



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Tecniche di Laboratorio Biomedico

**ANALISI CITOFLUORIMETRICA DELLE
SOTTOPOPOLAZIONI MONOCITARIE
SU SACCHE DI LEUCOAFERESI
DI PAZIENTI AFFETTI DA MIELOMA MULTIPLO
E CANDIDATI AD AUTOTRAPIANTO DI
CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE:
ASPETTI TECNICO-METODOLOGICI**

Relatore:

Chiar.ma Dott.ssa Nadia Viola

Tesi di Laurea di:

Maira Ferri

Correlatore:

Prof. Andrea Costantini

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 MIELOMA MULTIPLO	1
1.1.1 PATOGENESI	2
1.1.2 LA DIAGNOSI	4
1.1.3 LA TERAPIA	6
1.2 TRAPIANTO AUTOLOGO CELLULE STAMINALI (ASCT)	7
1.3 SOTTOPOPOLAZIONE MONOCITARIA	11
2. SCOPO DELLA TESI	15
3. MATERIALI E METODI	16
3.1 POPOLAZIONE DELLO STUDIO	16
3.2 MARCATURA CON ANTICORPI MONOCLONALI	16
3.3 ACQUISIZIONE AL CITOFLUORIMETRO	18
3.4 ANALISI STATISTICA	21
4. RISULTATI	22
4.1 DISTRIBUZIONE DELLE SOTTOPOPOLAZIONI MONOCITARIE	22
5. DISCUSSIONE	27
6. CONCLUSIONE	32
BIBLIOGRAFIA	33
RINGRAZIAMENTI	38

1. Introduzione

1.1 Mieloma Multiplo

Il Mieloma Multiplo (MM) è una neoplasia maligna del midollo osseo che colpisce in particolare le plasmacellule. È una patologia non suscettibile di guarigione ma altamente trattabile, tipica dell'età avanzata, la cui diffusione si è mantenuta piuttosto stabile nel tempo, mentre la mortalità è in lieve calo.

Il mieloma multiplo rappresenta circa l'1% di tutti i tumori nel mondo e il 10-15% di tutte le neoplasie ematologiche.

È una patologia leggermente più diffusa negli uomini che nelle donne: nel nostro Paese in media vengono diagnosticati ogni anno 9,8 nuovi casi ogni 100.000 uomini e 7,6 nuovi casi ogni 100.000 donne. In Italia le stime relative al 2017 parlano di poco più di 2.700 nuovi casi di mieloma ogni anno tra le donne e circa 3.100 tra gli uomini.¹

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) definisce il MM una patologia maligna sistemica linfoproliferativa a cellule B. È caratterizzata da una proliferazione incontrollata di plasmacellule nel midollo osseo che producono un'elevata quantità di immunoglobuline non funzionanti, o parti di esse.

Il MM può danneggiare il tessuto osseo, attivando gli osteoclasti e causando fratture patologiche, inoltre può essere presente una riduzione della funzionalità renale dovuta sia all'ipercalcemia sia ad un effetto diretto delle immunoglobuline sul tubulo renale.

1.1.1 Patogenesi

La patogenesi del mieloma multiplo non è stata ancora del tutto delucidata, ma recenti studi hanno evidenziato la presenza di anomalie nella struttura dei cromosomi e in alcuni specifici geni dei pazienti affetti da questa patologia.

Il MM origina da cloni pre-maligni di plasmacellule che hanno completato la maturazione nei centri germinativi. Tuttavia, essendo le plasmacellule prive di capacità maturativa, il MM potrebbe originare dai linfociti B della memoria.²

Queste cellule oltre a dare inizio alla malattia potrebbero agire anche da “reservoir” ed essere responsabili delle recidive.

Probabilmente i casi di MM evolvono da una condizione premaligna nota come gammopatia monoclonale di significato incerto (MGUS). Il sistema di stratificazione del rischio maggiormente accreditato è quello del gruppo *Mayo Clinic* basato su tre fattori:

- isotipo Ig coinvolto (non G)
- entità componente M (>1,5 g/dl)
- alterazione del rapporto fra le catene leggere libere nel siero kappa e lambda (FLC ratio <0,26 o >1,65).³

CLASSE DI RISCHIO	NUMERO FATTORI	RISCHIO EVOLUZIONE (20 anni)
Basso	0	5%
Basso-intermedio	1	21%
Intermedio-alto	2	37%
Alto	3	58%

Tabella 1: Classi di rischio

Nel MM, come in generale in tutte le neoplasie, il numero di cromosomi è un potente fattore prognostico. L'ipoploidia, cioè la perdita di materiale genetico, è correlata ad una prognosi più severa, mentre l'iperploidia è associata ad *outcomes* migliori: una probabile spiegazione risiede nel fatto che l'ipoploidia, presente in circa il 10% dei MM, è associata a perdita di funzioni come ad esempio la soppressione tumorale. ⁴

L'iperploidia invece è presente nel 30% dei MM ed è una delle due aberrazioni cromosomiche responsabili dello sviluppo della neoplasia. ⁵

L'altra causa principale è la traslocazione del gene delle catene pesanti, presente nel 50% delle MGUS e nel 60-70% dei MM: la fusione di questo gene con il promotore della trascrizione delle IgH ne provoca un'elevata espressione. ⁶

Altre traslocazioni abbastanza comuni, presenti rispettivamente nel 30% e nel 15% dei MM, sono la t(11;14)(q13,q32), che causa una iperespressione della ciclina D1 ed è correlata ad un fenotipo non secretivo di tipo "linfoplasmacitico"⁷ e la t(4;14)(p16;q32) che causa la sovraregolazione del gene per il *Fibroblast Growth Factor Receptor 3*, un potenziale bersaglio della terapia con inibitori delle tirosinchinasi. ⁸

Un'aberrazione cromosomica importante è la *gain* di 1q21, quasi sempre assente nella MGUS, ma presente nel 40% circa dei MM all'esordio e nel 70% delle recidive.

⁹

Le alterazioni cromosomiche più frequentemente associate ad una prognosi sfavorevole sono t(4;14), del(17p), t(14;16) e le anomalie del cromosoma 1: in caso siano presenti si parla di pazienti che rientrano nella categoria "alto rischio", altrimenti nel "rischio standard". ¹⁰

L'età è il principale fattore di rischio per il mieloma multiplo: oltre due terzi delle diagnosi di mieloma riguardano persone di età superiore ai 65 anni e solo l'1% delle persone al di sotto dei 40 anni. ¹¹

Insieme alle radiazioni ionizzanti, ai pesticidi e al benzolo, l'obesità e l'infezione cronica sono state indicate come fattori che favoriscono l'insorgenza del mieloma multiplo. ¹²

Un altro fattore di rischio è la gammopatia monoclonale: il midollo osseo produce un'eccessiva quantità di immunoglobuline monoclonali, cioè prodotte tutte da un solo clone plasmacellulare e tutte uguali fra di loro.

La forma più comune di gammopatia monoclonale è l'MGUS (*Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*): è una patologia asintomatica e viene diagnosticata in seguito al riscontro di una componente monoclonale nel sangue o nelle urine, di natura precancerosa, che non richiede alcuna terapia, ma solo un'attenta sorveglianza con un programma di *follow-up* clinico laboratoristico per valutare la classe di rischio e la possibilità di evoluzione.

Solo il 25% delle MGUS evolve verso il mieloma multiplo entro 10 anni dalla diagnosi. ¹³

1.1.2 La diagnosi

I sintomi del mieloma multiplo sono dolore osseo persistente e inspiegabile, soprattutto di notte o a riposo, innalzamento dei livelli proteici ematici o urinari, ipercalcemia, insufficienza renale o anemia, di solito in soggetti con età maggiore di 40 anni.

La valutazione laboratoristica comprende: ¹⁴

- Emocromo completo, striscio di sangue periferico, velocità di eritrosedimentazione e pannello di chimica (azotemia, creatinina, calcio, acido urico, LDH);
- Elettroforesi delle proteine del siero e delle urine (su una raccolta delle urine nelle 24 h) seguita da immunofissazione;
- Immunoglobuline quantitative; catene leggere libere sieriche;
- RX dello scheletro *total-body*;
- Citogenetica di un campione di sangue midollare con *FISH* (ibridazione fluorescente in situ)

I criteri per la diagnosi di MM più recenti sono quelli dell'International *Myeloma Working Group* (IMWG) del 2014. Essi richiedono il riscontro di almeno uno dei quattro criteri CRAB: ¹⁵

- *Increased calcium* = ipercalcemia,
- *Renal insufficiency* = insufficienza renale,
- *Anaemia* = anemia,
- *Bone lesions* = lesioni osteolitiche

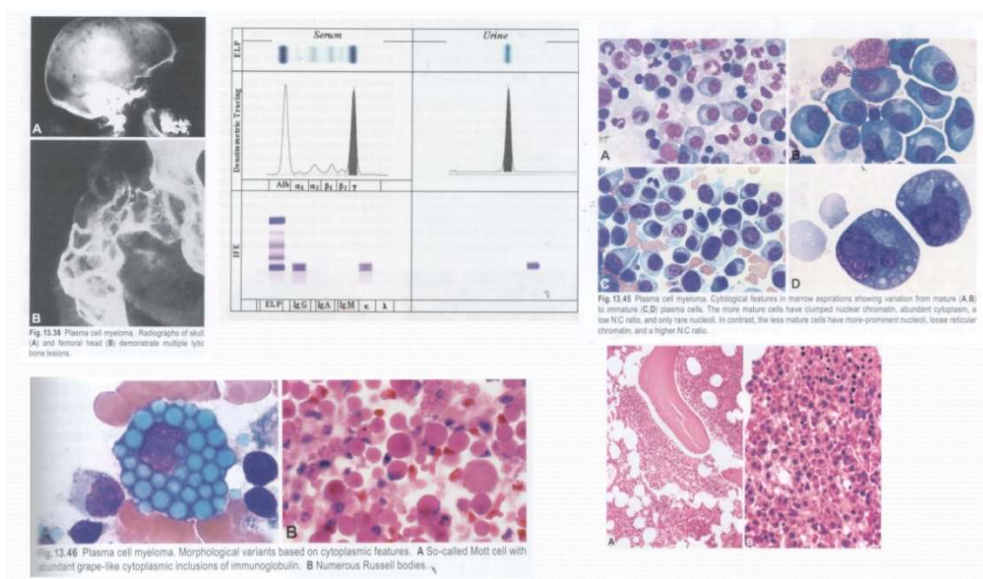


Figura 1: Quadro clinico – laboratoristico – strumentale

1.1.3 La terapia

Gli approcci terapeutici dipendono dalla "forma fisica" e dall'età del paziente: la valutazione iniziale dei pazienti include uno studio dell'idoneità alla terapia ad alte dosi (HDT) e al trapianto autologo di cellule staminali (ASCT) in base all'età, al *performance status* e alle comorbidità.

Il trattamento di prima linea in pazienti con meno di 65 anni in buone condizioni cliniche è il trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche, mentre per i pazienti anziani non candidabili al trapianto si usano terapie farmacologiche, che dipendono dalle condizioni cliniche del paziente.¹⁶

Nell'ultimo decennio, uno dei principali progressi nella gestione del MM è stata l'introduzione di nuovi agenti, talidomide, Bortezomib e Lenalidomide, come parte del trattamento di prima linea nei candidati sia al trapianto autologo che ai non trapiantati.¹⁷⁻¹⁸⁻¹⁹⁻²⁰

Questi farmaci hanno notevolmente migliorato il tasso di risposta completa (*Complete Responce*, CR), senza aumentare sostanzialmente la tossicità e, cosa importante, il tempo alla progressione (*Time To Progression*, TTP), la *progression-free survival* (PFS) e la sopravvivenza globale (*Overall Survival*, OS) sono aumentati significativamente.²¹

Dopo il trapianto viene somministrata una terapia di mantenimento a lungo termine con l'obiettivo di prolungare la durata della risposta, la PFS e, in ultima analisi, l'OS, mantenendo la tossicità minima.

1.2 Trapianto autologo cellule staminali (ASCT)

Il trapianto autologo di cellule staminali è una procedura complessa che prevede un approccio in 5 fasi:

1. Somministrazione di farmaci per la mobilizzazione delle cellule staminali emopoietiche (CSE)
2. Raccolta delle CSE
3. Crioconservazione
4. *High-Dose Therapy* (HDT)
5. Infusione delle cellule staminali emopoietiche dopo scongelamento e monitoraggio dell'attecchimento

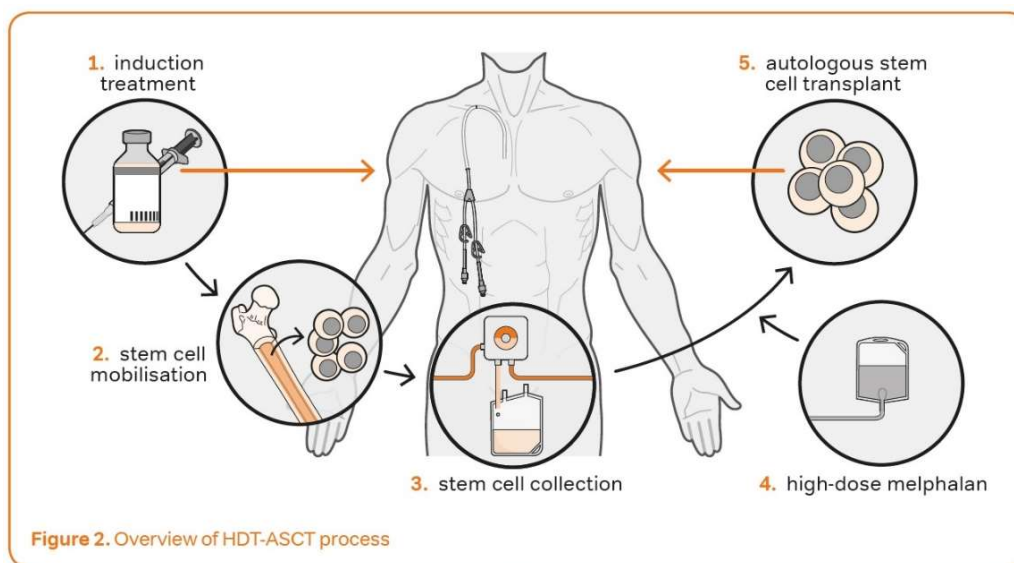


Figura 2: Trapianto autologo cellule staminali (ASCT)

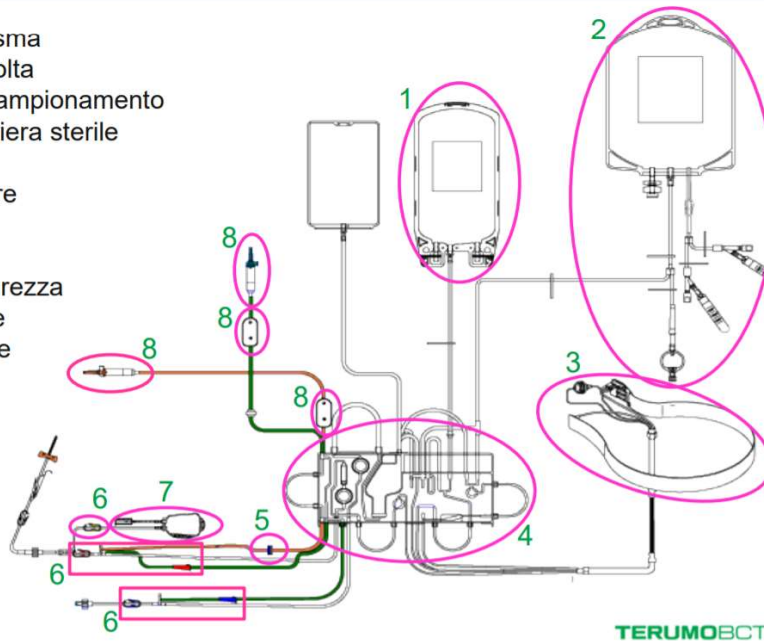
1. Ai pazienti viene somministrata ciclofosfamide seguita da fattori di crescita (G-CSF *Granulocyte Colony Stimulating Factor*) al fine di stimolare la migrazione delle cellule staminali dal midollo osseo al sangue periferico. Una buona resa prevede una raccolta di 5×10^6 CD34+/kg/pz,

in caso di doppio trapianto la dose ottimale è 10×10^6 CD34+/kg per paziente.²²

2. La raccolta di cellule staminali viene realizzata mediante aferesi. Tale procedura può essere eseguita in modalità discontinua o continua. I sistemi aferetici a flusso discontinuo trovano il loro maggiore utilizzo nelle donazioni, in quanto garantiscono maggior *confort* del donatore a scapito dell'efficienza, a causa dei tempi più lunghi della raccolta. Nei sistemi a flusso discontinuo il sangue viene prelevato da un accesso venoso e portato alla centrifuga dove avviene la separazione, in seguito la frazione non separata del sangue viene re-infusa attraverso lo stesso accesso da cui è avvenuto il prelievo. I sistemi a flusso continuo invece utilizzano due accessi venosi, uno per il prelievo e uno per la re-infusione, una volta che il circuito si è riempito il volume in extracorporea rimane costante e raramente supera i 250 ml. Nei sistemi a flusso discontinuo invece, il volume in extracorporea può essere molto maggiore.²³

Circuito di raccolta

1. Sacca del plasma
2. Sacca di raccolta
 - Bulbi di campionamento
 - Filtro barriera sterile
3. Cintura
 - Connettore
 - Camera
4. Cassetta
5. Valvola di sicurezza anticoagulante
6. Clamp colorate
7. Sacca di deviazione
8. Perforatori e tubi colorati
 - Filtri barriera sterili



111]

Figura 3: Circuito di raccolta del sistema di aferesi Spectra Optia

Ad esempio, nel sistema a flusso continuo il sangue intero entra nella cintura e la forza centrifuga separa il sangue nel connettore in strati in base alla densità relativa delle cellule. I globuli rossi (GR) affluiscono passivamente nel reservoir, il plasma viene pompato nel reservoir oppure raccolto e il *buffy-coat* viene aspirato dalla cintura. Il sistema controlla la concentrazione delle cellule (preferenza della raccolta) che attraversano la porta di raccolta regolando la portata della pompa del plasma. Le cellule si accumulano nella camera. Le piastrine vengono re-infuse continuamente al paziente. Quando la camera è piena, le cellule cominciano a fuoriuscire e passano davanti al rilevatore di GR. Il rilevatore di GR individua le cellule e attiva una fase di raccolta. Il plasma viene pompato attraverso la camera per rimuovere il contenuto facendolo confluire nella sacca di raccolta. Il rilevatore di GR rileva le cellule ed emette un segnale acustico. La pompa di raccolta si ferma

e la pompa del plasma e la centrifuga rallentano. La valvola di raccolta si sposta in posizione di raccolta e la pompa di raccolta si riavvia. La portata della pompa di raccolta aumenta e la pompa del plasma si arresta. Il plasma viene pompato nella camera per rimuovere il contenuto e farlo fluire nella sacca.

3. Terminata la raccolta aferetica, le cellule vengono trattate e crioconservate per essere utilizzate dopo la somministrazione della chemioterapia ad alto dosaggio. La procedura viene eseguita sotto una cappa sterile a flusso laminare e consiste nel suddividere la “sacca madre” derivante dalla raccolta aferetica, in sacche da 40 ml di prodotto, a cui vengono aggiunti 40 ml di soluzione criogenica (24 ml albumina 5%, 8 ml albumina 20%, 8 ml DMSO) lentamente, a freddo ed in agitazione. La concentrazione di WBC (*White blood cells*) deve risultare inferiore a $120 \times 10^6/\text{ml}$ per ogni sacca congelata. Si procede poi al congelamento programmato mediante il sistema *ICE CUBE* che è uno strumento dotato di una camera per il raffreddamento in cui viene immesso azoto liquido in modo controllato. Al termine della procedura le sacche vengono stoccate nei contenitori criogenici, ad una temperatura di -150 °C.



Figura 4: Congelatore a discesa di temperatura programmata Ice Cube

4. La *High-Dose Therapy* consiste nel somministrare al paziente un farmaco chemioterapico ad alte dosi in modo da eliminare tutte le cellule “malate” del mieloma multiplo e creare spazio nelle nicchie midollari per l’attecchimento delle CSE sane.
5. Le sacche aferetiche vengono scongelate in bagno termostato a 37°C e re-infuse al paziente. Il successo di un autotrapianto dipende dalla capacità delle cellule staminali di ricostituire il midollo osseo.

1.3 Sottopopolazione monocitaria

All’interno di una sacca aferetica, oltre alle cellule staminali troviamo tutte le altre popolazioni cellulari normalmente presenti nel sangue, quali linfociti, monociti, neutrofili, globuli rossi e piastrine.

I monociti sono una classe eterogenea di leucociti coinvolti nella risposta a pattern molecolari associati a danni e organismi patogeni (DAMPs e PAMPs). Derivano da precursori ematopoietici presenti nel midollo osseo, sono cellule leucocitarie

mononucleate, rappresentano il 5-10% dei leucociti totali e fanno parte delle componenti dell'immunità innata. Si trovano nel torrente circolatorio in forma inattiva e, quando vengono stimolati dalle citochine prodotte a seguito di un'inflammatione, migrano nel focolaio e ivi differenziano in cellule funzionalmente attive chiamate fagociti professionali che hanno azione macrofagica. L'azione fagocitica si esplica inglobando il microrganismo all'interno della cellula per poi degradarlo nel citoplasma attraverso l'azione di enzimi lisosomiali.

I monociti sono classificati in tre sottogruppi a seconda dell'espressione dei *marker* di superficie CD14 e CD16 (CD: *Cluster of Differentiation*):

- monociti classici: con un fenotipo CD14⁺⁺/CD16⁻ e costituiscono l'80 % di tutti i monociti;
- monociti intermedi: con un fenotipo CD14⁺⁺/CD16⁺
- monociti non classici: esprimono un fenotipo CD14⁺/CD16⁺

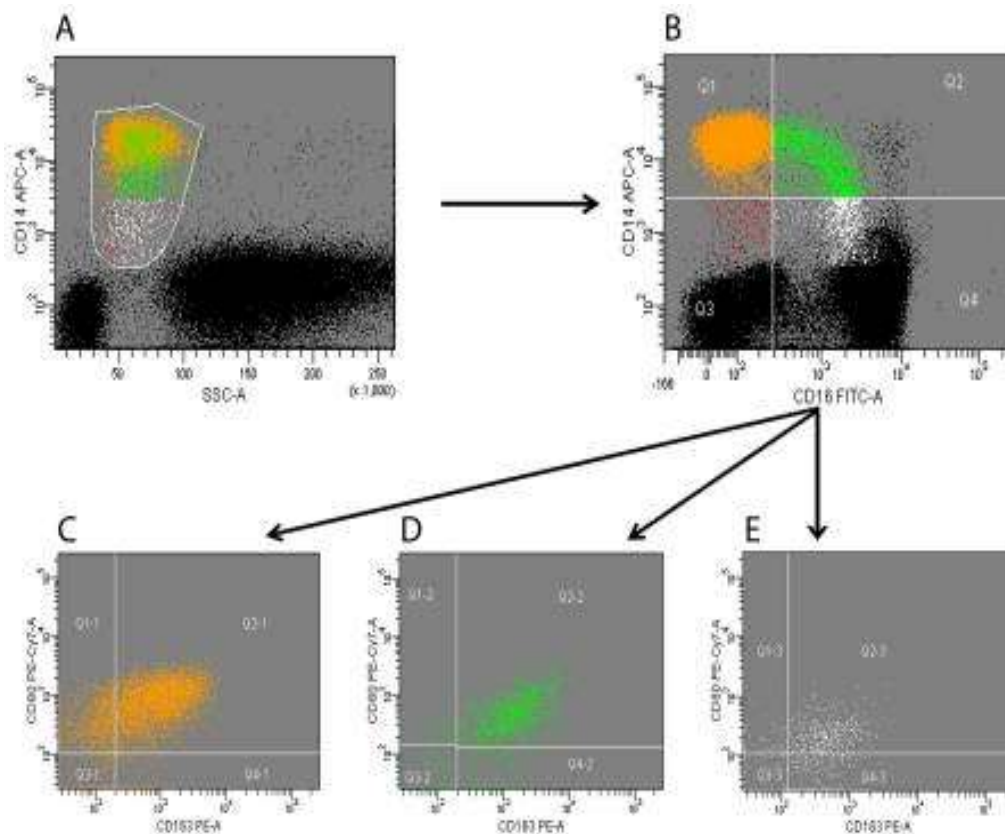


Figura 5: Serie di citogrammi rappresentativi della classificazione monocitaria nelle tre sottopopolazioni classiche, intermedie e non classiche: Pannello B – suddivisione nelle 3 sottopopolazioni in base all’espressione degli antigeni di superficie CD14 e CD16: classici(Q1), intermedie (Q2), non classiche (Q4); Pannelli C-D-E studio dell’espressione dei marker CD80 e CD163 nelle 3 sottopopolazioni

Ciascuna popolazione può essere poi suddivisa in sottopopolazioni in base all’espressione dei *marker* CD80 e CD163, selettivi rispettivamente per il fenotipo M1 e M2, che contraddistinguono un comportamento pro-infiammatorio (tendenza a differenziarsi in macrofago M1) o antinfiammatorio (tendenza a differenziarsi in macrofago M2).²⁴

Questi sottogruppi sono coinvolti anche nella risposta del MM alla terapia, e più in generale influenzano lo sviluppo tumorale in modo non sempre prevedibile e con uno spettro di fenotipi più complesso di quello osservato in vitro, contesto in cui gli M1 sono tradizionalmente considerati antitumorali e gli M2 pro-tumorali. Infatti, uno studio condotto su pazienti affetti da MM e su modelli murini ha dimostrato

come i sottogruppi di macrofagi influenzino la risposta a Bortezomib e la progressione della malattia.²⁵

La complessità dei rapporti che intercorrono fra sottopopolazioni di monociti-macrofagi e il MM viene evidenziata anche da studi incentrati sul sottogruppo M2. Quest'ultimo promuove, tramite fattori di crescita e citochine, l'angiogenesi, la metastatizzazione e la crescita locale dei tumori.²⁶

Gli M2 producono citochine antinfiammatorie e costituiscono la maggior parte dei macrofagi associati ai tumori. È stato ipotizzato che un'abnorme polarizzazione dei macrofagi possa giocare un ruolo nella patogenesi del MM.²⁷

Le citochine prodotte dai macrofagi M2 potrebbero anche alterare l'equilibrio tra osteoblasti e osteoclasti, altra caratteristica del MM.²⁸

2. Scopo della tesi

L'attecchimento di un trapianto è correlato al numero di cellule CD34+ reinfuse al paziente.

Una nota particolare merita l'evidenza della letteratura che sottolinea come i sottotipi monocitari (classici, intermedi e non classici) e la polarizzazione dei macrofagi M1 ed M2 siano correlati con lo sviluppo e la sopravvivenza della nicchia staminale neoplastica del MM e influenzino la possibilità di recidiva.²⁹

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di ottimizzare la tecnica di marcatura dei monociti per studiarne le diverse sottopopolazioni e la loro polarizzazione in citofluorimetria.

Successivamente sono state studiate le popolazioni dei monociti utilizzando l'espressione dei *marker* di superficie CD14, CD16, CD80 e CD163 che li contraddistinguono.

In considerazione di quanto esposto, questo studio si pone come obiettivo sia clinico che prettamente laboratoristico quello valutare in citofluorimetria la presenza, nei prodotti leucaferetici derivanti da aferesi continua e discontinua, dei monociti e la loro polarizzazione ed evidenziare eventuali differenze tra i due metodi di raccolta.

3. Materiali e Metodi

3.1 Popolazione dello studio

I pazienti sono stati reclutati a partire da gennaio 2019, sono 16 ed hanno le seguenti caratteristiche:

Sesso	
M / F	6 / 10
Età	
Media (range)	59 (29/68)

Tabella 2: caratteristiche dei 16 pazienti oggetto di studio

Si tratta di pazienti affetti da MM seguiti dai reparti di Ematologia dell'Azienda Ospedaliero universitaria Ospedali Riuniti di Ancona e del Presidio Ospedaliero Unico di Civitanova Marche. Tutti hanno effettuato la raccolta di staminali presso la S.O.D Medicina Trasfusionale degli Ospedali Riuniti di Ancona. Tutti i pazienti hanno effettuato la raccolta di CSE in due sedute, la prima continua e la seconda discontinua, previa stimolazione con G-CSF. I campioni di aferesi sono stati analizzati presso la S.O.D Immunologia Clinica.

3.2 Marcatura con anticorpi monoclonali

Un milione di PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) del campione di leucaferesi fresca vengono marcati con anticorpi monoclonali rivolti contro antigeni di superficie che, per la loro specificità, caratterizzano fenotipicamente la popolazione cellulare monocitaria. Ogni anticorpo monoclonale è diretto verso uno specifico antigene presente sulla superficie cellulare (CD) ed è coniugato con

un fluorocromo che gli permette di essere detectato dal citofluorimetro. Il pannello utilizzato per l'analisi delle sottopopolazioni monocitarie è il seguente:

<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>PerCP</i>	<i>PeCy7</i>	<i>APC</i>
CD16	CD163	7AAD	CD80	CD14

Tabella 3: Pannello di anticorpi monoclonali per l'identificazione delle tre sottopopolazioni monocitarie

in particolare:

- il CD16 (*BD Bioscience*) è un antigene di linea per le cellule NK, ma espresso anche dai monociti che, utilizzato in confronto con CD14, permette di suddividere i monociti nelle sottopopolazioni dei classici, intermedi e non classici;
- il CD163 (*BD Bioscience*) è un antigene espresso dalla sottopopolazione monociti M2.
- il 7-AAD (*BD Bioscience*) (*7-amino-actinomycin D*) marca selettivamente le cellule morte;
- il CD80 (*BD Bioscience*) è un antigene espresso dalla sottopopolazione dei monociti M1;
- il CD14 (*BD Bioscience*) è un antigene di linea per i monociti;

Gli anticorpi monoclonali vengono aggiunti in tutti i tubi nella quantità consigliata dalla casa produttrice e lasciati in incubazione per 15 minuti a temperatura ambiente e al buio, perché sono fotolabili.

Al termine dell'incubazione segue la lisi dei globuli rossi, effettuata aggiungendo 2 ml di lisante (la soluzione viene preparata giornalmente sciogliendo il contenuto liofilizzato della boccetta – *autolyse* – in 100 ml di acqua distillata) e incubandolo 10 minuti a temperatura ambiente e al buio.

Il lisante viene poi eliminato tramite centrifugazione a 1800 giri per 10 minuti, e capovolgimento della provetta.

Il campione viene risospeso 100 µl di lisante e poi viene acquisito al citofluorimetro.

3.3 Acquisizione al citofluorimetro

Al termine dell'incubazione, i campioni sono letti con un citofluorimetro a flusso BD FACSCanto™ II, in grado di analizzare due parametri fisici e sei segnali di fluorescenza. Lo strumento contiene tre sorgenti luminose *laser* che consentono di eccitare anche minime quantità di fluorocromo.

Il primo *laser*, a ioni Argon, emette nello spettro del blu ad una lunghezza d'onda di 488 nm; il secondo, a Elio-Neon, emette nello spettro del rosso a 635 nm; il terzo emette nello spettro del violetto a 405 nm.

FLUOROCROMO	ECCITAZIONE (nm)	EMISSIONE (nm)
FITC	488	525
PE	488	575
PerCP	488	678
PerCP-CY5.5	488	695
PE-Cy7	488	785
APC	633	660
APC-Cy7	633	785

Tabella 4: Lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione dei fluorocromi usati in citofluorimetria.

Queste differenze tra eccitazione ed emissione consentono ad un unico raggio *laser* di eccitare molti fluorocromi, requisito fondamentale per le analisi multiparametriche cioè basate sull'utilizzo di più sistemi di sonde ciascuna delle quali è caratterizzata dalla presenza di fluorocromi con range di eccitazione uguali, ma con picchi di emissione diversi.

Oltre alla componente ottica, costituita dai *laser*, lo strumento è composto dalla componente elettronica, che trasforma il segnale elettrico analogico del *laser* in un segnale digitale, e dalla componente fluidica che permette alle cellule sospese nel fluido di passare in singola fila attraverso nella camera di conta dove sono colpite dal *laser*.

Le modalità con cui la luce attraversando le cellule viene distribuita sia sulla stessa linea del fascio *laser* (FSC *forward scatter*), sia lateralmente (SSC, *side scatter*), fornisce informazioni rispettivamente sulle dimensioni e sulla complessità interna della cellula (parametri intrinseci). L'espressione di antigeni

di superficie o intracellulari vengono definiti parametri estrinseci e si identificano nei CD.

Dalla valutazione contemporanea dei parametri intrinseci ed estrinseci, ovvero lo studio delle caratteristiche sia fisiche che immunologiche, deriva l'immunofenotipo.

Il citofluorimetro viene calibrato una volta al giorno con una soluzione contenente delle micro-biglie in sospensione, in grado di emettere un segnale di fluorescenza ad intensità crescente e nota, in uno spettro di lunghezze d'onda analogo a quello dei fluorocromi utilizzati. L'analisi dei picchi prodotti dalle micro-biglie permette di mantenere lo strumento in condizioni di riproducibilità intra- ed inter-serie e di valutarne le caratteristiche di sensibilità e linearità.

Di ogni campione vengono acquisiti circa 1.000.000 di eventi, ed almeno 20.000 eventi nel gate dei monociti (CD14+). I citogrammi vengono analizzati mediante il *software* DIVA, versione 5 (*BD Biosciences*).



Figura 6: Citofluorimetro FACSCanto™ II

3.4 Analisi statistica

I risultati ottenuti sono elaborati attraverso Microsoft Office Excel: i dati sono presentati come media \pm deviazioni standard (SD) ed analizzati con *Student's t-test*. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p < 0.05$.

4. Risultati

Le cellule monocitarie presenti nelle raccolte leucaferetiche sono state marcate per studiare l'espressione dei *marker* monocitari CD14, CD16, CD80 e CD163 e sono state poi analizzate in citofluorimetria.

I citogrammi ottenuti dall'acquisizione dei campioni sono stati letti grazie al software *FacsDiva* (BD Bioscience).

4.1 Distribuzione delle sottopopolazioni monocitarie

È stata prima analizzata l'espressione dei *marker* di superficie CD14 e CD16 che ha permesso di distinguere le tre sottopopolazioni monocitarie.

Le quote di monociti classici, intermedi e non classici sono risultate simili nei campioni di leucaferesi ottenute con raccolta continua e discontinua (Figura 7).

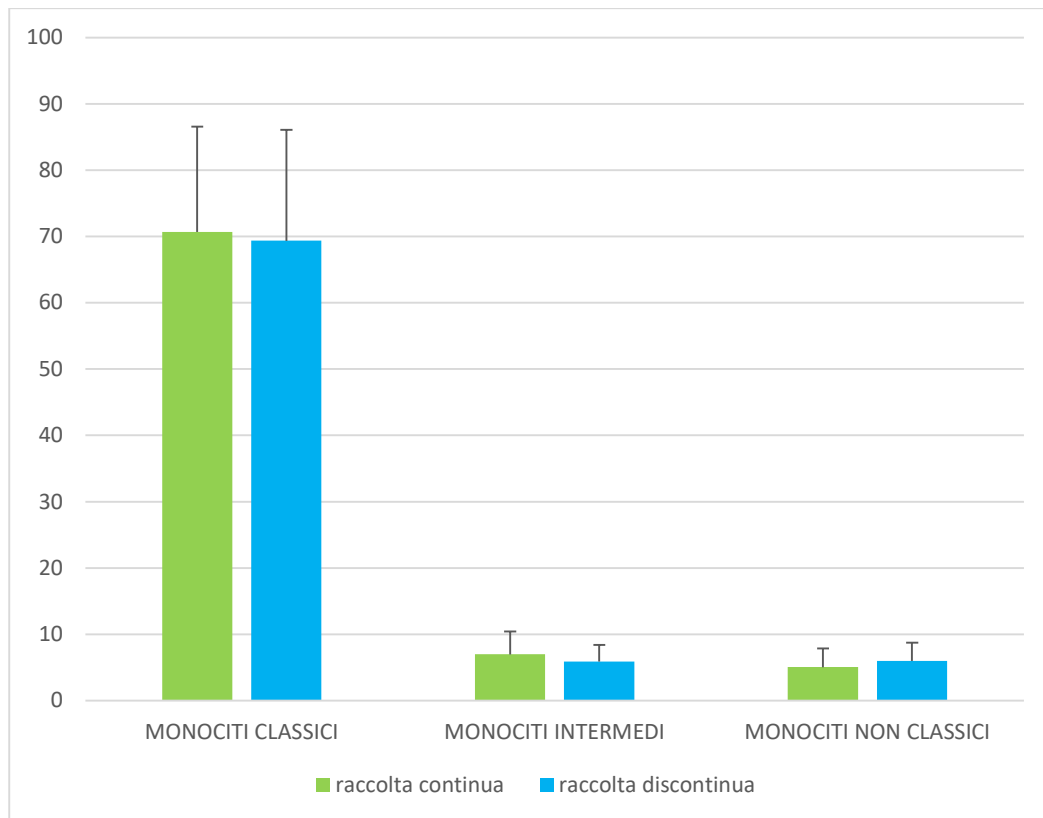


Figura 7: Analisi percentuale del numero di monociti classici, intermedi e non classici presenti nelle raccolte leucaferetiche ottenute con metodo continuo e discontinuo

Lievi variazioni fra i due tipi di leucaferesi sono state riscontrate nelle proporzioni dei monociti intermedi e non classici. In particolare, i monociti intermedi sono risultati più rappresentati dei non classici nei campioni ottenuti con metodo di raccolta continuo, mentre nei campioni ottenuti da raccolta discontinua si è osservato un fenomeno del tutto speculare, con i monociti intermedi meno rappresentati dei non classici.

Nessuna di queste differenze ha tuttavia raggiunto la significatività statistica ($p > 0.05$).

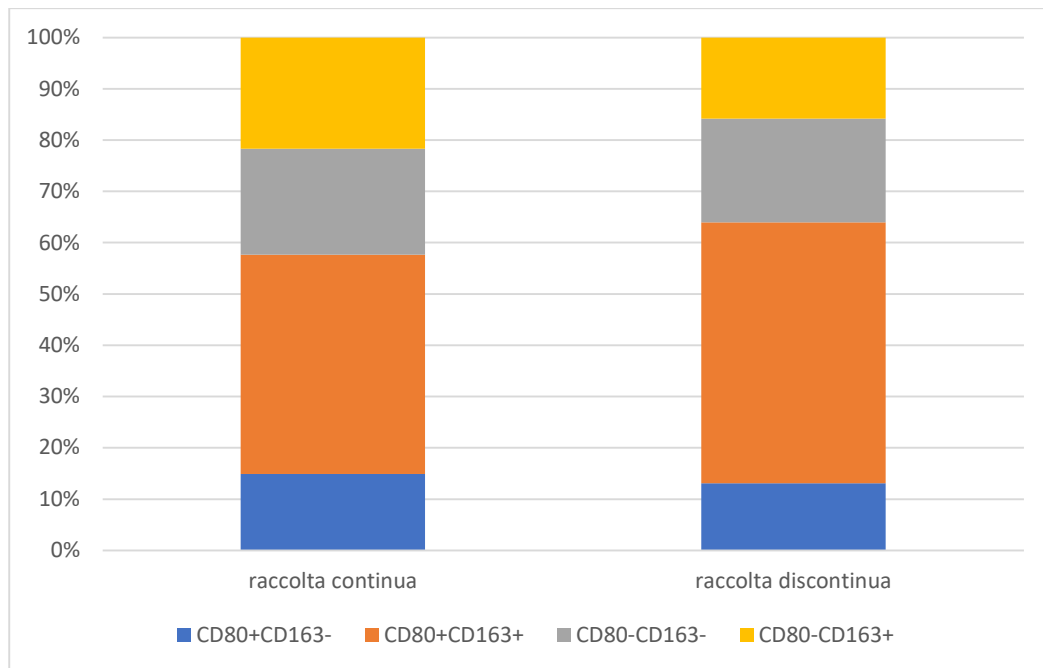


Figura 8: Proporzioe dei monociti esprimenti i marker CD80/CD163 nella popolazione dei monociti classici presenti nelle raccolte leucaferetiche ottenute con metodo continuo e discontinuo

La proporzione dei monociti classici esprimenti le quattro combinazioni di marcatori CD80/CD163, quali CD80+, CD163+, CD80+CD163+ e CD80-CD163- nei 16 pazienti è apparsa differire nei due tipi di raccolta (Figura 8): in particolare la raccolta discontinua è più ricca di monociti doppio positivi (CD80+CD163+) e meno ricca di monociti CD80+CD163- e CD80-CD163+.

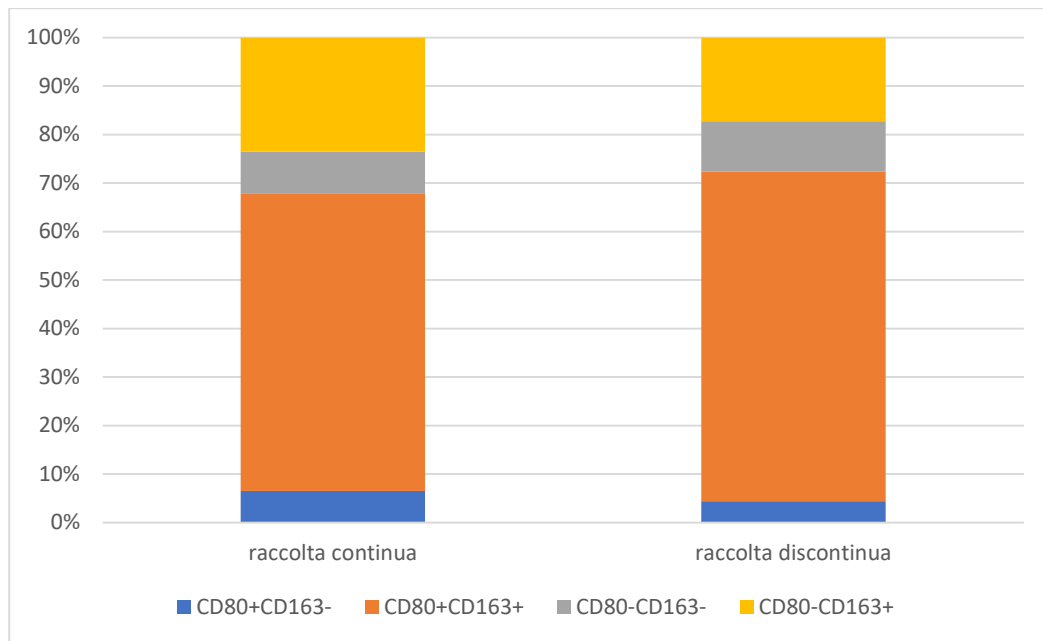


Figura 9. Proporzione dei monociti esprimenti i marker CD80/CD163 nella popolazione dei monociti intermedi presenti nelle raccolte leucaferetiche ottenute con metodo continuo e discontinuo

L'espressione delle quattro combinazioni di marcatori CD80/CD163 è apparsa diversa anche nel contesto dei monociti intermedi (Figura 9): analogamente a quanto osservato nell'ambito dei monociti classici, i campioni ottenuti da raccolta discontinua sono risultati più ricchi di monociti doppio positivi (CD80+CD163+) e meno ricchi di monociti CD80+ e CD163+ singoli positivi.

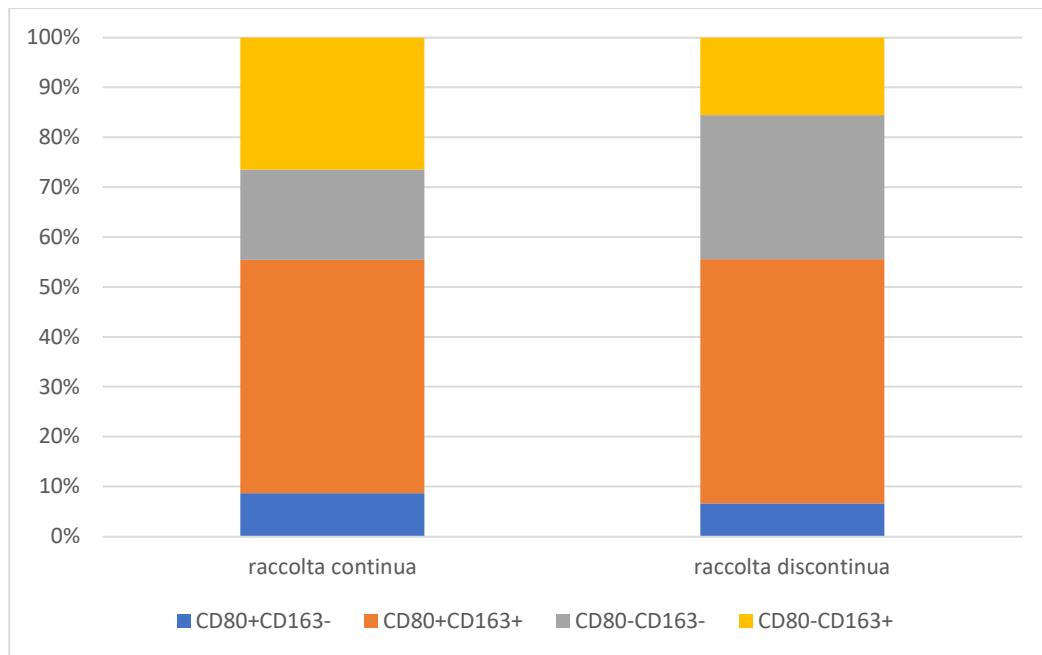


Figura 10: Proporzioe dei monociti esprimenti i marker CD80/CD163 nella popolazione dei monociti non classici presenti nelle raccolte leucaferetiche ottenute con metodo continuo e discontinuo

Anche nell'ambito dei monociti non classici si sono riscontrate differenze simili a quelle precedentemente descritte nella rappresentazione delle quattro sottopopolazioni CD80+, CD163+, CD80+CD163+ e CD80-CD163- (Figura 10); la raccolta discontinua è risultata infatti più ricca di cellule doppio positive e meno ricca di cellule CD80+ e CD163+ singole positive.

Inoltre, rispetto a quanto osservato nell'ambito dei monociti classici ed intermedi, i monociti non classici ottenuti con raccolta discontinua sono risultati arricchiti anche in cellule CD80-CD163- doppie negative. Nessuna delle differenze descritte è risultata statisticamente significativa ($p > 0.05$).

5. DISCUSSIONE

Il mieloma multiplo rappresenta circa l'1% di tutti i tumori nel mondo e il 10-15% di tutte le neoplasie ematologiche: è una neoplasia maligna del midollo osseo tipica dell'età avanzata, che colpisce in particolare le plasmacellule, non suscettibile di guarigione ma altamente trattabile.

Il trattamento di prima linea in pazienti con meno di 65 anni in buone condizioni cliniche è il trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche, che consiste nella somministrazione al paziente di farmaci per la mobilizzazione delle cellule staminali emopoietiche, nella loro raccolta e nella successiva infusione al paziente stesso dopo chemioterapia.

La buona riuscita del trapianto dipende dal numero di cellule CD34+ che vengono reinfuse. Una nota particolare merita l'evidenza della letteratura che sottolinea come i sottotipi monocitari (classici, intermedi e non classici) e la polarizzazione dei macrofagi M1 ed M2 siano correlati con lo sviluppo e la sopravvivenza della nicchia staminale neoplastica del MM e influenzino la possibilità di recidiva.³⁰

Nel presente lavoro sono state analizzate in citofluorimetria di flusso le sottopopolazioni di monociti presenti in sacche di leucoferesi raccolte da pazienti con mieloma multiplo candidati a trapianto autologo di cellule staminali.

Il primo obiettivo è stato dunque quello di applicare alle sacche di leucoferesi una strategia di marcatura ed analisi già utilizzata su campioni di sangue periferico³¹

L'espressione dei marcatori di superficie CD14 e CD16 è stata utilizzata per distinguere i tre principali gruppi di monociti: classici, intermedi e non classici, secondo quanto suggerito dalla letteratura.²⁴

I marcatori CD80 e CD163 sono stati a loro volta impiegati per distinguere, nell'ambito di ciascun gruppo di monociti, le cellule con assetto pro-infiammatorio (CD80+) da quelle con assetto antinfiammatorio o immunomodulatorio (CD163+); dati della letteratura indicano peraltro che tale distinzione fenotipica individua, a livello tissutale, le due principali sottopopolazioni macrofagiche M1 ed M2, rispettivamente.³²⁻³³

In letteratura è stata descritta una relazione significativa fra la polarizzazione dei macrofagi e la tendenza allo sviluppo ed all'evoluzione delle placche aterosclerotiche.³⁴⁻³⁵

Recentemente, l'analisi dei monociti circolanti di pazienti affetti da patologie legate all'età ha evidenziato una associazione significativa fra espressione del CD163 e diabete.³⁶

Evidenze scientifiche suggeriscono che questi stessi sottogruppi sono in grado di influenzare lo sviluppo del mieloma multiplo e di condizionare la risposta alla terapia; in particolare, i macrofagi M1 sono considerate cellule ad attività antitumorale, mentre gli M2 sono ritenuti in grado di favorire la crescita del tumore.²⁶

Analogamente, l'espressione di CD163 sui monociti circolanti di pazienti affette da carcinoma mammario ha suggerito che tali cellule potrebbero avere un ruolo nel favorire la progressione della malattia.³⁰

Una peculiarità del presente studio è stata inoltre quella di mettere a confronto prodotti di leucaferesi ottenuti con due tecniche di separazione differenti: aferesi continua ed aferesi discontinua. Lo scopo era in questo caso quello di stabilire se i due diversi metodi di raccolta possano in qualche modo influenzare le

proporzioni delle diverse sottopopolazioni monocitarie che si vengono a trovare nella sacca.

L'analisi è stata condotta su 16 pazienti, ciascuno dei quali sottoposto ad aferesi con entrambe le procedure (32 campioni in totale); la metodica applicata a questo contesto è apparsa tecnicamente affidabile, riproducibile ed in grado di dare risultati di tipo quantitativo, analogamente a quanto si osserva su campioni di sangue periferico.

Nessuna differenza rilevante fra i due metodi di aferesi è emersa per quanto riguarda le proporzioni delle tre principali sottopopolazioni dei monociti: classici, intermedi e non classici. La sottopopolazione più rappresentata è risultata quella dei monociti classici, analogamente a quanto si osserva a livello di sangue periferico (da cui la leucoafèresi deriva).³⁰

Differenze più consistenti, pur se prive di significatività statistica, sono emerse nell'ambito delle tre sottopopolazioni per quanto riguarda l'espressione dei due marcatori CD80 e CD163.

Nelle sacche di aferesi ottenute con tecnica di raccolta continua, la proporzione di cellule CD80+CD163+ doppie positive è risultata tendenzialmente più bassa mentre la proporzione di cellule CD80+CD163- e CD80-CD163+ è risultata più elevata che nelle sacche ottenute con tecnica di raccolta discontinua; tale aspetto è stato rilevato sia all'interno dei monociti classici che nell'ambito dei monociti intermedi e non classici. Sebbene la definizione del significato fisiologico e funzionale di queste diverse sottopopolazioni sia ancora oggetto di dibattito, è possibile ipotizzare che le cellule CD80+CD163+ costituiscano una sorta di reservoir di elementi scarsamente polarizzati e funzionalmente quiescenti, in grado di differenziarsi in senso pro-infiammatorio (CD80+) o

antinfiammatorio/immunomodulatore (CD163+).³⁷ Le differenze di polarizzazione che si osservano nei campioni ottenuti con le due procedure lascerebbe ipotizzare che l'aferesi di tipo continuo si associ con un maggior livello di attivazione e differenziazione delle sottopopolazioni monocitarie; le eventuali implicazioni cliniche di tali differenze, in termini di attecchimento del trapianto o di recidiva di malattia, restano da delucidare.

La prevalenza di cellule CD80+CD163+ nell'ambito dei monociti classici ed intermedi è stata descritta anche su campioni di sangue periferico ottenuti da individui sani; in questo stesso *setting* tuttavia, i monociti non classici sono risultati particolarmente ricchi di cellule CD80-CD163-.³⁰

I campioni di aferesi analizzati nel presente studio appaiono differire in questo ultimo aspetto, mostrando piuttosto la prevalenza di cellule doppie positive; le ragioni di tali differenze non sono note e potrebbero ricollegarsi alla patologia di fondo e/o alle terapie di condizionamento cui vengono sottoposti i pazienti con mieloma prima del trapianto.

Il limite più evidente del presente studio è stata la difficoltà di apprezzare differenze statisticamente significative, cosa che potrebbe essere legata alla limitata numerosità della casistica disponibile; la tendenza mostrata dai dati finora raccolti, soprattutto per quanto riguarda la distribuzione delle sottopopolazioni dei monociti in base ai marcatori CD80 e CD163, appare tuttavia meritevole di ulteriori approfondimenti.

Degno di nota è peraltro il fatto che il confronto è stato effettuato su campioni prelevati dagli stessi pazienti e non utilizzando due gruppi di soggetti diversi: ciò rende i risultati più attendibili. Definire un eventuale legame fra gli aspetti tecnici

delle procedure di raccolta e le differenze osservate nella distribuzione delle sottopopolazioni di monociti appare complesso.

D'altro canto, non si può escludere che elementi come la rapidità della raccolta leucaferetica, i canali di uscita ed ingresso del sangue e le procedure di centrifugazione e separazione degli elementi corpuscolati del sangue possano in qualche modo influenzare lo stato di attivazione dei monociti circolanti (e forse anche di altre popolazioni leucocitarie); ciò potrebbe ripercuotersi sull'attecchimento del trapianto e/o sul rischio di recidiva della malattia onco-ematologica. Nel presente studio, la mancanza di dati di *outcome* e di *follow-up* ha reso di fatto impossibile cercare di ottenere dati in tal senso.

I risultati del presente studio suggeriscono in definitiva che la metodica di analisi delle sottopopolazioni linfocitarie già utilizzata su campioni di sangue periferico può essere agevolmente impiegata anche nell'ambito della leucoferesi; un possibile elemento di indagini future potrebbe inoltre essere il confronto fra sacche prelevate da pazienti con patologie onco-ematologiche diverse.

6. CONCLUSIONE

Ampliando la casistica ed analizzando diverse condizioni patologiche, si potranno indagare eventuali associazioni fra le proporzioni delle diverse popolazioni di monociti e l'andamento clinico dei pazienti affetti da mieloma multiplo e sottoposti a trapianto autologo; l'obiettivo a lungo termine è testare l'utilità di questi parametri fenotipici come biomarcatori di tipo prognostico nei pazienti affetti da patologie onco-ematologiche sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche.

Bibliografia

1. <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/mieloma-multiplo>
2. Brennan SK, Matsui W. Cancer stem cells: controversies in multiple myeloma. *J Mol Med (Berl)*. 2009; 87 (11): 1079-85
3. Rejkumar SV, Kyle RA, Therneau TM et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2005 Aug 1; 106 (3): 812-7
4. Smadja NV, Bastard C, Brihaudeau C, Leroux D, Fruchart C. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98(7): 2229-38
5. Sawyer JR, Waldron Ja, Jagannath S, Barlogie B. Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genetec Cytogenet*. 1995;82(1): 41-9
6. Nishida K, Tamura A, Nakazawa N, Ueda Y, Abe T et al. The Ig heavy chain gene is frequently involved in chromosomal translocations in multiple myeloma and plasma cell leukemia as detected by in situ hybridization. *Blood* 1997;90(2): 526-34
7. Chesi M, Bergsgel PL, Brents LA, Smith CM, Gerhard DS, Kuehl WM. Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood*. 1996; 88 (2): 674-81
8. Chesi M, Nardini E, Lim Rs, Smith KD, Kuehl WM, Bergsagel PL. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel

- gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood*. 1998; 92(9): 3025-34
9. Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, Zhan F, Santra M et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: Incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*. 2006; 108(5): 1724-32
 10. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood* 2016; 127: 2955-2962
 11. Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2009/2010. www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/homepage_node.html. 9th edition. 2013
 12. Brown LM, Gridley G, Check D, et al. Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders. *Blood*. 2008; 111: 3388–3394
 13. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, et al. International Myeloma Working Group Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management., *Leukemia*, 2010, vol. 24 6, pg. 1121-1127
 14. <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/ematologia-e-oncologia/disturbi-plasmacellulari/mieloma-multiplo>

15. Rajkumar SV, et al International Myeloma Working group update criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15: e 538- e 548
16. Moreau P, Attal M, Facon T. Frontline therapy of multiple myeloma. *Blood* 2015;125;3076-3084
17. Moreau P, San Miguel J, Ludwig H, et al. ESMO Guidelines Working Group Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Ann Oncol*, 2013, vol. 24 suppl 6 pg. vi133-vi137
18. Cavo M, Rajkumar SV, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group consensus approach to the treatment of multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem cell transplantation., *Blood*, 2011, vol. 117 23 (pg. 6063-6073)
19. Moreau P, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Attal M. Current trends in autologous stem-cell transplantation for myeloma in the era of novel therapies., *J Clin Oncol*, 2011, vol. 29 14(pg. 1898-1906)
20. Palumbo A, Rajkumar SV, San Miguel JF, et al. International Myeloma Working Group consensus statement for the management, treatment, and supportive care of patients with myeloma not eligible for standard autologous stem-cell transplantation., *J Clin Oncol*, 2014, vol. 32 6(pg. 587-600)
21. Philippe Moreau, Michel Attal, Thierry Facon, Frontline therapy of multiple myeloma, *Blood* (2015) 125 (20): 3076–3084

22. Bensinger W et al. J. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *Clinical Oncology* 13, 2547-2555,1995
23. Vassallo RR, Bravo MD, Kamel H. Improved donor safety in high-volume apheresis collections. *Transfusion* 2017; 57: 319-24
24. Hudig D, Hunter KW, Diamond WJ, Redelman D. Properties of human blood monocytes. II. Monocytes from healthy adults are highly heterogeneous within and among individuals. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014; 86: 121-34
25. <https://www.aimac.it/farmaci-tumore/inibitori-crescita-tumorale/bortezomib-velcade>
26. Asimokopoulos F, et al. Macrophages in multiple myeloma: emerging concepts and therapeutic implications. *Leukemia and Lymphoma*, 54, 2112-2121
27. Jensen JL, Rakhmilevich A, Heninger E, Broman AT, Hope C, Phan F et al tumoricidal effects of macrophage activating immunotherapy in a murine model of relapsed/ refractory multiple myeloma. *Cancer Immunology Research*, 3 881-890
28. Baron R e Kneissel M (2013) WNT signaling bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature Medicine*, 19, 179-192
29. Condeelis J, Pollard JW, Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion and metastasis *cell* 2006; 124;263-6
30. Costantini A et al. Age-related M1/M2 phenotype changes in circulating monocytes from healthy/unhealthy individuals. *Aging* 2018, 10: 1268-80

31. Ziegler-Heitbrock L et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010, 116: e74-80
32. Cho KY et al. The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2013, 22:910-18
33. De Gaetano M et al. M2-type macrophage responses are predictive of adverse outcomes in human atherosclerosis. *Front Immunol* 2016, 7:275
34. Min D et al. Monocyte CD163 is altered in association with diabetic complications: possible protective role. *J Leuk Biol* 2016, 100:1375-83
35. Kawarabayashi R et al. The association between monocyte surface CD163 and insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Res* 2017, 6549242
36. <https://www.aimac.it/farmaci-tumore/inibitori-crescita-tumorale/bortezomib-velcade>
37. Zhang B et al. Increased circulating M2-like monocytes in patients with breast cancer. *Tumour Biol* 2017, 39:1010428317711571

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato, desidero ringraziare tutte le persone, senza le quali questo lavoro di tesi non esisterebbe nemmeno.

***La dott.ssa Nadia Viola e il dott. Andrea Costantini**, che in questo periodo così complesso si sono sempre mostrati disponibili e volenterosi di portare avanti il nostro lavoro nonostante le difficoltà.*

***La dott.ssa Elena Marinelli Busilacchi**, che mi ha guidato durante tutto il percorso, dall'approccio alla metodica fino alla stesura dell'elaborato finale.*