#### Unique Immunodensity Cell Separation

RosetteSep™ isolates highly purified cells directly from human whole blood during density gradient centrifugation, reducing your cell isolation workflow to a single step.



### ⚙️SepMate™

#### Hassle-Free PBMC Isolation

SepMate™ enables consistent and hassle-free peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation in just 15 minutes, minimizing variability between separations.

Divisione Scientifica:  
Viale I Maggio 4/B  
I - 20068 Peschiera Borromeo (MI)  
Tel. 02 55305565 - Fax 02 55302971

web: [www.vodenmedical.com](http://www.vodenmedical.com)  
e-mail: [info@vodenmedical.com](mailto:info@vodenmedical.com)





Miltenyi Biotec

# Only one thing is missing.

**Antibodies & Vio® Dyes**  
Thousands of antibodies  
for multicolor applications

**FlowJo® Software**  
The leading flow cytometry  
data analysis software

## A flow sorter.

Stay tuned for the  
revolutionary new  
instrument  
coming soon.



**Kits & Assays**  
Simple solutions for  
complex experiments

**MACSQuant® Instruments**  
Powerful and automated  
flow cytometers

► [macsquant.com](http://macsquant.com)

Miltenyi Biotec S.r.l. | Via Persicetana, 2/D | 40012 Calderara di Reno (BO) | Italy | Phone +39 051 6 460 411 | Fax +39 051 6 460 499  
macs@miltenyibiotec.it | [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com)

Unless otherwise specifically indicated, Miltenyi Biotec products and services are for research use only and not for therapeutic or diagnostic use. MACS, MACSQuant, and Vio Dyes are registered trademarks of Miltenyi Biotec GmbH. Copyright © 2013 Miltenyi Biotec GmbH. All rights reserved.