

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO**  
*Facoltà di Medicina e Chirurgia*  
*SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI*  
**DOTTORATO DI RICERCA IN EMATOLOGIA SPERIMENTALE (Ciclo XXVI)**



**STUDIO DI NUOVI MARCATORI PER LA STRATIFICAZIONE  
PROGNOSTICA DEI PAZIENTI CON MIELOMA MULTIPLO**

Relatore: Ch.mo Prof. Paolo CORRADINI

Correlatore: Dott.ssa Cristiana CARNITI

Dottorando: Anisa BERMEMA

Anno accademico

2012 - 2013

# INDICE

<b>SINOSSI</b>	1
<b>1. INTRODUZIONE</b>	2
<b>1.1 Mieloma multiplo</b>	3
<b>1.2 Stadiazione e prognosi del Mieloma Multiplo</b>	6
<b>1.3 La malattia ossea</b>	11
1.3.1 Attivazione dell'osteoclastogenesi	12
1.3.2 Inibizione dell'osteoblastogenesi	13
1.3.3 Valutazione e diagnosi della malattia ossea	14
<b>1.3 Stadiazione e prognosi</b>	13
<b>1.4 Terapia del Mieloma Multiplo</b>	18
1.4.1 Bortezomib	20
1.4.2 Lenalidomide	23
1.4.3 Trattamento del MM alla diagnosi	25
1.4.4 Mieloma multiplo ricaduto o refrattario	26
<b>1.5 I microRNA</b>	28
1.5.1 Il ruolo dei miRNA nei tumori	30
1.5.2 MicroRNA circolanti	31
1.5.3 I miRNA nelle neoplasie ematologiche	33
1.5.4 MciroRNA e Mieloma Multiplo	36
<b>1.6 Cellule staminali tumorali (CSCs)</b>	39
1.6.1 CSCs, resistenza ai farmaci e possibili applicazioni terapeutiche	39
1.6.2 Caratterizzazione delle cellule staminali del mieloma multiplo	39
<b>2. SCOPO DEL LAVORO</b>	42
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	43
<b>3.1 Analisi di microRNA circolanti</b>	43
3.1.1 Pazienti	43
3.1.2 Separazione del plasma da sangue periferico	44
3.1.3 Estrazione di RNA da plasma	44
3.1.4 Restrotrascrizione	45
3.1.4.1 Retrotrascrizione con "Megaplex™ RT Pool Primer"	46
3.1.5 Preamplificazione	46
3.1.6 <i>Real Time</i> PCR	47
3.1.6.1 TaqMan® MicroRNA Arrays (Applied Biosystems)	49
3.1.7 <i>Software</i> di analisi	50
3.1.8 Analisi statistica dei dati	51

3.1.9 Gruppi di classificazione dei pazienti per l'esecuzione di class comparison	51
<b>3.2 Citometria a flusso</b>	<b>54</b>
3.2.1 Identificazione citometrica delle plasmacellule neoplastiche nel mieloma multiplo	56
3.2.2 Compensazione	57
3.2.3 Analisi citofluorimetrica	59
<b>3.3 Studio delle cellule staminali di mieloma multiplo</b>	<b>60</b>
3.3.1 Campioni	60
3.3.2 Separazione delle plasmacellule CD138+	60
3.3.3 ALDFLUOR <sup>®</sup> Assay	60
3.3.4 Compensazione ALDFLUOR <sup>®</sup> Assay	61
3.3.5 <i>Side Population</i>	62
3.3.6 Preparazione dei campioni per la lettura della SP	64
3.3.7 Valutazione della mortalità cellulare	65
<b>3.4 Pazienti con MM ricaduto/refrattario</b>	<b>65</b>
3.4.1 Campioni biologici	67
<b>4. RISULTATI</b>	<b>69</b>
<b>4.1 MicroRNA circolanti</b>	<b>69</b>
4.1.1 Estrazione di RNA d plasma	69
4.1.2 Differenze tra plasma e siero	69
4.1.3 Ottimizzazione dell'estrazione	70
4.1.4 Quantificazione dell'RNA estratto	72
4.1.5 Analisi del profilo di espressione mediante cards microfluidiche con tecnologia aTaqMan	72
4.1.5.1 <i>Cluster analysis</i>	72
4.1.6 <i>Class comparison</i>	80
4.1.7 miR-193b	83
<b>4.2 Studio dell'immunofenotipo nel Mieloma Multiplo ricaduto o refrattario</b>	<b>85</b>
4.2.1 Studio delle plasmacellule tumorali in campioni di sangue midollare	85
4.2.2 Immunofenotipo delle plasmacellule	88
4.2.3 Immunofenotipo e risposta alla terapia	88
4.2.4 Analisi differenziale di cloni tumorali plasmacellulari	91
4.2.5 Analisi immunofenotipica del sangue periferico di pazienti con MM ricaduto/refrattario	93
4.2.6 Analisi della popolazione MDSC nel sangue periferico di pazienti con mieloma multiplo	94
<b>4.3 Cellule staminali nel Mieloma Multiplo</b>	<b>98</b>
4.3.1 Analisi citofluorimetrica tramite Aldefluor <sup>®</sup> Assay di campioni di sangue midollare	98
4.3.2 Analisi di plasmacellule selezionate	102

4.3.3 Ricerca di nuovi marcatori delle CSCs	104
4.3.4 Analisi citofluorimetrica tramite Aldefluor <sup>®</sup> Assay di linee cellulari di MM	107
4.3.5 Analisi della <i>Side Population</i>	108
4.3.6 Analisi con Aldefluor <sup>®</sup> Assay di campioni di sangue midollare di pazienti con MM ricaduto o refrattario	114
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>117</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>128</b>

# SINOSSI

A partire dalla metà degli anni '90, le opzioni terapeutiche disponibili per il Mieloma Multiplo (MM) hanno visto una rapida evoluzione che ha condotto al miglioramento dell'esito clinico della patologia e ad un prolungamento della sopravvivenza. In aggiunta ai nuovi agenti terapeutici, l'identificazione di nuovi biomarcatori e lo studio più approfondito delle caratteristiche biologiche di questa neoplasia può condurre ad un ulteriore miglioramento della prognosi dei pazienti. In questo lavoro abbiamo valutato diversi aspetti della patologia per individuare nuovi fattori che consentano una migliore stratificazione prognostica dei soggetti con MM.

Il primo aspetto investigato è quello dei microRNA circolanti come potenziali biomarcatori della patologia. Queste piccole molecole di RNA non codificante si sono infatti rivelate ottimi candidati per l'utilizzo come marcatori poiché sono caratterizzati da elevata stabilità nei fluidi biologici e facilità di analisi. Sono stati pertanto studiati il profilo di espressione dei microRNA circolanti in pazienti con MM alla diagnosi ed è stata ricercata una sua correlazione con le caratteristiche cliniche della malattia. Abbiamo così individuato il miR-193b come nuovo possibile biomarcatore delle lesioni ossee litiche, che costituiscono uno dei tratti distintivi del mieloma multiplo. Ci siamo in seguito occupati dell'analisi immunofenotipica delle cellule di sangue midollare e periferico di pazienti con malattia ricaduta o refrattaria che hanno successivamente ricevuto un trattamento a base di farmaci inibitori del proteasoma o immunomodulanti. In questa parte del lavoro abbiamo osservato la presenza di ondate clonali di cellule tumorali nel midollo di pazienti con malattia ricaduta in trattamento. Abbiamo inoltre investigato il potenziale ruolo della popolazione immunosoppressoria di derivazione mieloide (MDSC) presente nel sangue periferico dei pazienti in trattamento e ne abbiamo monitorato l'andamento durante la terapia. I dati ottenuti suggeriscono un possibile ruolo di queste cellule nel modulare la risposta al trattamento con l'inibitore del proteasoma bortezomib. Infine abbiamo analizzato un altro aspetto del mieloma multiplo che è quello delle cellule staminali tumorali la cui presenza è stata dimostrata per diversi tumori. Questo compartimento di cellule tumorali potrebbe costituire il serbatoio di cellule in grado di resistere al trattamento terapeutico. In questo lavoro abbiamo messo a punto una metodica per la facile rilevazione di queste cellule nel sangue midollare dei pazienti con MM ed abbiamo individuato un possibile immunofenotipo che ne consenta l'individuazione.

Nell'insieme, questo studio ha investigato diversi aspetti della patologia che offrono maggiori informazioni sulle caratteristiche biologiche e cliniche di questa complessa neoplasia allo scopo di mettere a punto una più efficace stratificazione prognostica.

# 1. INTRODUZIONE

Il mieloma multiplo è una patologia complessa, dal punto di vista biologico, diagnostico e terapeutico. Non sono infatti ad oggi noti i meccanismi patogenetici che sostengono lo sviluppo e la progressione di questa neoplasia. Inoltre, pur essendo definita come una singola entità clinica, al suo interno raccoglie diverse sottocategorie che si differenziano dal punto di vista citogenetico e clinico e che richiederebbero una definizione più adeguata.

La diagnosi di mieloma multiplo sintomatico, perciò meritevole di trattamento, è attualmente una diagnosi clinica, che si basa sul riscontro dei segni patologici che conducono alla proliferazione delle plasmacellule maligne. Di conseguenza, le scelte terapeutiche risentono invariabilmente ad una certa soggettività. Oggi sono attivi molti studi clinici volti all'aggiornamento della definizione di mieloma multiplo ed alla ricerca di nuovi marcatori patologici e molecolari [1].

In questo contesto, i microRNA possono costituire dei validi candidati come biomarcatori oncologici, poiché il loro ruolo nella cancerogenesi ed in particolare in quella ematologica è stato ampiamente dimostrato. La deregolazione dell'espressione di queste molecole in ambito patologico può correlare con l'andamento clinico e la prognosi. L'espressione preferenziale di alcuni miRNA da parte delle cellule patologiche ed il loro rilascio in circolo può discriminare le diverse fasi evolutive della malattia e le sue caratteristiche prognostiche. Lo studio dei miRNA circolanti nei pazienti oncologici ha aperto la strada allo studio di nuovi biomarcatori neoplastici analizzabili con metodiche poco invasive.

Un'altra strategia per l'individuazione di parametri prognostici in questa patologia, è la caratterizzazione immunofenotipica delle cellule di mieloma multiplo, una tecnica che consente di valutare le variazioni del comparto plasmacellulare dei pazienti consentendo di discriminare tra plasmacellule mielomatose e normali. Sebbene il clone caratteristico del mieloma comprenda non solo plasmacellule mature ma anche cellule B ad uno stadio maturativo precoce, le plasmacellule possono proliferare e propagare il mieloma multiplo

costituendo l'impronta caratteristica di questa malattia [2,3]. Pertanto la ricerca di cambiamenti nella composizione del comparto plasmacellulare potrebbe essere clinicamente informativa.

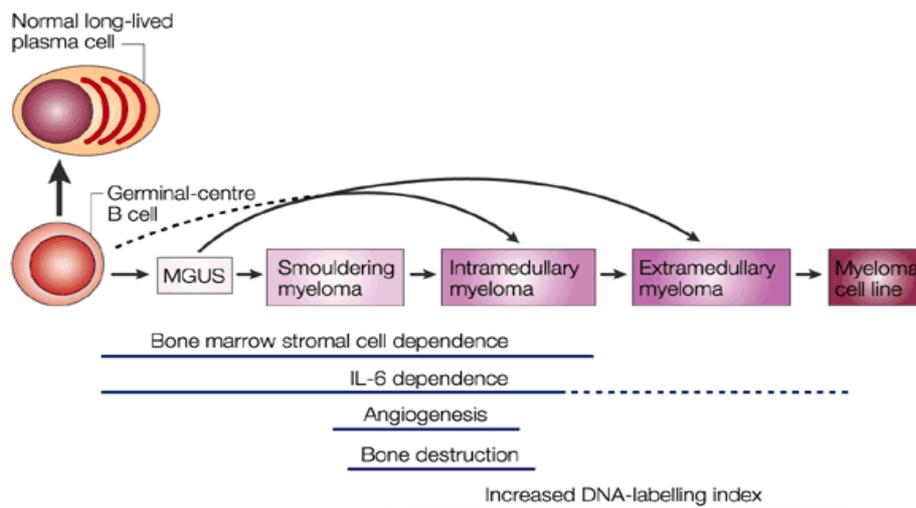
Data la natura incurabile della malattia, è stata ipotizzata anche l'esistenza di una popolazione staminale tumorale che costituisca il compartimento proliferante e resistente alla terapia. L'individuazione e la caratterizzazione di queste cellule potrebbe infatti aprire la strada a nuovi approcci terapeutici mirati che possono rivoluzionare la storia clinica di questa patologia.

## 1.1 Mieloma Multiplo

Il mieloma multiplo (MM) è una neoplasia ematologica a cellule B caratterizzata dall'espansione aberrante di un clone a cellule B all'interno del midollo osseo (infiltrato plasma cellulare nel midollo osseo  $\geq 10\%$ ), e in una minoranza di casi in sedi extramidollari, che si associa generalmente alla produzione di immunoglobuline monoclonali sieriche (componente monoclonale) e urinarie e a danno d'organo. Il MM costituisce l'1% delle neoplasie maligne, il 10-15% di quelle ematologiche. Ed è la causa del 20% delle morti correlate a tumori del sangue [4]. L'incidenza di questa patologia aumenta con l'età raggiungendo un picco tra la 6<sup>a</sup>-7<sup>a</sup> decade, mentre meno del 5% dei pazienti hanno età inferiore a 40 anni.

Le proprietà fisiopatologiche del MM lo fanno rientrare nell'ampia categoria delle gammopatie monoclonali, contraddistinte dalla produzione abnorme di immunoglobuline da parte delle cellule neoplastiche, e talvolta rappresenta la fase tardiva di un disordine progressivo asintomatico: la gammopatia monoclonale di significato incerto MGUS (*monoclonal gammopathy of undetermined significance*). Questa condizione è presente con una frequenza dell'1% tra gli individui maggiori di 25 anni, con una probabilità di progressione a MM del 0.5-3% annuo, fino a raggiungere il 30% dopo 25 anni di *follow up*. L'evoluzione successiva della malattia è il mieloma multiplo asintomatico, che non richiede trattamento ed ha un rischio di progressione del 10% per i primi 5 anni dalla diagnosi, che regredisce poi progressivamente [5]. Il mieloma multiplo sintomatico è infine caratterizzato oltre che da un infiltrato di plasmacellule nel midollo osseo  $\geq 10\%$ , anche dall'insorgenza di uno o più dei

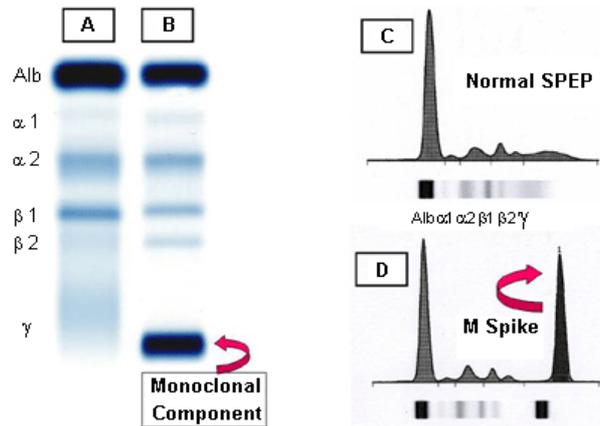
seguenti sintomi che sono l'effetto della massiccia proliferazione delle cellule neoplastiche nel midollo e della produzione di immunoglobuline monoclonali: *i)* dolore osseo causato da lesioni osteolitiche secondarie alla perdita dell'omeostasi di deposizione e riassorbimento della matrice ossea; *ii)* ipercalcemia indotta dall'aumentato riassorbimento osseo; *iii)* anemia, e più raramente leucopenia e piastrinopenia conseguenti alla sostituzione del tessuto emopoietico midollare con plasmacellule patologiche; *iv)* insufficienza renale causata dalla deposizione delle catene leggere libere delle immunoglobuline nei tubuli renali e *v)* infezioni ricorrenti favorite dalla leucopenia e dalla produzione di immunoglobuline monoclonali non funzionali [4].



**Fig. 1.1** Il mieloma multiplo insorge a partire da una cellula B germinale normale. Circa il 30-50% dei casi di mieloma multiplo maligno sembra svilupparsi dalla neoplasia benigna delle plasma cellule: gammopatia monoclonale di incerto significato (MGUS). Non sempre si verifica il passaggio attraverso la fase di mieloma indolente (*smoldering*). Inizialmente, il mieloma multiplo è confinato all'interno del midollo, ma col tempo il tumore può acquisire una localizzazione extramidollare. La transizione da MGUS a mieloma intramidollare si manifesta da un incremento del numero di cellule mielomatose in molteplici foci, ed è anche associata ad angiogenesi e riassorbimento osteolitico dell'osso.

Il quadro clinico dei pazienti con MM può presentare anche la sindrome ipercalcemica, manifestazioni neurologiche e sindrome da iperviscosità con cefalea e confusione. Nel 99% dei pazienti affetti da mieloma multiplo, le analisi di laboratorio mostrano livelli elevati di immunoglobuline nel siero e nelle urine

[6]. Le immunoglobuline monoclonali sono comunemente evidenziate come un picco anomalo nel tracciato elettroforetico delle proteine sieriche, e mediante immunofissazione volta ad identificare la classe di catena pesante delle immunoglobulina ed il tipo di catena leggera.



**Fig. 1.2** Esempio di tracciato elettroforetico delle proteine sieriche di un paziente con mieloma multiplo. A) soggetto sano; B) paziente con mieloma multiplo che presenta componente monoclonale nella regione gamma globulinica. C) densitometria del campione in A che mostra le 5 regioni di addensamento presenti nell'elettroforesi ad alta risoluzione; D) densitometria del campione B con il picco caratteristico della componente M del mieloma multiplo.

La plasmacellula del mieloma multiplo deriva da un linfocita B del centro germinativo linfonodale che è stata esposta ai meccanismi fisiologici di riarrangiamento del DNA a carico dei geni codificanti per le catene pesanti delle immunoglobuline (IgH) che portano all'esposizione sulla superficie della membrana plasmatica di molecole anticorpali con una determinata specificità antigenica. Dal linfonodo periferico, le plasmacellule migrano nel midollo osseo e qui contraggono stretti rapporti con le cellule stromali e la matrice extracellulare. Il microambiente midollare è costituito da numerose proteine della matrice e da diversi tipi cellulari, tra cui le cellule staminali ematopoietiche, precursori delle linee mieloide e linfoide, cellule stromali, endoteliali, osteoblasti e osteoclasti. Nel microambiente midollare la complessa interazione con le

molecole di adesione delle cellule stromali espone le plasma cellule all'azione di alcune citochine che ne promuovono la proliferazione.

L'adesione alla matrice extracellulare del midollo osseo porta alla colonizzazione delle nicchie midollari da parte delle cellule neoplastiche. Si genera così un circuito paracrino tra le plasmacellule e le cellule stromali che promuove la proliferazione, sopravvivenza e farmaco-resistenza delle cellule tumorali. In particolare, un ruolo preponderante è attribuito all'interleuchina IL-6 che svolge un'azione antiapoptotica, favorisce la proliferazione e stimola l'attivazione degli osteoclasti. Sono le stesse cellule tumorali infiltranti il midollo che secernendo citochine quali IL-1 $\beta$ , fattori di necrosi tumorale TNF- $\alpha$  e  $\beta$  stimolano le cellule stromali a secernere IL-6 e gli osteoclasti. L'attivazione degli osteoclasti in particolare, è responsabile dell'aumentato riassorbimento osseo che non è controbilanciato da una deposizione di matrice ossea di pari entità. Questo sbilanciamento a favore del riassorbimento osseo, ha come risultato lo sviluppo delle lesioni litiche che sono uno dei sintomi principali del mieloma multiplo. Inoltre, le plasmacellule infiltranti il midollo osseo secernono anche altre citochine, come il fattore di crescita vasculo-endoteliale (VEGF) che sostengono l'angiogenesi, utile alla crescita del tessuto patologico [7].

## **1.2 Stadiazione e prognosi del Mieloma Multiplo**

La prognosi dei pazienti con mieloma multiplo è il risultato dell'interazione di fattori paziente-specifici, quali età, *performance status* e comorbidità, e le caratteristiche della malattia quali lo stadio, l'aggressività e la risposta alle terapie.

Nella pratica clinica sono due i sistemi di stadiazione utilizzati per l'inquadramento del MM: la stadiazione secondo Durie e Salmon, che si basa sulla misurazione della componente monoclonale e la presenza dei sintomi classici del mieloma multiplo, ed il Sistema di Stadiazione Internazionale (ISS) che tiene invece in considerazione i livelli di  $\beta_2$ microglobulina e la riduzione dei livelli di albumina.

Stadio	Durie-Salmon	ISS
I	Criteri soddisfatti: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hb &gt;10g/dl</li> <li>• Calcemia ≤ 12mg/dl</li> <li>• Assenza di lesioni ossee all’RX</li> <li>• CM ridotta (IgG&lt;5 g/dl; IgA&lt;3 g/dl; proteinuria di Bence-Jones &lt;4g/24h)</li> </ul>	β <sub>2</sub> microglobulina <3.5mg/dl; Albumina sierica <3.5 mg/l
II	Non rientrano nei stadi I o III	Non rientrano nello stadio I o III
III	Verificano uno o più dei seguenti criteri: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hb &lt;8.5 g/dl</li> <li>• Calcemia &gt;12 mg/dl</li> <li>• Estese lesioni ossee litiche all’RX</li> <li>• CM elevata (IgG &gt;7 g/dl; IgA &gt;5 g/dl; proteinuria di Bence-Jones &gt; 12g/24h)</li> </ul>	β <sub>2</sub> microglobulina >5.5mg/l

Sottoclassificazione: A) creatininemia <2 mg/dl, B) creatininemia >2 mg/dl

**Tab.1.1** Sistema di stadiazione di Durie-Salmon (D&S) e Sistema di Stadiazione Internazionale (ISS) [4].

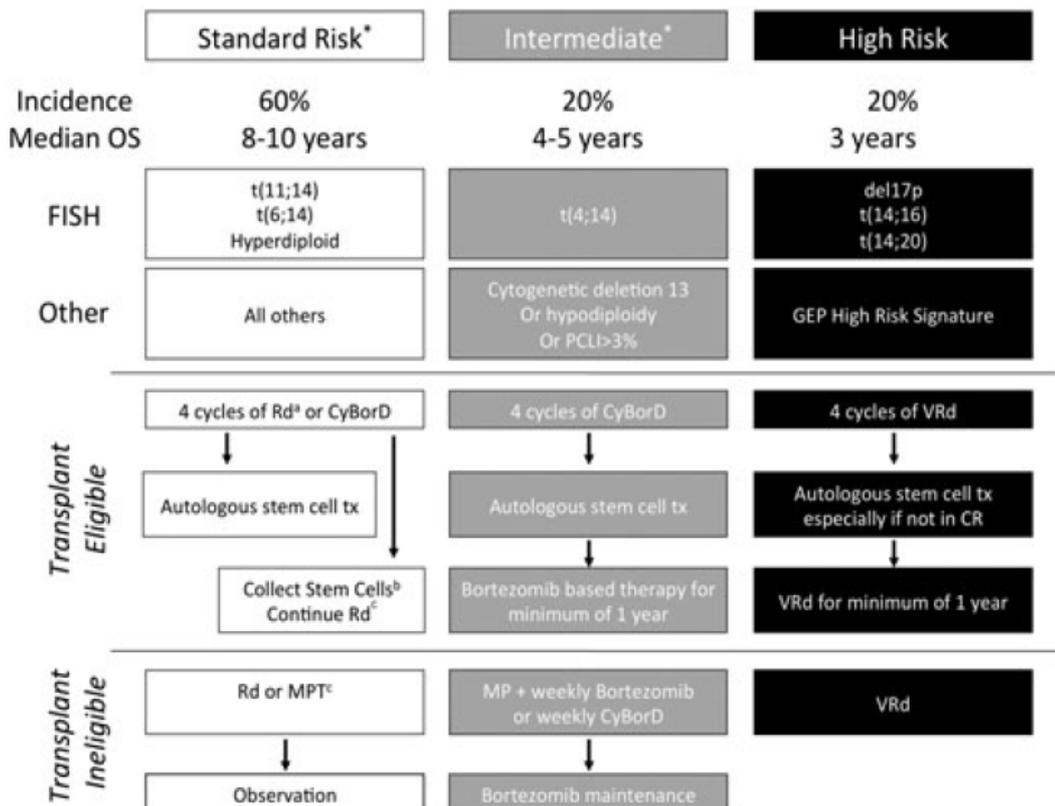
La β<sub>2</sub>microglobulina è un derivato delle catene leggere del complesso di istocompatibilità I (MHC I) ed è un buon indicatore della massa tumorale: livelli elevati correlano con una riduzione della sopravvivenza globale (OS, *overall survival*), anche se in alcuni casi può essere incrementata a causa della ridotta escrezione renale all’interno di un quadro di insufficienza renale [16]. La riduzione dei livelli di albumina sembra invece dipendere dall’attività dell’IL-6, la cui espressione elevata nel MM ne inibisce la sintesi epatica [16].

I criteri di stadiazione di cui sopra, sebbene forniscano informazioni prognostiche alla diagnosi, non sono sufficienti per la stratificazione dei pazienti, poiché non sono utili nell’orientamento delle scelte terapeutiche.

Per la stratificazione del rischio vengono perciò tenute in considerazione le valutazioni cliniche e biochimiche (tra queste la lattato deidrogenasi LDH, indice di carico tumorale), ma soprattutto l’analisi citogenetica (cariotipo e *fluorescence in situ hybridization*, FISH) delle plasmacellule patologiche isolate a partire dal sangue midollare; questi indicatori correlano infatti meglio con la biologia tumorale, l’aggressività della malattia e la prognosi e consentono scelte terapeutiche commisurate al rischio.

L'indagine citogenetica definisce due sottocategorie associate a differente esito clinico: a cariotipo iperdiploide, contraddistinto da numerose trisomie e da una bassa prevalenza di traslocazioni, e quello non iperdiploide (pseudodiploide o quasi-tetraploide) che spesso presenta numerose traslocazioni. Nonostante l'origine di queste anomalie sia ancora controversa, è stato visto che l'appartenenza a queste categorie non si modifica durante il decorso della malattia e si associa ad una diversa prognosi. Il cariotipo iperdiploide correla più spesso con un esito favorevole [18]. Le traslocazioni cromosomiche più frequentemente osservate sono quelle che coinvolgono il locus IgH, in particolare in corrispondenza della regione *breakpoint* in 14q32, e partners di traslocazione ricorrenti sui cromosomi 4, 6, 11, 16, e 20. Queste traslocazioni provocano la giustapposizione tra gli elementi attivatori della trascrizione dei geni codificanti per le catene pesanti delle immunoglobuline (molto attivi nelle plasmacellule che sono cellule specializzate nella produzione di elevate quantità di anticorpi) e oncogeni localizzati sui cromosomi partners della traslocazione, provocando così l'ipertrascrizione di questi ultimi. Le traslocazioni più frequentemente riscontrate nel MM sono la t(11;14)(q13;q32), la t(4;14)(p16;q32) e la t(14;16)(q32;q23). Tra queste, la t(11;14) ha una prognosi più favorevole [17], anche se il dato è controverso, dal momento che è stata osservata anche in un certo numero di casi di malattia molto aggressiva, con leucemia plasmacellulare [16]. Per contro, la prognosi negativa descritta per la t(4;14) sembra essersi ridimensionata dopo l'avvento dell'inibitore del proteasoma *Bortezomib* tra le nuove linee di terapia [17]. Le altre traslocazioni osservate, anche se meno frequenti, sono t(6;14)(p21;q32) e la t(14;20)(q32;q11) [17]. Le trisomie sono presenti soprattutto nel gruppo iperdiploide e coinvolgono nella maggior parte dei casi i cromosomi dispari: 3,5,7,9,11,15,19 e 21. Diversi studi hanno dimostrato come le trisomie correlino con un esito positivo anche quando sono associate ad una citogenetica ad alto rischio, quale t(4;14) o t(14;16) [7,16]. Il cromosoma 13 è spesso alterato nelle cellule di mielomatose, con delezioni o monosomie. Il significato prognostico di queste anomalie è tuttavia controverso: in passato era considerato un fattore prognostico negativo di per sé, mentre oggi si pensa che predica un esito negativo solo se associato ad altre mutazioni genetiche ad alto rischio, come la t(4;14) o con elevati livelli di  $\beta_2$ microglobulina [17,19]. Altre anomalie genetiche

correlano invece con la progressione di malattia, come la delezione del cromosoma in 17p13 che determina l'ipotespressione dell'oncosoppressore TP53 e si associa ad un notevole aggravamento della prognosi. La perdita o l'acquisizione di materiale genetico a carico del cromosoma 1 e le traslocazioni che coinvolgono il locus di C-myc (8q24.1) correlano altresì ad una progressione di malattia [17]. Nel caso degli stadi precoci del mieloma multiplo, come MGUS e SMM non sono state ancora identificate differenze genetiche distintive o predittive di una più o meno rapida progressione verso la fase successiva. Sia l'MGUS che il SMM possono presentare cariotipo iperdiploide o ipodiploide o traslocazioni a carico del locus IgH [7].



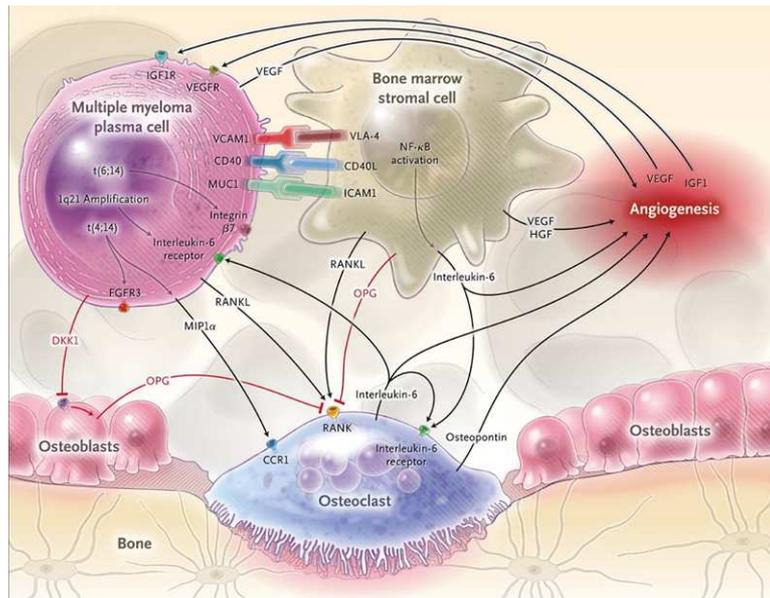
Tab 1.2 Modello di classificazione del rischio nel MM [1].

Ad oggi un soggetto è considerato ad alto rischio e con prognosi severa se mostra una o più delle seguenti: cariotipo ipodiploide, le traslocazioni t(4;14), t(14;16) e la delezione del cromosoma 17p13; elevati livelli di  $\beta_2$ microglobulina o LDH; stadio III secondo il sistema ISS. Si considerano invece avere rischio

standard i casi con iperdiploidia o traslocazione (11;14), normali livelli di LDH e stadio I secondo ISS [20]. L'appartenenza ad una determinata categoria di rischio si riflette in una differenza nella durata della sopravvivenza globale: i pazienti con rischio standard avranno una mediana di 6-7 anni, mentre per quelli ad alto rischio la OS mediana sarà più vicina a 2-3 anni, indipendentemente dal trattamento [21]. Nella pratica clinica attuale solo alcune alterazioni citogenetiche vengono prese in considerazione per la loro valenza prognostica ed hanno effettivamente un impatto nella gestione del paziente. Sono infatti necessari ulteriori studi per definire più accuratamente le caratteristiche prognostiche della patologia. Studi recenti si sono focalizzati sull'analisi più approfondita degli aspetti genetici della patologia grazie anche all'avvento di nuove metodologie quali il *Gene Expression Profiling* (GEP), l'analisi di ibridazione comparata via del genoma, (aCGH, *array comparative genomic hybridization*) e l'analisi dei polimorfismi dei singoli nucleotidi (SNP, *single nucleotide polymorphism array*). Proprio utilizzando la GEP un gruppo di ricerca ha individuato un pannello di 17 geni che contraddistinguono i casi ad alto rischio: un'importante quota di questi geni è localizzata sul cromosoma 1. Il profilo di espressione genica così definito si è rivelato un fattore prognostico indipendente dalla stadiazione ISS e dalla citogenetica ad alto rischio. Un altro studio analogo ha identificato un pannello di 15 geni predittivi della patologia aggressiva. Tuttavia ulteriori indagini sono necessarie dal momento che i due lavori hanno portato a risultati con una minima sovrapposizione [17,22]. Ulteriori studi hanno posto in correlazione il profilo di espressione genica ad alto rischio con le immagini riscontrate in RX, RM e PET. Allo stesso modo è emerso come i valori di  $\beta_2$ microglobulina correlino con le lesioni rilevate mediante tecniche di *imaging*; anche i livelli di PCR, alterati dalla produzione di IL-6, e quelli di LDH, associati all'aggressività della malattia, mostrano un'associazione significativa con gli esiti in RM [23]. Altri lavori si sono riproposti di individuare all'interno delle categorie esistenti ulteriori sottoclassificazioni. Nel caso del gruppo a cariotipo iperdiploide, a prognosi favorevole, l'analisi di aCGH ha consentito di suddividere il gruppo in sottocategorie sulla base della presenza della delezione del cromosoma 13 e delle anomalie a carico del cromosoma 1 che sono invece correlata con una ridotta sopravvivenza [17]. Mancano ad oggi le necessarie validazioni perché questo tipo di analisi entri a far parte della pratica clinica.

### **1.3 La malattia ossea**

La malattia ossea è una caratteristica patognomonica del mieloma multiplo. Il 70-80% dei pazienti presenta lesioni osteolitiche alla diagnosi, e fino al 90% della popolazione dei malati le sviluppa nel corso della malattia. Circa il 10-15% dei pazienti giunge invece alla diagnosi con osteopenia diffusa o osteoporosi [8]. Questo tipo di lesioni interessa principalmente lo scheletro assiale, comprendendo il cranio (40%), la colonna vertebrale (65%), la gabbia toracica (45%), le ossa pelviche (30%), e gli arti (25%), in particolare le porzioni prossimali di omero e femore. L'osteolisi costituisce la causa principale di morbilità e mortalità, poiché determina fratture patologiche, crolli vertebrali, compressione del midollo spinale, che richiedono per lo più terapia radiante e fissazioni chirurgiche. I pazienti che sviluppano fratture patologiche (circa il 40-50%) hanno un rischio di morte aumentato del 20% rispetto agli altri individui con MM sintomatico. Anche i pazienti con MGUS hanno mostrato in diversi studi di avere una maggiore probabilità di sviluppare fratture se confrontati con controlli sani. Questo a suggerire che le alterazioni ossee siano presenti già nelle fasi più precoci della mielomagenesi [9]. Un 'altro rilevante aspetto del coinvolgimento osseo nel MM è la scarsissima tendenza delle lesioni alla guarigione, anche al raggiungimento della completa remissione di malattia. L'impatto notevole che la malattia ossea ha sulla qualità di vita dei pazienti e sulla loro sopravvivenza richiede la massima attenzione nella ricerca di metodi per l'identificazione e la caratterizzazione, oltre che il trattamento precoce, di queste lesioni. L'evidenza clinica, studi istologici e indagini molecolari, hanno consentito recentemente di comprendere più estesamente la patogenesi della malattia ossea e di attribuire un ruolo chiave alle strette interazioni tra le plasmacellule maligne e il microambiente midollare.



**Fig. 1.3** Rappresentazione delle interazioni tra la plasma cellula patologica del mieloma multiplo ed il microambiente midollare.

La secrezione di citochine indotta a livello midollare dalle cellule di MM è responsabile dell'aumentato riassorbimento osseo e dell'elevata attività osteoclastica. Allo stesso modo, il rilascio di fattori di crescita stimolato dall'incremento del processo osteolitico favorisce la crescita e la sopravvivenza delle cellule maligne. Viene così a crearsi un "circolo vizioso" in cui la malattia ossea è contemporaneamente una conseguenza ed un fattore necessario della progressione ed estensione del MM [10,11]. L'incrementata attività osteolitica si associa anche all'inibizione della deposizione di matrice ossea da parte degli osteoblasti, cui consegue una marcata alterazione del rimodellamento osseo.

### 1.3.1 Attivazione dell'osteoclastogenesi

L'adesione delle plasmacellule maligne alle cellule stromali porta alla produzione di molteplici fattori nel microambiente midollare, i quali stimolano la differenziazione osteoclastica. La via di attivazione di RANK/RANKL (recettore attivatore del fattore nucleare NF-κB ed il suo ligando) è una componente fondamentale del processo fisiologico e patologico del rimodellamento osseo. RANK è un recettore trans membrana degli osteoclasti, mentre RANKL è espresso dalle cellule stromali e degli osteoblasti, ed è secreto dai linfociti attivati in risposta a molecole che stimolano il riassorbimento osseo, come il paratormone, il calcitriolo e le prostaglandine. Il legame tra RANK e RANKL

induce la differenziazione dei precursori degli osteoclasti e, attraverso la cascata di attivazione del fattore nucleare NF- $\kappa$ B, stimola il riassorbimento osseo e la sopravvivenza degli osteoclasti. L'osteoprotegerina (OPG) è un recettore solubile secreto dagli osteoblasti che si lega competitivamente a RANK impedendone il legame con RANKL limitando così l'osteoclastogenesi. In condizioni fisiologiche il rapporto RANKL/OPG è piuttosto basso, garantendo la corretta omeostasi dell'osso. Questo rapporto si riflette anche nel grado di differenziazione degli osteoblasti, poiché in quelli maturi (che si trovano in numero ridotto nel MM) la produzione di RANKL è ridotta mentre aumenta quella di OPG in modo da inibire il riassorbimento osseo. E' noto che nei pazienti affetti da MM l'espressione di RANKL è aumentata e quella di OPG è ridotta, e i livelli circolanti di queste molecole correlano con la condizione clinica, la gravità della malattia ossea e la prognosi [10]. Tra gli attivatori dell'osteoclastogenesi, un ruolo importante è svolto dalla proteina infiammatoria macrofagica MIP-1 $\alpha$ , una chemochina prodotta dalle plasmacellule patologiche nel 70% dei pazienti ed un potente stimolo per la differenziazione degli osteoclasti. La sua attività è indipendente da quella di RANKL, col quale può pertanto avere un'azione sinergica. Studi di *Gene Expression Profiling* (GEP) mostrano che MIP-1 $\alpha$  è il gene maggiormente correlato alla malattia ossea nel MM, e livelli elevati del prodotto di questo gene si associano a malattia estesa e prognosi infausta. Con tutta probabilità, questa molecola gioca un ruolo importante anche nell'adesione delle plasmacellule al microambiente midollare, favorendo la progressione della malattia ossea, la crescita della massa tumorale e l'angiogenesi [10].

### **1.3.2 Inibizione dell'osteoblastogenesi**

L'osteoblastogenesi è inibita nel MM mediante l'inattivazione dei precursori osteogenici mesenchimali in osteoblasti maturi. In questo modo non si ha più un adeguato bilanciamento tra deposizione e riassorbimento di matrice ossea. All'inibizione della maturazione si aggiunge l'azione delle plasmacellule infiltranti il midollo che secernono citochine che inducono l'apoptosi degli osteoblasti, riducendone ulteriormente la capacità d'azione. Il principale meccanismo sottostante è la repressione dell'attività di RUNX2 (fattore di trascrizione Runt correlato 2), fondamentale nell'osteoblastogenesi che porta ad una significativa riduzione del numero degli osteoblasti per millimetro quadrato

nei pazienti con malattia osteolitica. Anche numerosi fattori solubili prodotti dalle cellule midollari e maligne sono responsabili della limitazione dell'attività osteoblastica, tra cui Dickkopf1 (DKK1) e *soluble-frizzled related protein-2* (SFRP2). Questi fattori, prodotti dalle plasmacellule maligne sono coinvolti nell'inibizione della via di segnale Wnt, che attiva l'espressione di geni coinvolti nella differenziazione degli osteoblasti. DKK1 è iperespresso nelle cellule patologiche, come suggerito da studi di *Gene Expression Profiling*, ELISA ed immunostochimica su campioni di midollo osseo nei soggetti affetti da MM. E' stata inoltre osservata un aumento della loro espressione in pazienti con lesioni ossee litiche rispetto a quelli che non presentano lesioni rilevabili mediante indagini radiologiche. Studi recenti hanno dimostrato che DKK1 è in grado di aumentare direttamente la produzione di RANKL e ridurre quella di OPG negli osteoblasti, oltre ad agire indirettamente bloccando la differenziazione osteoblastica (attraverso l'inibizione di Wnt), con conseguente incremento del rapporto RANKL/OPG. Anche TNF- $\alpha$  è un fattore solubile prodotto dalle plasmacellule di MM che svolge un ruolo importante nell'inibizione dell'osteoblastogenesi. Questo induce l'apoptosi degli osteoblasti tramite un'azione repressiva su Runx2, ed aumenta la produzione di IL-6 da parte delle cellule midollari, favorendo la proliferazione e la sopravvivenza delle plasmacellule maligne [12,13].

### **1.3.3 Valutazione e diagnosi della malattia ossea**

L'*International Myeloma Working Group* ha definito quale *gold standard* per la diagnosi delle lesioni osteolitiche nel MM l'indagine radiologica convenzionale (RX) [14]. Si richiede una valutazione scheletrica completa, che comprende rachide, pelvi, cranio, omeri e femori, e che risulta positiva in circa l'80% dei pazienti con MM. Alla radiologia convenzionale le lesioni litiche si presentano come aree perforate con assente reazione di sclerosi nell'osso circostante che interessano il cranio e le altre ossa piatte. Le lesioni delle ossa lunghe possono invece essere piccole e perforate, aree con aspetto a chiazze per la presenza di lesioni multiple, fino a ad arrivare a larghe lesioni destruenti. Anche un quadro clinico di osteoporosi può venire individuato con questo tipo di indagine. Benché il riscontro di lesioni litiche mediante radiologia convenzionale costituisca un criterio di diagnosi per il mieloma multiplo, permangono in questo tipo di indagine delle importanti lacune. Vi è infatti una frazione di pazienti pari a circa

il 10-20% che risulta negativo all’RX avendo in realtà presenza di malattia ossea estesa. Questo può essere dovuto alla ridotta sensibilità della metodica che in alcune aree particolari, quale lo sterno, non permette una visualizzazione soddisfacente delle lacune. Inoltre, le lesioni precoci non sono individuabili poiché l’indagine radiologica consente di evidenziare una lesione se vi è un riassorbimento di almeno 30% dell’osso trabecolare. La scarsa specificità dell’esame infine, non permette la distinzione tra osteoporosi da mieloma e quella dovuta ad altre cause quali post-menopausa o trattamento con corticosteroidi. La lettura dell’RX è anche operatore-dipendente e pertanto scarsamente riproducibile nei diversi centri; sono richieste almeno 20 differenti immagini e proiezioni che richiedono lunghi tempi di esecuzione difficilmente sostenibili per i pazienti, soprattutto in caso di forte sintomatologia dolorosa. Un ulteriore svantaggio è la scarsa utilità nel *follow-up* per la valutazione della risposta terapeutica.

Molti di questi limiti sono stati superati dall’introduzione di metodiche più sensibili, quali la Tomografia Computerizzata (TC) e la Risonanza Magnetica (RM), e recentemente l’introduzione delle Tomografia ed emissione di positroni (PET) che aggiunge anche una valutazione funzionale e metabolica oltre che morfologica.

La TC permette di individuare accuratamente lesioni anche di piccole dimensioni non visibili con la radiologia convenzionale. Inoltre, consente di esplorare i tessuti molli alla ricerca di lesioni extramidollari e sedi atipiche di malattia. L’indagine ha una durata di esecuzione di gran lunga inferiore alla radiografia e rende possibile la valutazione diagnostica tramite una singola scansione. Le controindicazioni all’impiego del TC sono legate alla massiccia dose di radiazioni a cui deve essere sottoposto il paziente, non essendo presenti diffusamente strumenti per l’esecuzione di TC a basse dosi. Infine, il mezzo di contrasto non dovrebbe essere utilizzato in caso di pazienti con presenza di componente monoclonale, poiché si può legare a questa e formare aggregati tossici per i reni [8,14].

Negli ultimi 20 anni la risonanza magnetica è stata estesamente utilizzata per la valutazione della malattia ossea, poiché è stata dimostrata avere una sensibilità molto superiore alla radiologia convenzionale nella rilevazione delle lesioni ossee litiche. Molti studi confermano che la RM *total body* rileva lesioni

ossee dove la RX convenzionale risulta negativa. Pertanto è indicata nel caso di soggetti con RX negativa. Con le immagini da RM si ottiene in effetti la visualizzazione della cavità midollare e la valutazione diretta dell'entità d'infiltrazione da parte delle cellule di malattia prima che la distruzione della matrice ossea diventi visibile alla radiologia convenzionale. Studi recenti hanno inoltre dimostrato che la RM è superiore anche rispetto alla TC. Essa è indicata in particolare nei casi di sospetta compressione del midollo o delle radici nervose, poiché dà un'immagine fedele delle dimensioni del tessuto tumorale e del suo grado di estensione nello spazio midollare. Le diverse sequenze T1 e T2 pesate distinguono le fratture compressive benigne da quelle maligne. Le sequenze più informative nella valutazione del MM sono la T1, T2 con soppressione del segnale adiposo e la sequenza T1 con somministrazione di gadolinio e soppressione del segnale adiposo. Le lesioni da MM sono tipicamente ipointense in T1 e iperintense in T2, e mostrano *enhancement* dopo la somministrazione di gadolinio.

Cinque *pattern* d'immagine del midollo osseo sono stati ben descritti per la risonanza magnetica nel MM: *i*) infiltrazione plasmacellulare minima nel contesto di un midollo apparentemente normale; *ii*) coinvolgimento focale; *iii*) infiltrazione omogenea diffusa; *iv*) combinazione di infiltrazione focale e diffusa; *v*) *pattern* a "sale e pepe", con coinvolgimento disomogeneo del midollo osseo ed interposizione di isole di tessuto adiposo. Pazienti con un *pattern* normale o sale e pepe generalmente hanno un carico tumorale inferiore rispetto a quelli con infiltrazione focale o diffusa. Vi è inoltre un'associazione tra il coinvolgimento diffuso e focale e bassi valori sierici di emoglobina o un'elevata plasmocitosi midollare, supportando così l'ipotesi che il grado di infiltrazione midollare rilevato in RM rispecchi lo stato di malattia. Nel caso di pazienti con MGUS o SMM si possono individuare lesioni ossee precoci, identificando così i soggetti che è necessario trattare poiché hanno maggiore probabilità di progredire nei mesi successivi. Diversi studi hanno anche dimostrato che i pazienti con MM asintomatico che presentano immagini anomale in RM hanno un maggiore rischio di progressione rispetto a quelli con indagini normali. Infine la risonanza magnetica si è dimostrata utile anche nella valutazione della risposta alla terapia: in caso di remissione completa si avrà la regressione delle precedenti anomalie midollari, mentre una risposta parziale sarà testimoniata

dal cambiamento del pattern, ad esempio da diffuso a focale, o dalla riduzione dell'intensità nelle immagini T2-pesate.

Nell'insieme, la RM è uno strumento utile per la formulazione di un giudizio prognostico in associazione agli altri parametri già noti, per cui pazienti con malattia avanzata e RM normale mostrano una sopravvivenza maggiore rispetto a quelli con pattern di infiltrazione diffuso o focale. Allo stesso modo, soggetti asintomatici con RM anomala avranno un rischio di progressione più elevato dei soggetti con RM negativa [14].

La tomografia ad emissione di positroni (PET) nell'ambito del MM fornisce informazioni funzionali non ottenibili con le altre tecniche di *imaging*. La captazione di FDG (F18-fluorodesossiglucosio) identifica aree di attività ipermetabolica in sede intra- o extra-midollare. La PET ha mostrato una sensibilità del 85% ed una specificità del 90% nella diagnosi del coinvolgimento osseo [8].

Finora le indagini radiografiche hanno consentito di individuare le lesioni ossee, che però spesso non sono informative riguardo all'andamento del rimodellamento della matrice ossea. Sono stati pertanto studiati diversi marcatori biochimici del MM utili per stimare il tasso di rimodellamento, migliorare la precocità della diagnosi, monitorare le lesioni ossee e valutare la risposta in corso di specifiche terapie. Lo studio delle componenti cellulari ed extracellulari della matrice ossea ha portato all'individuazione di molecole che riflettono i processi di deposizione e riassorbimento [15].

Ad oggi, i marcatori del riassorbimento osseo sono principalmente molecole peptidiche derivate da processi di degradazione del collagene di tipo I, sono specifiche per la distruzione dell'osso e vengono rilevate nel siero o nelle urine dei pazienti. Nello specifico, l'NTX urinario (N-telopeptide a catena crociata) e il CTX sierico (C-telopeptide a catena crociata) presentano una correlazione con l'estensione della malattia ossea valutata sulla base di indagini radiologiche ed istologiche. E' stata anche descritta una corrispondenza tra questi marcatori e lo stadio di malattia, misurati secondo i sistemi di stadiazione (ISS e Durie-Salmon) e con la sopravvivenza [15]. I dati relativi invece ai marcatori di deposizione ossea, quali l'osteocalcina, la fosfatasi alcalina osso-specifica e i propeptidi del procollagene di tipo I hanno portato a risultati discordanti [15].

Questi studi hanno mostrato come i marcatori biochimici riflettano fedelmente i cambiamenti nel metabolismo osseo durante l'evolversi della patologia. Inoltre, poiché possiedono qualità di specificità, rilevabilità e scarsa invasività della metodica d'indagine, un loro utilizzo congiunto alle tecniche di *imaging* potrebbe portare ad una migliore caratterizzazione prognostica della malattia ossea.

In questo studio sono stati studiati i miRNA circolanti come potenziali biomarcatori sierici non invasivi, per valutarne la correlazione con la malattia ossea.

#### **1.4 Terapia del Mieloma Multiplo**

Il mieloma multiplo è stato in passato una malattia dagli esiti fortemente scoraggianti, con una mediana della sopravvivenza globale che alla fine degli anni '90 era di 3 anni. Da allora c'è stato un enorme miglioramento nella prognosi di questa neoplasia grazie all'avvento di nuovi agenti attivi come la talidomide, il bortezomib, la lenalidomide, il trapianto autologo di cellule staminali (auto-TMO) ed il miglioramento delle cure di supporto; il tasso di sopravvivenza a tre anni dalla diagnosi oggi ha superato il 75-80% [49,50]. La mediana della sopravvivenza si attesta a più di 5 anni. Talidomide ed il suo analogo lenalidomide sono agenti immunomodulanti, mentre il bortezomib è un inibitore del proteasoma: entrambi vengono nella maggior parte dei casi utilizzati in associazione a corticosteroidi.

L'incremento delle opzioni disponibili per il trattamento ha portato molta speranza ed entusiasmo, ma ha anche aperto nuove sfide come conseguenza di questi stessi miglioramenti. Vi è infatti una moltitudine di trattamenti somministrabili che genera una significativa eterogeneità nel modo in cui i pazienti vengono trattati nei diversi centri di cura, stati e continenti. Il ruolo dell'auto-trapianto, l'obiettivo primario del trattamento, ed il valore della stratificazione basata sul rischio sono tuttora importanti aree di dibattito e controversie, così come sulla scelta di strategie terapeutiche più o meno interventistiche [51].

### 1.4.1 Bortezomib

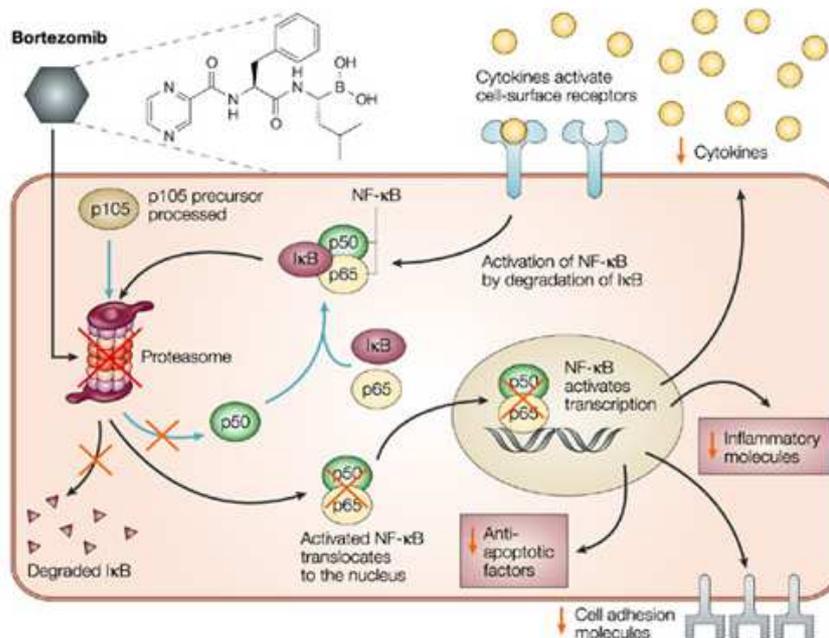
Il meccanismo di degradazione ubiquitina-proteasoma è responsabile della degradazione della maggior parte delle proteine regolatorie nelle cellule eucariotiche, comprese le proteine che controllano la progressione nel ciclo cellulare, l'apoptosi e la riparazione del DNA: pertanto gioca un ruolo essenziale nel mantenimento dell'omeostasi cellulare [52,53,54]. Il proteasoma 26S consiste in un nucleo proteolitico 20S a forma di botte, composto da due subunità  $\alpha$  e due subunità  $\beta$  identiche tra di loro più due complessi regolatori 20S che si posizionano alle estremità del complesso [55]. Le proteine destinate alla degradazione vengono prima poliubiquitinate; il complesso 19S riconosce le proteine da degradare e le indirizza verso la parte centrale 20S dove avviene la proteolisi ad opera di 3 subunità  $\beta$ :  $\beta 1$  (con attività simil-caspasica),  $\beta 2$  con azione tripsinizzante, e  $\beta 5$  (con attività simil-chimotripsinica) [52,53,54]. L'interruzione dell'attività proteolitica ha come effetto il blocco della crescita cellulare e la morte a causa dell'induzione di una cascata apoptotica come risultato del rapido accumulo di proteine regolatorie incompatibili all'interno della cellula [56].

Le cellule maligne hanno generalmente un'attività proteolitica più intensa rispetto alle cellule sane e sono più sensibili agli effetti proapoptotici dell'inibizione del proteasoma rispetto alle cellule normali, fornendo così il razionale per considerare il proteosoma un bersaglio terapeutico in oncologia [57]. Partendo da importanti risultati preclinici, l'inibizione del proteasoma è stata estesamente investigata come strategia terapeutica nel mieloma multiplo, e gli inibitori del proteasoma costituiscono oggi uno dei trattamenti d'elezione per questa patologia.

Il bortezomib è stato il primo inibitore del proteasoma (IP) ad essere approvato per l'uso in clinica. Recentemente sono stati sviluppati nuovi agenti di seconda generazione che sono in fase di valutazione in studi clinici. I diversi IP si distinguono uno dall'altro per i siti catalitici differenti all'interno del nucleo proteosomiale [58,59,60]. In base alla struttura chimica ed alla porzione attiva, gli IP possono essere classificati in tre gruppi: boronati, epossichetoni e salinosporamidi.

Il bortezomib fa parte della categoria dei boronati, è un acido dipeptil-boronico, un IP reversibile che va ad agire sulle porzioni ad azione chemotripica

e caspasica, con un effetto minimo su quella tripsinica [58]. Inibendo il proteasoma, il bortezomib va ad agire su diverse vie di segnalazione per inibire la sopravvivenza tumorale e per arrestare la crescita del tumore, la sua diffusione e l'angiogenesi [61]. I meccanismi d'azione del bortezomib sono stati elucidati da vari esperimenti sia *in vivo* che *in vitro*. Il bortezomib induce direttamente l'apoptosi delle cellule tumorali, inibisce l'attivazione di NF- $\kappa$ B nelle cellule e nel microambiente tumorale, riduce l'aderenza delle cellule di mieloma alle cellule stromali del midollo, blocca la produzione e la segnalazione intracellulare di IL-6 nelle cellule mielomatose, inibisce la produzione e l'espressione di mediatori proangiogenici, e determina il superamento dei difetti nella regolazione apoptotica, come l'iperespressione di Bcl-2 e le alterazioni di p53 [61,62]. Inoltre, l'inibizione del proteasoma con bortezomib induce una risposta da stress nel reticolo endoplasmatico, in aggiunta all'interruzione della risposta alle proteine non ripiegate, un aspetto importante del meccanismo di inibizione del proteasoma nel MM a causa dell'ingente produzione di immunoglobuline nella cellula tumorale [63]. Questi meccanismi d'azione dell'inibizione del proteasoma hanno fornito il razionale per la combinazione del bortezomib e altri IP con numerosi agenti chemioterapici [62,63,64]; ad esempio, l'interruzione del controllo di qualità delle proteine e la conseguente attivazione della degradazione aggresomiale delle proteine malripiegate costituisce un forte razionale per la combinazione degli IP con gli inibitori degli istone deacetilasi [63]. Come risultato dei suoi meccanismi d'azione, il bortezomib è stato anche associato ad un incremento della deposizione di matrice ossea e l'attività osteoblastica, e la diminuzione del riassorbimento e dell'attività osteoclastica [65].



**Fig 1.8** l'evento chiave dell'attività antitumorale del bortezomib è l'inibizione dell'attivazione nel fattore nucleare NF-κB. Nelle cellule normali NF-κB è legato alla proteina inibitoria IκB, che la mantiene nella forma inattiva nel citoplasma. Il proteasoma è essenziale per l'attivazione di Nf-κB poiché catalizza la proteolisi dell'inibitore IκB. In molti tumori si ha l'attivazione di NF-κB che, una volta entrato nel nucleo, attiva diversi meccanismi che aiutano la sopravvivenza e la proliferazione della cellula.

L'efficacia e la sicurezza del bortezomib sono state stabilite attraverso una serie di studi di fase I e III. I primissimi studi di fase I risalgono a più di 10 anni fa e hanno dimostrato che possiede un'importante attività antitumorale a fronte di manifestazioni di tossicità controllabili, soprattutto nei pazienti con malattia ricaduta o refrattaria [66,67,68]. Quando somministrato per via endovenosa due volte alla settimana, la dose massima tollerata era di 1,3mg/m<sup>2</sup>, tenendo conto dei principali eventi avversi come la diarrea e la neuropatia periferica [66]. Gli studi di fase I hanno mostrato l'assenza di una significativa mielosoppressione; inoltre, erano infrequenti le tossicità di tipo cardiaco, epatico o renale.

Dopo queste prime evidenze, l'efficacia del bortezomib è stata confermata da studi estesi di fase II in pazienti con MM refrattario o ricaduto. Complessivamente, il 27% dei pazienti ha ottenuto una risposta parziale (PR), comprendendo qui il 10% in risposta completa o quasi completa (CR o nCR). La mediana del tempo alla progressione (TTP) era di 7 mesi, mentre con le terapie precedenti era solo di 3 mesi. Altri studi di fase II mirati all'individuazione

della dose ottimale hanno stabilito che la dose di partenza preferibile è di  $1.3\text{mg}/\text{m}^2$ , sebbene, quando richiesto, possa essere ridotta a  $1.0\text{mg}/\text{m}^2$  offrendo comunque un beneficio di sopravvivenza. I risultati degli studi di fase II hanno determinato l'approvazione del bortezomib per il trattamento del MM ricaduto o refrattario e hanno condotto alla sperimentazione di fase III. Uno studio internazionale di fase III ha dimostrato la superiorità del bortezomib rispetto al desametasone ad alte dosi [69], che costituiva allora il trattamento d'elezione per i pazienti in ricaduta. Il bortezomib si è mostrato superiore in termini di tasso di risposta, tempo alla progressione, e sopravvivenza complessiva [69].

Gli studi che contemplavano il bortezomib come singolo agente, hanno anche messo in evidenza le principali tossicità: sintomi gastrointestinali, anemia, trombocitopenia, astenia e neuropatia periferica (NP). Un grosso sforzo è stato fatto per caratterizzare al meglio la NP associata al trattamento. Esperimenti su modelli murini hanno evidenziato la presenza di aggregati ubiquitinati nel ganglio dorsale, a suggerire una tossicità diretta del bortezomib [70,71,72]. La neuropatia indotta da bortezomib può essere controllata attraverso una riduzione del dosaggio ed è reversibile in più del 50% dei casi; anche la somministrazione sottocutanea del farmaco può costituire un nuovo approccio per la gestione della NP [73,74,75,76]. La tossicità ematologica più comune è la trombocitopenia transitoria [77] che si manifesta con diminuzione e ripresa ciclica della conta piastrinica, senza evidenza di trombocitopenia cumulativa [77,78]. Questo quadro richiede generalmente un scarso supporto piastrinico, perciò il farmaco può essere somministrato anche a pazienti trombocitopenici [78].

Poiché il bortezomib viene somministrato per un numero determinato di cicli, i pazienti possono mantenere la sensibilità al farmaco anche alla ricaduta dopo l'iniziale terapia. Studi specifici in merito hanno confermato la fattibilità del ritrattamento del bortezomib nel mieloma ricaduto [79].

In seguito alla dimostrazione dell'efficacia del bortezomib come singolo agente, diversi studi hanno dimostrato che questa aumenta attraverso la combinazione con agenti a diverso meccanismo d'azione. In un primo tempo è stata investigata la combinazione con le antracicline in pazienti con MM refrattario/ricaduto [80]. L'associazione aumenta l'efficacia ma anche le tossicità di grado 3 e 4 [80,81]. Studi in vitro hanno anche dimostrato che la

combinazione del bortezomib col desametasone ha un effetto sinergico, e le osservazioni cliniche mostrano che l'aggiunta del desametasone migliora il tasso di risposta fino al 34% [82,83].

Ad oggi i regimi di trattamento basati sull'uso del bortezomib comprendono steroidi e agenti alchilanti, farmaci immunomodulanti, anticorpi monoclonali, istone deacetilasi o inibitori dell'AKT [84]. Le combinazioni più diffuse sono bortezomib più ciclofosfamide e desametasone (VCD) o prednisone (VCP), o bortezomib più lenalidomide e desametasone (VRD). Il tasso di risposta va dal 60 al 90% con una mediana di sopravvivenza libera da malattia che va da 7 a 15 mesi, la mediana della sopravvivenza globale è di 16-37 mesi e il farmaco può essere somministrato alla dose ed alla tempistica standard con poche tossicità.

#### **1.4.2 Lenalidomide**

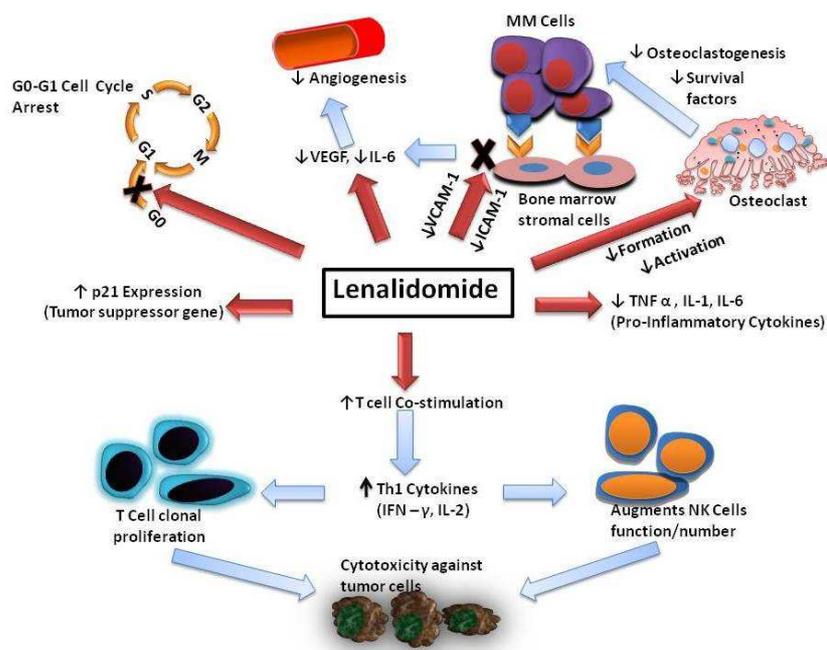
Negli ultimi 15 anni, la talidomide, il composto primitivo di una nuova classe di farmaci antineoplastici definiti agenti immunomodulanti (IMiDs: *immunomodulatory drugs*) ha dimostrato di avere una notevole attività antitumorale in diverse patologie di natura maligna. I primi a descrivere un beneficio clinico della talidomide su pazienti con mieloma multiplo ricaduto o refrattario sono stati Singhal et al.[85]. Questi risultati non solo sono stati confermati da diversi altri studi, ma hanno dato inizio ad una fase di ricerca di nuovi analoghi della talidomide più potenti e possibilmente meno tossici [86]. Questo processo ha condotto allo sviluppo della lenalidomide, che attualmente costituisce il composto disponibile più importante della categoria dei farmaci immunomodulanti. Il composto originario talidomide è stato modificato per intensificare l'attività immunologica ed antitumorale ed al contempo ridurre la neurotossicità e gli effetti avversi teratogeni [86]. Per ottenere ciò, è stato conservata la struttura chimica della talidomide aggiungendo un gruppo amminico e rimuovendo un gruppo carbonilico. Questi cambiamenti strutturali hanno incrementato la sua attività antitumorale ed immunomodulante.

Benché l'attività clinica degli IMiD in diverse patologie neoplastiche, il meccanismo esatto della loro attività antitumorale rimane elusivo. E' possibile che l'azione antitumorale della lenalidomide sia mediata da diversi processi

mutualmente esclusivi che dipendono originariamente dal tipo di cellule tumorali e dal loro microambiente.

Un importante effetto della lenalidomide è la sua abilità di modulare la produzione di diverse citochine nel microambiente tumorale. Diversi studi hanno descritto una diminuzione di citochine favorenti la sopravvivenza cellulare, quali il fattore di necrosi tumorale TNF- $\alpha$ , l'interleuchina-6, l'interleuchina-8 ed il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF); tutte queste citochine favoriscono lo sviluppo di un ambiente che favorisce la crescita tumorale e la resistenza alla terapia [87,88,89]. Il fattore VEGF attiva una via di segnalazione che comprende PI3 (*phosphatidyl inositol-3'*)/Akt che è importante per la proliferazione e la sopravvivenza di diversi tumori, tra cui il mieloma multiplo. La lenalidomide inibisce la fosforilazione di Akt in Ser473 e Thr308, suggerendo che l'attività antiangiogenica ed antiproliferativa della lenalidomide siano correlate all'inibizione della via di segnalazione di VEGF attraverso Akt.

La lenalidomide potrebbe altresì alterare anche altri componenti del microambiente tumorale, compresa la componente cellulare. Queste proprietà della lenalidomide, che nel loro insieme alterano l'ambiente tumorale e spostano l'equilibrio da antiapoptotico a proapoptotico, pongono le basi per la ricerca clinica della sua attività in pazienti con neoplasie a cellule B.



**Fig 1.9** Diversi meccanismi con i quali la lenalidomide ottiene l'efficacia clinica nelle neoplasie ematologiche.

### 1.4.3 Trattamento del MM alla diagnosi

Il trattamento iniziale del mieloma multiplo dipende in prima istanza dall'eligibilità del soggetto all'auto-TMO. I pazienti potenzialmente candidati al trapianto autologo sono nella maggior parte dei casi trattati con due o quattro cicli di induzione non contemplanti ciclofosfamide (un agente alchilante della famiglia delle mostarde azotate) prima della raccolta delle cellule staminali [90]. Dopo la raccolta, la maggior parte dei pazienti procede verso l'autotrapianto (approccio dell'auto-TMO precoce), mentre gli altri riprendono la terapia di induzione serbando il trapianto per il momento di ripresa della malattia (approccio del trapianto tardivo). L'eligibilità al trapianto autologo è dettata dall'età, dallo Stato di Validità (*ECOG performance status*) e comorbidità. Negli Stati Uniti il limite massimo d'età per il trapianto è circa 75 anni, mentre nella maggior parte dei paesi europei i pazienti con età maggiore di 65 anni non sono ritenuti candidabili all'auto-TMO. In generale, un trattamento prolungato a base di melphalan è sconsigliato nei pazienti eligibili per autotrapianto poiché può interferire con un'adeguata mobilizzazione delle cellule staminali.

I regimi terapeutici più frequentemente utilizzati nella terapia del MM alla diagnosi sono talidomide più desametasone (TD), lenalidomide in associazione a desametasone a basse dosi (Rd), bortezomib con desametasone (VD), bortezomib, talidomide, desametasone (VTD), bortezomib, lenalidomide desametasone (VRd) e bortezomib, ciclofosfamide, desametasone (VCD).

Tra le terapie che prevedono l'utilizzo di due farmaci, la combinazione TD ha determinato un tasso di risposta del 65-75% in studi clinici di fase II [91,92,93]. Tuttavia, recentemente questo trattamento ha mostrato avere livelli di mortalità e tossicità eccessivamente elevati. Pertanto, ad oggi viene somministrato solo se non sono disponibili altre opzioni terapeutiche.

La lenalidomide è l'analogo della talidomide di nuova generazione dotato di maggiore efficacia e sicurezza [94]. Studi clinici randomizzati hanno dimostrato la superiorità del trattamento con lenalidomide e desametasone a basse dosi rispetto alla lenalidomide associata a desametasone ad alte dosi [95]. Ad oggi, il desametasone ad alte dosi non è infatti indicato per il trattamento in prima linea del mieloma multiplo, a favore del desametasone a basso dosaggio (40mg/settimana o equivalente). Nei pazienti in trattamento con Rd, in vista del

trapianto autologo, è indicata la mobilitazione con regimi contenenti agenti chemioterapici, come ciclofosfamide con G-CSF.

Nei pazienti alla diagnosi, il trattamento con bortezomib e desametasone raggiunge una risposta del 70-90% [96,97]. Sfortunatamente, questo non si traduce in miglioramenti sostanziali nella sopravvivenza libera da progressione e nella sopravvivenza globale.

La combinazione di tre agenti terapeutici nel trattamento in prima linea ha determinato un miglioramento della risposta globale, e anche un tasso più elevato di CR e sopravvivenza libera da malattia. Tuttavia, non è chiaro se l'incorporazione di tre agenti attivi nei pazienti in prima linea aumenti la sopravvivenza globale rispetto ad un approccio sequenziale. E' ad oggi sconosciuto anche l'effetto sulla qualità di vita dei pazienti.

Per i pazienti non eligibili al trapianto autologo i regimi terapeutici indicati sono quelli a base di melphalan e vengono somministrati solitamente per 9-18 mesi. Negli ultimi anni il loro impiego è andato scemando perché molti dei regimi non contenenti melphalan si sono rivelati eccellenti opzioni per i soggetti di 65-75 anni non candidati al trapianto [98,99]. Il melphalan in combinazione con prednisone è stato utilizzato per molti anni, con un tasso di risposta di ca. 50%. Oggi viene utilizzato nel caso di pazienti molto anziani che non hanno accesso alla lenalidomide o per i quali non è indicata un'altra terapia a causa dell'età o di significative comorbidità.

#### **1.4.4 Mieloma multiplo ricaduto o refrattario**

Col termine "MM ricaduto" si intendono quei soggetti che hanno precedentemente ottenuto almeno una minima risposta in seguito alla terapia ed al trapianto, ma che poi vanno incontro ad una ripresa di malattia. Mentre rientrano nella categoria di "MM refrattario" quei pazienti che non rispondono al trattamento terapeutico o vanno in progressione entro 60 giorni dall'ultimo trattamento. Anche se concettualmente diverse, queste due condizioni possono essere raggruppate nella definizione di MM ricaduto/refrattario e l'approccio terapeutico per questi pazienti rappresenta ancora una sfida per il medico [100].

I meccanismi sottostanti al MM ricaduto/refrattario sono stati recentemente chiariti. Ad esempio, è stata dimostrata l'esistenza di sub-cloni minori che sono in grado di sopravvivere alla chemioterapia e costituire così un serbatoio per la

ricaduta o la resistenza [101]. L'instabilità genetica dei sub-cloni aggressivi e la pressione selettiva indotta dalla terapia durante il decorso della malattia sono attualmente considerati i due principali fattori condizionanti la ricaduta o la resistenza [102].

In passato, il mieloma multiplo ricaduto/refrattario è stato trattato con una combinazione standard di agenti alchilanti, antracicline e corticosteroidi, con o senza trapianto di cellule staminali [103,104]. I nuovi farmaci immunomodulanti e gli inibitori del proteasoma hanno non solo prolungato notevolmente la sopravvivenza globale nei pazienti ricaduti/refrattari, ma hanno anche migliorato il tasso, la profondità e la durata della risposta nella terapia di prima linea [105]. L'impatto della profondità di risposta sulla sopravvivenza nel contesto del MM ricaduto è ancora controverso. Secondo gli ultimi studi, la remissione completa di malattia (CR) sembra essere l'unica condizione legata ad una risposta a lungo termine e ad una sopravvivenza prolungata, specialmente se supportata dalla citofluorimetria multiparametrica o da indagini molecolari. Al contrario, la risposta parziale (PR) o risposta parziale molto buona (VGPR) sembrano avere tutti virtualmente lo stesso esito [106].

Il trattamento del MM ricaduto/refrattario si basa sull'utilizzo di diverse strategie terapeutiche, tra cui le più diffuse sono quelle a base di bortezomib o lenalidomide. Nel 2006 la lenalidomide è stata approvata negli Stati Uniti per l'utilizzo in combinazione con il desametasone in pazienti con MM che hanno ricevuto un precedente trattamento. Anche l'inibitore del proteasoma bortezomib è stato approvato inizialmente per il trattamento del MM refrattario e poi del mieloma ricaduto dopo almeno una linea di terapia.

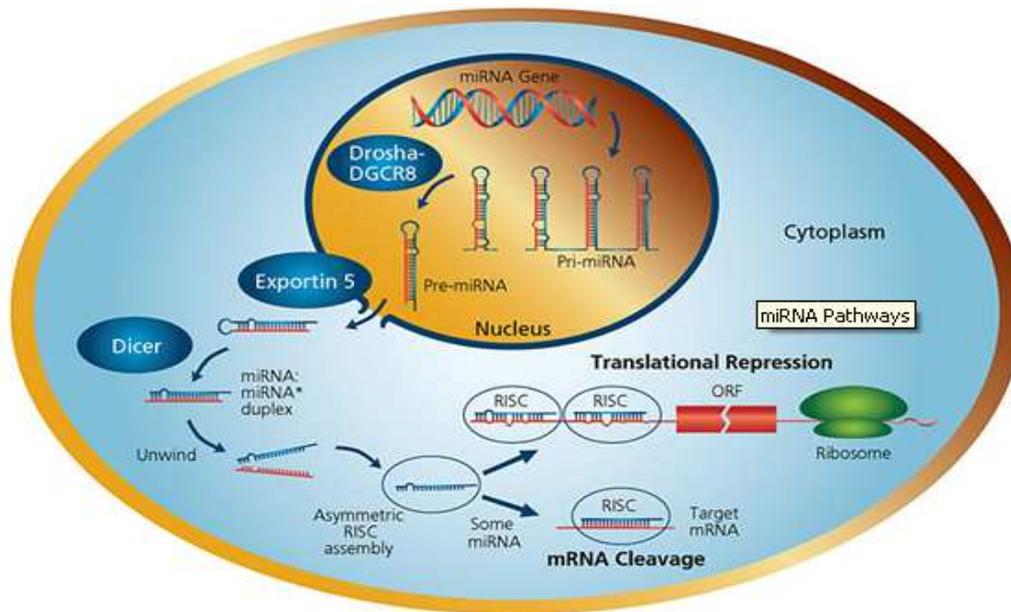
Data la grande eterogeneità di questa malattia in termini di risposta al trattamento e di sopravvivenza, l'identificazione di fattori prognostici e caratteristiche della malattia che predicano la risposta ad un determinato regime sono essenziali per pianificare la terapia più appropriata per il mieloma refrattario. Nonostante siano stati individuati diversi fattori coinvolti nella stadiazione e nella prognosi di malattia (vedi 2.1), sono ancora scarse le informazioni riguardanti il ruolo dei fattori clinici e biologici che condizionano l'andamento clinico dei pazienti in prima ricaduta.

## 1.5 I microRNA

In questo contesto, studi recenti si sono focalizzati sull'analisi dei microRNA, sia all'interno delle plasmacellule che nel circolo ematico, come possibili marcatori di stadiazione e prognosi del MM [2,3,24]. Anche questo studio è stato volto all'analisi dell'espressione dei miRNA circolanti come possibili biomarcatori caratteristici del mieloma multiplo.

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA a singolo filamento, di lunghezza compresa tra i 20 e 23 nucleotidi, che svolgono un ruolo di regolazione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale. Per la prima volta i miRNA sono stati descritti nel *C. Elegans*, da allora sono stati fatti grandi progressi nella definizione del ruolo di queste molecole [25].

La regolazione dell'espressione genica da parte dei miRNA ha come evento fondamentale il legame del microRNA all'estremità 3' non tradotta (3'UTR) dell'RNA messaggero bersaglio. Le proteine Argonauta (Ago), che possiedono proprietà di clivaggio dell'RNA, si associano al microRNA formando il complesso di ribonucleoproteico RISC (*RNA-induced silencing complex*) che opera il silenziamento post-trascrizionale. Il complesso RISC si lega al suo bersaglio sfruttando il caratteristico appaiamento tra basi azotate: se l'appaiamento tra il microRNA e la porzione 3'UTR dell'mRNA bersaglio è perfetto si ha la degradazione dell'RNA messaggero; se invece l'appaiamento avviene solo tra alcune delle basi si verifica solo un'inibizione della traduzione [26,27]. I meccanismi di regolazione che coinvolgono i miRNA sono in realtà molteplici e comprendono anche la proteolisi del prodotto di traduzione e persino l'induzione dell'espressione genica.



**Fig.1.4** Biogenesi dei miRNA. I microRNA maturi vanno ad agire sul mRNA bersaglio in maniera differente a seconda della qualità dell'appaiamento [27].

Negli ultimi anni molti studi hanno avuto come obiettivo l'identificazione dei geni target dei microRNA e l'approfondimento dei meccanismi di regolazione sottostanti. Una banca dati globale, *miRbase*, raccoglie oggi più di mille sequenze di miRNA umani e si pensa che più della metà dei geni totali sia da essi controllato direttamente. Studi di proteomica e di analisi di predizione *in silico* suggeriscono che ogni microRNA possa avere fino a centinaia di potenziali bersagli poiché è necessario un appaiamento di poche basi [28]. I miRNA possono essere codificati in segmenti genici indipendenti con un promotore e siti di regolazione autonomi, oppure possono essere localizzati nel genoma in *cluster* policistronici, in regioni intergeniche o all'interno di sequenze introniche o esoniche di altri geni [27]. La maggior parte dei microRNA è trascritta dall'RNA polimerasi II ed è regolata da specifici promotori ed elementi di terminazione permettendo così una fine regolazione nelle diverse condizioni e tipi cellulari. I microRNA sono coinvolti in tutti i processi cellulari quali l'omeostasi, la proliferazione, il differenziamento, l'apoptosi e la risposta allo stress ed anche in quelli più complessi come lo sviluppo embrionale, la crescita e l'insorgenza di patologie. In particolare, diversi studi hanno dimostrato il ruolo chiave di queste molecole nell'ematopoiesi e nelle neoplasie ematologiche [29].

### 1.5.1 Il ruolo dei miRNA nei tumori

Diversi processi coinvolti nella cancerogenesi vengono controllati dai microRNA mediante la regolazione dell'espressione di oncosoppressori ed oncogeni. I miRNA infatti regolano la biologia delle cellule staminali tumorali, l'angiogenesi, la transizione epitelio-mesenchimale, la metastatizzazione e la farmaco-resistenza [30]. Nel 2002 un primo lavoro del gruppo di Croce ha sancito il ruolo dei microRNA nelle neoplasie identificando un cluster genico comprendente miR-15 e miR-16 che risulta deleto nella maggior parte dei soggetti con leucemia linfatica cronica (CLL) [31]. E' stato in seguito confermato che i miRNA sono espressi nelle cellule maligne nelle quali vanno a costituire pattern di espressione distinti con effetti importanti su tutti i processi biologici [30].

Nel corso dei processi di cancerogenesi avvengono spesso modificazioni nel genoma che portano alla delezione o amplificazione di intere regioni cromosomiche. Se all'interno di queste sono inclusi loci codificanti per microRNA, questi andranno incontro ad un aumento o riduzione dell'espressione [32]. Il ruolo dei miRNA nel processo di oncogenesi, a causa del loro stesso meccanismo d'azione, è speculare rispetto a quello degli altri oncogeni. In effetti, i microRNA iperespressi nei tumori, detti anche "*oncomirs*", svolgono la loro azione favorente la tumorigenesi se vanno ad inibire l'attività dei geni oncosoppressori. Viceversa, i miRNA ipoespressi in ambito tumorale possono avere come target oncogeni la cui espressione così non viene più inibita, sostenendo la cancerogenesi. Anche le mutazioni delle regioni bersaglio dei microRNA possono alterarne la funzione. Inoltre, la modulazione dell'espressione di gran parte dei miRNA sembra essere sotto il controllo dei fattori di trascrizione, tra cui l'oncogene MYC e l'oncosoppressore p53 che sono tra gli effettori più importanti del processo di cancerogenesi [33].

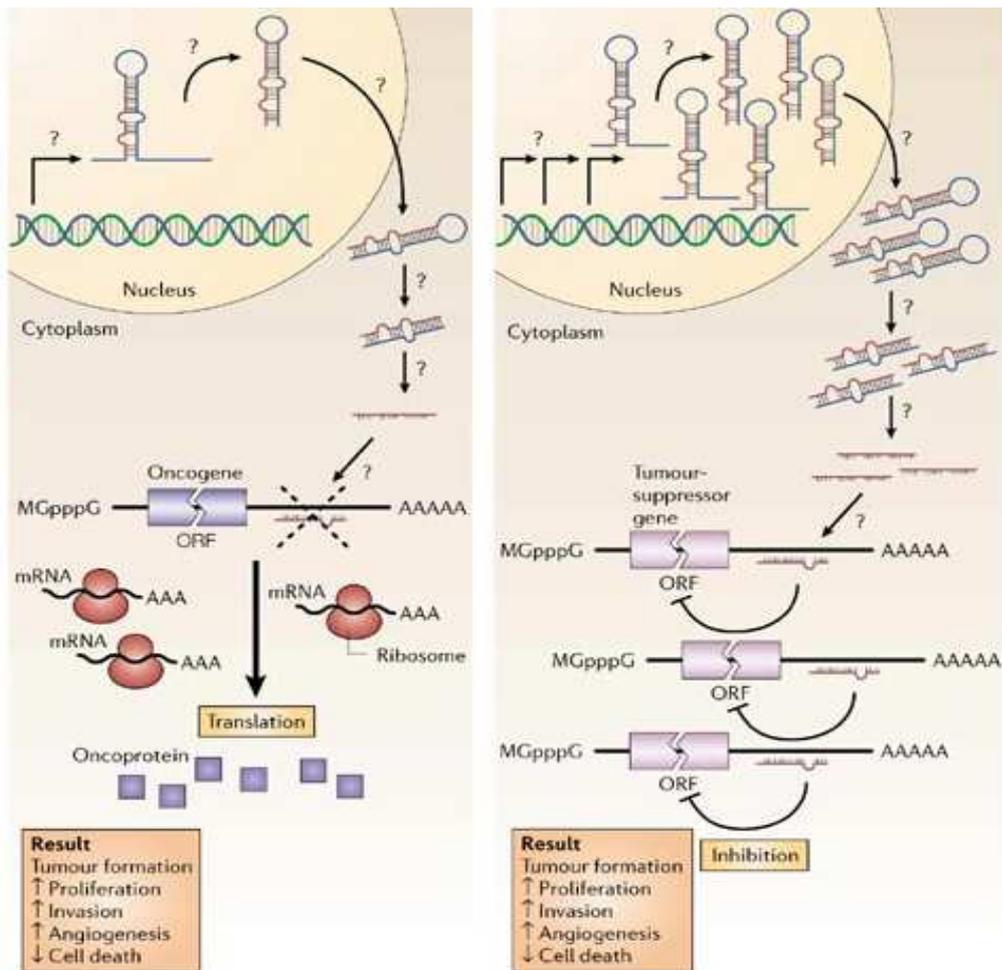


Fig 1.5 MicroRNA nel ruolo di oncogeni ed oncosoppressori [30].

I microRNA sono stati studiati inizialmente nei tumori solidi come nuova tipologia di marcatore molecolare che porti ad identificare una *signature* caratteristica del tumore rispetto ai tessuti sani. Nel caso del carcinoma mammario ad esempio, sono stati individuati dei miRNA utilizzabili come biomarcatori in quanto correlano con la prognosi di malattia [29,32]. Diversi sottotipi molecolari di carcinoma correlano infatti con lo stato di espressione dei recettori ormonali, con l'indice di proliferazione, l'invasione vascolare e lo stadio della malattia [33].

### 1.5.2 MicroRNA circolanti

Lo studio dei miRNA intracellulari come biomarcatori in ambito tumorale è inficiato dalla necessità di effettuare procedure invasive per il paziente al fine di ottenere il campione biologico. Inoltre, pratiche come biopsie, agoaspirati ed

escissioni chirurgiche possono essere eseguite solo nel caso in cui la patologia sia stata precedentemente diagnosticata: un biomarcatore ideale invece, dovrebbe essere accessibile con metodiche non invasive. Inoltre, dovrebbe anche essere analizzabile con metodiche routinarie e poco costose, e dotato di elevata specificità e sensibilità tali da garantire una diagnosi precoce ed un numero di falsi positivi il più ridotto possibile.

I miRNA circolanti sono stati inizialmente descritti nel 2008 nel contesto della gravidanza: microRNA di origine placentare venivano rilevati nel plasma di donne incinte [34]. Non molto tempo dopo, il gruppo di Lawrie scoprì una variazione del profilo di espressione dei miRNA circolanti tumore specifici. Questo studio dimostrò che non solo il miR-21 era presente in quantità significativamente maggiore nei pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) se confrontati con i controlli sani, ma anche che questo profilo di espressione correla clinicamente con la sopravvivenza libera da malattia [35]. In seguito, sono stati individuati miRNA specifici per altre neoplasie, quali carcinoma della mammella e del polmone, oppure coinvolti nella tumorigenesi [36].

Una delle proprietà più vantaggiose dei microRNA circolanti è la loro stabilità, sia in circolo che durante i processi di stoccaggio. Non sono infatti soggetti alla degradazione da parte delle RNAsi plasmatiche e si mantengono inalterati se sottoposti ad aggressioni chimico fisiche (variazioni di pH, bollitura, crioconservazione prolungata, ripetuti cicli di congelamento-scongelo) [34]. Il motivo per cui i miRNA circolanti non vengono degradati da parte delle RNAsi plasmatiche è attribuibile al fatto che sono inclusi all'interno di complessi lipidici o lipoproteici [37]. I microRNA vengono rilasciati in circolo all'interno di queste micro vescicole che ne impediscono la degradazione, diversamente dagli altri mRNA circolanti che vengono invece immediatamente nucleolisati. Anche altri fluidi biologici, come urine, saliva, lacrime, latte mammario, liquido seminale e materiale fecale contengono miRNA al loro interno associabili quindi ad una pleora di condizioni fisio-patologiche [38].

Gli esosomi contenenti miRNA al loro interno, oltre a proteggerli dall'azione degradante delle RNA-si, svolgono anche la funzione di comunicazione intracellulare tramite gli stessi microRNA. Le vescicole proteolipidiche vengono infatti endocitate dalle cellule bersaglio dove esplicano il silenziamento genico

con lo stesso meccanismo dei miRNA intracellulari [39]. Oltre che mediante il meccanismo di rilascio esosomiale, un'importante quota di microRNA circolanti vengono rilasciati dalle cellule apoptotiche o morte. Secondo un'altra ipotesi, anche le cellule immunitarie infiltranti il tumore rilasciano miRNA nel microambiente circostante [34]. Si instaura così una comunicazione reciproca tra le cellule maligne che rilasciano miRNA con azione favorente l'immunosoppressione, e le cellule immunitarie che producono miRNA tumore-specifici per inibire o promuovere la proliferazione o l'apoptosi.

### 1.5.3 I miRNA nelle neoplasie ematologiche

Inizialmente il coinvolgimento dei microRNA nell'emopoiesi è stato descritto in un lavoro di Chen et al. in cui nel modello murino vengono descritti tre miRNA preferenzialmente espressi nel midollo osseo: miR-223, miR-142 e miR-181 [40].

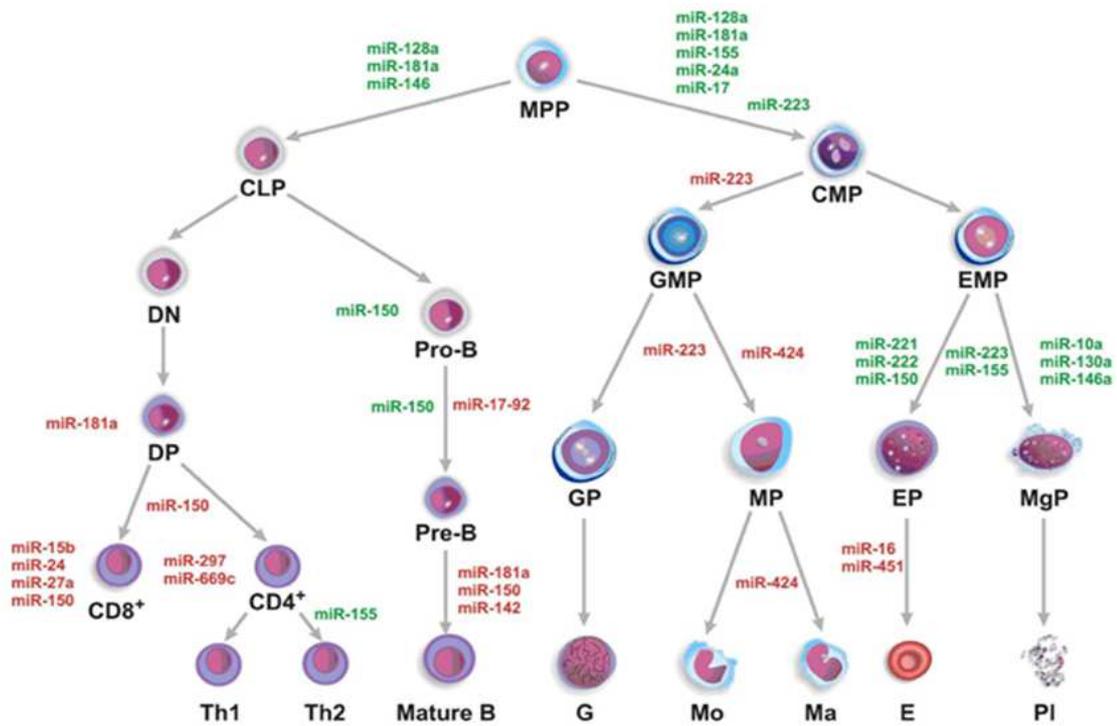


Fig 1.6 Il ruolo dei miRNA nell'emopoiesi normale.

Studi successivi hanno poi identificato anche una serie di altri miRNA che giocano un ruolo fondamentale nella maturazione della cellula staminale

emopoietica verso la filiera mieloide o linfoide, regolando il differenziamento cellulare e favorendo l'adattamento della cellula in risposta ai diversi stimoli. Negli ultimi anni ha infatti avuto un andamento esponenziale il numero di lavori che dimostrano un coinvolgimento di queste molecole nella patogenesi e prognosi delle neoplasie ematologiche. Le ricerche di Calin et al. hanno apportato la prima evidenza di questa correlazione, in quanto hanno individuato il *cluster* genico di due miRNA miR-15a e miR-16-1 localizzati sul cromosoma 13 in corrispondenza del locus 13q14. Però, mentre le cellule B normali esprimono livelli elevati di miR-15a e miR-16-1, i linfociti di pazienti affetti da LLC avevano livelli significativamente ridotti a causa di una perdita allelica a livello del locus 13q14. Queste evidenze hanno portato ad ipotizzare che questi miRNA avessero un ruolo oncosoppressorio e che la loro perdita contribuisse alla patogenesi della LLC [31]. In seguito è stato verificato che il target di questi miRNA è l'oncogene BCL-2. Studi più approfonditi sulla patogenesi della LLC hanno condotto all'individuazione di altri miRNA che correlano con parametri prognostici quali l'espressione di ZAP-70 e lo stato mutazionale delle immunoglobuline [41]. Nella categoria dei linfomi non Hodgkin, il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) è stato estesamente investigato, riscontrando una differenza tra i profili di espressione nei malati rispetto ai sani [42]. Ancora, altri microRNA sono stati associati allo sviluppo delle sindromi mielodisplastiche. Tutti questi studi affermano che la deregolazione dell'espressione dei miRNA può contribuire alla cancerogenesi in ambito leucemico, ed interferisce con il controllo del normale processo emopoietico [43].

	MicroRNA	Status	Function	Target
<i>Lymphomas</i>				
HL	Mir-155	UR	OG	PU.1
	Let-7a	UR	OG	PRDM1/BLIMP-1
	mir-9	UR	OG	PRDM1/BLIMP-1
DLBCL	mir-155	UR in ABC	OG	PU.1, SHIP1
	mir-15a	DR	TSG	BCL-2
	mir-21	UR in ABC	OG	BCL-2
	mir-221	UR in ABC	OG	E2F1
	mir-17-92	UR	OG	
MCL	Mir-17-92	UR	OG	E2F1
	Mir-16-1	Binding site deleted	TSG	CCND1
<i>Leukemias</i>				
AML	Mir-181a	UR in M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub>	OG/TSG	TCL-1
		DR in M <sub>4</sub> , M <sub>5</sub>		
APL	Mir-15a, 16-1	UR*	TSG	BCL-2
	Mir-181b	DR		
ALL	mir-17-92	UR	OG	BIM
	mir-128b	UR		
	mir-204	UR		
CLL	mir-15a	DR	TSG	BCL-2
	mir-16-1	DR	TSG	BCL-2
	mir-29b	DR in poor prognosis CLL	TSG	TCL-1
	mir-181b	DR in poor prognosis CLL	TSG	TCL-1
	Mir-155	UR	OG	
CML	Mir-203	DR	TSG	ABL-1
	Mir-17-92	DR	OG	
MM	Mir-15a,16	DR	TSG	

**Tab.1.3** microRNA coinvolti nelle neoplasie ematologiche [29].

ABC, cellule B attivate; AML, leucemia mieloide acuta; APL, leucemia promielocitica acuta; ALL, leucemia linfoblastica acuta; CLL, leucemia linfatica cronica; CML, leucemia mieloide cronica; DLBCL, linfoma diffuso a grandi cellule B; HL, linfoma di Hodgkin; MM, mieloma multiplo; MCL, linfoma mantellare; UR, up-regolato; DR, down-regolato; OG, oncogeni; TSG, geni oncosoppressori; CCND1, ciclina D1; TCI-1, gene di leucemia/linfoma a cellule T1.

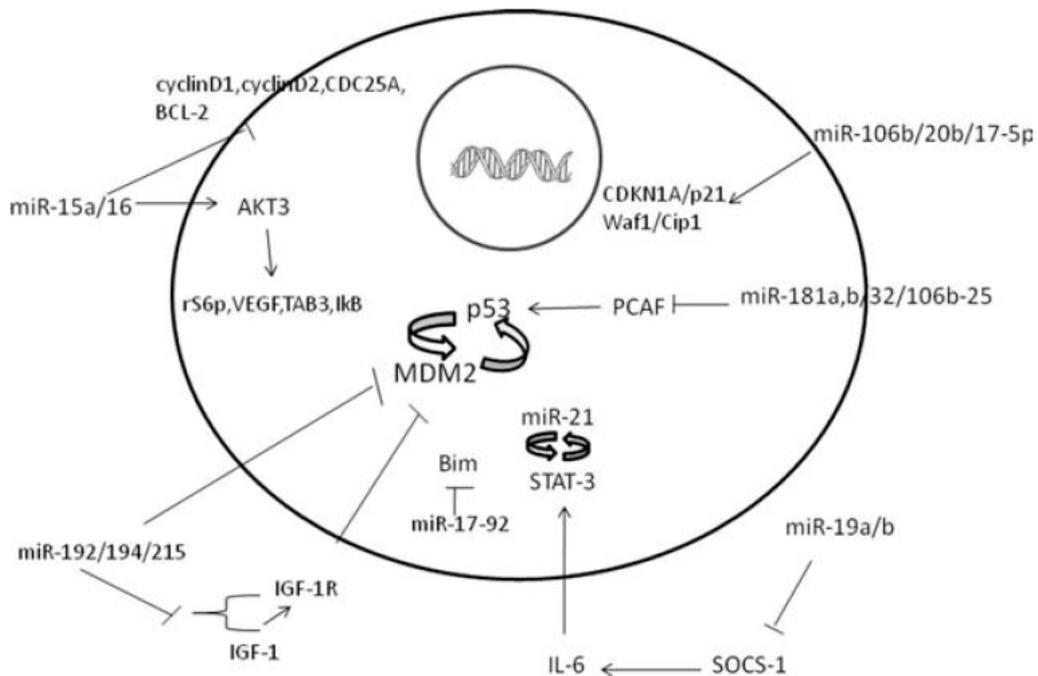
#### 1.5.4 MicroRNA e Mieloma Multiplo

All'interno della categoria delle neoplasie ematologiche, anche nel Mieloma Multiplo è stata descritta l'importanza dei miRNA nel processo di patogenesi e progressione del tumore, e diversi lavori hanno evidenziato la presenza di profili di espressione caratteristici. Il primo studio relativo al coinvolgimento dei miRNA nel MM è di Al Masri et al. del 2005 nel venivano descritti i microRNA deregolati nelle cellule tumorali. Successivamente, altri studi di sono incentrati sul MM riscontrando profili di espressione specifici che includono noti onco-miR come let-7a, miR-16 e miR-19b che erano più elevati nelle cellule di pazienti rispetto ai controlli sani [44]. Anche miR-21 è stato individuato come miRNA che agisce da oncogene con funzione antiapoptotica. E' stato inoltre descritto che miR-21 promuove la sopravvivenza delle cellule maligne e la sua trascrizione è mediata dalla via di segnalazione di STAT-3, il maggior mediatore dell'azione di IL-6, ampiamente espresso nel MM [45].

Un aspetto particolarmente studiato è quello del meccanismo che porta all'evoluzione da MGUS a MM. Pichiorri et al. hanno esaminato i diversi profili di espressione dei miRNA nelle plasmacellule selezionate di soggetti sani, con MGUS e affetti da MM. Dai risultati si evince che alcuni miRNA, tra cui miR-21, miR-181a ed il cluster miR-106b-25 (nello specifico miR-93, miR-25 e miR-106b) sono significativamente iperespressi nei soggetti con MGUS rispetto ai controlli sani. Ugualmente, alcuni dei miRNA, quali miR-21 ed il cluster -106b-25, sono up-regolati anche nei pazienti con MM. Viene anche evidenziata l'espressione differenziale di miR-32 e di miRNA appartenenti al cluster miR-17-92, soprattutto miR-19a e miR-19b che sono notevolmente elevati nelle plasmacellule di MM conclamato rispetto a quelle di MGUS. Pertanto, questi miRNA potrebbero avere un ruolo importante nella trasformazione maligna da mGUS a MM. Tra i target di miR-19a e -19b vi è, tra gli altri, SOCS-1, una molecola che inibisce la via di segnalazione di IL-6. SOCS-1 viene deregolato dai miRNA di cui sopra causando l'attivazione costitutiva di Jak/STAT3. Uno dei geni bersaglio dei miR-181a e -181b è invece PCAF (*p-300-CBP-associated factor*), una molecola che regola positivamente l'attività di p53 [2,3]. Il quadro di progressione del MM sembra essere associato alle aberrazioni cromosomiche che ne influenzano la prognosi ed il profilo molecolare. Verosimilmente, anche

l'espressione dei miRNA sarà soggetta a modificazioni. In effetti, livelli elevati di miR-1 e miR-133a correlano con la traslocazione t(14;16), a prognosi sfavorevole. Tra i microRNA ipoespressi nel MM vi sono i miR-192, -194 e -215 che entrano a far parte del meccanismo di regolazione a retroazione negativa di p53: questi sono infatti attivati a livello trascrizionale da p53 e agiscono poi sul suo soppressore MDM2 (*murine double-minute 2*). Anche l'up-regolazione di miR-25 e miR-181a potrebbe regolare negativamente l'espressione di p53. Un'alterazione nell'espressione di questi miRNA potrebbe modificare l'attività di p53, già coinvolto nella progressione del MM, con conseguenze dirette sulla biologia e la prognosi della malattia. Anche il processamento alterato dei miRNA può associarsi ad un peggioramento della prognosi, come nel caso delle mutazioni che coinvolgono la proteina Ago2, essenziale per formare il complesso funzionale RISC, e le cui mutazioni possono influenzare l'azione di miRNA nell'oncogenesi del MM [24].

Particolare attenzione è stata rivolta anche all'alterazione dell'espressione dei miRNA nei pazienti ricaduti o refrattari alle terapie [46]. Sono stati così individuati una serie di miRNA significativamente alterati in questi pazienti: in particolare i miR-221, -222 e -181a e b sono iperespressi, mentre i miR-15a e -16 sono ipoespressi, se non del tutto assenti nei soggetti con delezione del cromosoma 13 (miR-15a e -16 sono infatti codificati nel locus 13q14). Per comprendere il meccanismo funzionale di questi miRNA, si è cercato di individuare i loro bersagli. Sono stati così identificati i mRNA dei geni codificanti per le cicline D1 e D2 ed altri della via di segnalazione di NFκB, e dell'angiogenesi, che riducono la secrezione di VEGF ed altri fattori della crescita endoteliale. Inoltre, l'espressione elevata di miR-181a e b e i livelli ridotti di miR-15a sono associati con una prognosi peggiore in pazienti già appartenenti a categorie a rischio secondo l'ISS (stadi 2 e 3) [46]. Studi successivi hanno poi valutato anche i profili di espressione dei miRNA in relazione alla risposta terapeutica ed alla farmaco-resistenza, individuando *patterns* caratteristici in linee cellulari farmaco-resistenti oppure in pazienti con differente sensibilità al Bortezomib.



**Fig. 1.7** MicroRNA e geni target coinvolti nella patogenesi del MM [29].

Finora solo pochi lavori sono stati pubblicati riguardo l'espressione dei microRNA circolanti nel MM. Uno studio recente ha analizzato i profili di espressione dei miRNA plasmatici differenzialmente espressi nei pazienti se confrontati con soggetti sani. E' stato notato un aumento nell'espressione di tutti i miRNA nei pazienti con MM, ed in particolare i miR-148, -181a, -20a, -221 e -99b correlano con una ridotta sopravvivenza libera da ricaduta. Se analizzati in correlazione alla citogenetica, i miR-99b e -221 sono associati rispettivamente con la traslocazione t(4;14) e la delezione del cromosoma 13q14 [47].

Anche l'espressione del miR-92a sembra essere importante nel distinguere i soggetti con MM rispetto ai controlli sani, ed è stato correlato con i diversi stadi di malattia. Livelli più elevati di miR-92a circolante sono stati riscontrati, in effetti, nei pazienti con MGUS rispetto a quelli con MM, e nei pazienti in remissione completa di malattia (CR, *complete remission*) rispetto a quelli con malattia stabile (SD, *stable disease*). Non è stata però identificata alcuna correlazione significativa con i comuni parametri prognostici della malattia, i comuni sintomi, l'ISS, il sottotipo genetico, il tipo di catene leggere libere, l'albumina o l'LDH [48].

## **1.6 Cellule staminali tumorali (CSCs)**

Viene definita “staminale” una cellula che soddisfa le proprietà di: *i*) autorinnovamento, la capacità di compiere un numero illimitato di cicli replicativi mantenendo il medesimo stadio differenziativo, *ii*) potenza, la capacità di dare origine ad uno o più tipi cellulari.

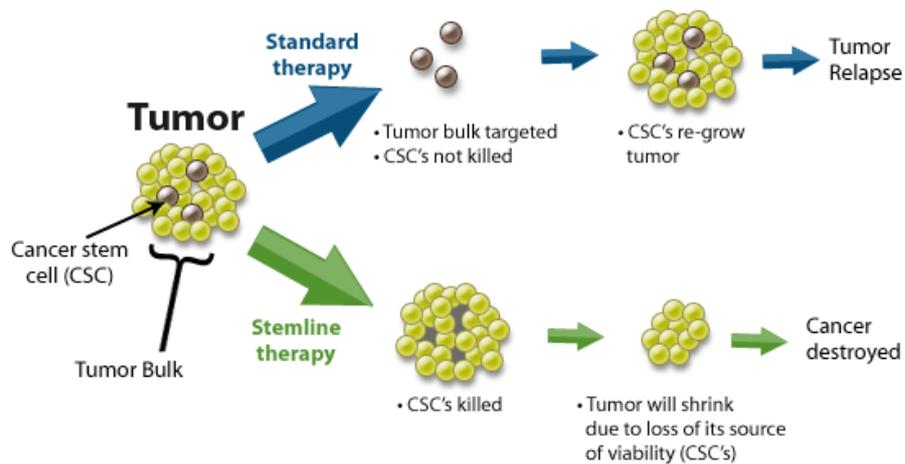
Le cellule staminali ad ogni divisione generano una cellula identica a sé stessa ed una commissionata verso una particolare via di differenziazione definita. Questo tipo di divisione asimmetrica permette di conservare il serbatoio di cellule staminali, mentre le cellule commissionate verso il differenziamento danno origine alle cellule mature che compongono i tessuti. Anche se dotate di potenziale replicativo illimitato, le cellule staminali solo raramente si dividono per mitosi.

Diversi studi sostengono l'ipotesi dell'esistenza all'interno delle masse tumorali di una sottopopolazione di cellule tumorigeniche, che sarebbe responsabile dell'insorgenza e del mantenimento del tumore. Queste cellule staminali tumorali (*cancer stem cells*: CSCs) possiedono caratteristiche simili alle normali cellule staminali ma replicandosi danno origine ad un tessuto neoplastico. Le CSCs sono numericamente esigue rispetto alla massa tumorale, ma costituiscono il serbatoio del cancro e sono in grado di alimentare la proliferazione del tumore stesso e possono essere la causa delle recidive.

### **1.6.1 CSCs, resistenza ai farmaci e possibili applicazioni terapeutiche**

Isolare e caratterizzare le CSCs ha come fine ultimo l'identificazione di terapie antitumorali dirette contro queste cellule. Esse costituiscono una minoranza di cellule cancerose resistenti ai comuni chemioterapici e radioterapici ed in grado di ricostituire il tumore a distanza di tempo. I farmaci antitumorali in uso, infatti, sono attivi sulle cellule in attiva divisione, mentre le cellule staminali tumorali, replicandosi lentamente non subiscono l'effetto citotossico indotto dalla chemio/radioterapia. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che le cellule staminali possono avere dei meccanismi di

detossificazione (trasportatori di membrana ed enzimi intracellulari) che le proteggono dall'azione di molti antitumorali.



**Fig 1.10** Effetto della terapia sui tumori secondo il modello delle cellule staminali tumorali.

### 1.6.2 Caratterizzazione delle cellule staminali del mieloma multiplo

In uno studio iniziale di Hamburger e Salmon è stato messo a punto un metodo di crescita *in vitro* delle cellule tumorali prelevate da campioni di sangue midollare di pazienti con MM ed hanno stabilito che il tasso di crescita è compreso tra lo 0.001 e lo 0.01% di tutte le cellule tumorali [107]. Questo dato indica che le plasmacellule di mieloma, analogamente alla loro controparte fisiologica, sono terminalmente differenziate, relativamente quiescenti ed incapaci di proliferare. Non è quindi molto verosimile che queste cellule siano in grado di dare inizio e mantenere la crescita del tumore.

Allo stato attuale, è possibile identificare, quantificare ed isolare le cellule tumorali di MM mediante citofluorimetria a flusso multiparametrica in base al loro immunofenotipo. Esse vengono rilevate grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali in grado di riconoscere specifiche molecole espresse sulla loro superficie cellulare. Le cellule del MM sono meglio caratterizzate dalla seguente combinazione di anticorpi: CD38+/CD138+/CD45+.

CD138 è un proteoglicano di transmembrana appartenente alla famiglia dei sindecani e nel sistema ematopoietico la sua espressione è limitata agli stadi tardivi di differenziazione delle cellule B.

Il CD138 è il marcatore d'elezione per le plasmacellule sane e di MM, ma la sua espressione è differente tra le due popolazioni cellulari ed è più marcata nelle plasmacellule tumorali. Un'ulteriore distinzione tra le plasmacellule neoplastiche e quelle sane può essere effettuata tramite l'utilizzo di anticorpi diretti contro CD19 e CD56: le plasmacellule di MM esprimono in modo aberrante l'antigene CD56 mentre non possiedono sulla loro superficie il marker CD19. Al contrario le plasmacellule sane non esprimono CD56 e sono invece positive per CD19 [108].

Sebbene non esista un antigene universale per identificare le CSCs, è possibile sfruttare alcune caratteristiche delle cellule staminali "normali" per analizzarle mediante citometria a flusso e definirne l'immunofenotipo. Le cellule staminali possiedono a livello della membrana citoplasmatica delle proteine appartenenti alla famiglia degli *ABC-transporters* (*ATP-binding cassette transporter*). Questi trasportatori, responsabili della resistenza ai farmaci, fungono da pompe, cioè sono capaci di trasportare i chemioterapici fuori dalla cellula stessa. Sfruttando le caratteristiche biologiche di queste pompe è stato allestito un saggio citofluorimetrico chiamato "side population" in grado di rilevare sottopopolazioni cellulari con caratteristiche di staminalità [109]. Un altro saggio utilizzato in citofluorimetria per identificare le cellule staminali è l'Aldefluor assay, basato sui livelli intracellulari di aldeide deidrogenasi [110].

Uno studio eseguito presso la John Hopkins University School of Medicine in linea con precedenti studi [111-114] ha dimostrato l'esistenza di cellule B mature monoclonali, presenti sia nel sangue periferico, sia nel midollo osseo di pazienti affetti da MM il cui ruolo nella patogenesi della malattia rimane ancora poco chiaro. Queste cellule possiedono un'elevata capacità clonogenica e potrebbero rappresentare le CSCs del MM, il compartimento "proliferante" del tumore. La sottopopolazione in questione fenotipicamente simile a cellule B mature non esprime il marcatore CD138 ed è invece positiva per gli antigeni CD20 e CD27, marcatori dei linfociti B della memoria [115]. Cellule con immunofenotipo CD138-/CD34- sono state isolate dal sangue periferico di quattro pazienti con mieloma multiplo e sono state in seguito trapiantate nei topi. Tutti gli animali hanno sviluppato paralisi degli arti posteriori ed hanno mostrato segni di tumore nel midollo osseo. Per contro, nei topi trapiantati con

le plasmacellule isolate dai pazienti (CD138+) non è stata verificata l'insorgenza di alcuna neoplasia.

Successivamente, sono stati eseguiti test *in vitro* per verificare la resistenza ai farmaci delle due sottopopolazioni cellulari. Per verificare la farmacoresistenza sono state isolate le plasmacellule CD138+ e cellule CD138- da due linee cellulari di Mieloma Multiplo e sottoposte all'azione di quattro agenti attivi (desametasone, lenalidomide, bortezomib e ciclofosfamide). Tutti e quattro i farmaci hanno inibito la crescita delle plasmacellule CD138+, al contrario la crescita della CD138- non ha subito variazioni rilevanti [116]. È stato inoltre osservato che la crescita *in vitro* di cellule mononucleate deplete della popolazione CD138-/34- estratte da midollo osseo di pazienti affetti da MM, è inibita dal Rituximab, anticorpo monoclonale diretto contro l'antigene CD20 [116]. I risultati ottenuti suggeriscono che il mieloma multiplo possiede al suo interno un'organizzazione gerarchica in cui le cellule staminali tumorali fenotipicamente simili alle loro controparti normali danno luogo ad una progenie differenziata. I progenitori delle plasmacellule tumorali sembrerebbero simili a cellule B della memoria. Inoltre queste cellule presentano resistenza ai farmaci chemioterapici caratteristica peculiare delle cellule staminali.

Tuttavia, questi risultati non sono ancora conclusivi: altri lavori sostengono che alcune plasmacellule tumorali (CD138+) siano in grado di proliferare ed hanno un elevato potenziale oncogeno [117,118]. Più recentemente, ulteriori studi si sono concentrati sulla definizione dell'immunofenotipo delle cellule staminali del MM [153-154-155]. La vera natura ed il fenotipo delle cellule staminali tumorali nel MM rimane poco chiara e controversa.

## OBIETTIVI DEL LAVORO

Il mieloma multiplo è una patologia complessa, molto eterogenea sia nella presentazione clinica che nella definizione della prognosi [16], con una sopravvivenza che va da pochi mesi fino a più di dieci anni. E' quindi di grande importanza l'individuazione di indicatori prognostici in grado di stimare l'esito clinico di ciascun paziente. La conoscenza di questi fattori è critica non solo per una migliore conoscenza della biologia del tumore, ma anche per lo sviluppo di strategie terapeutiche personalizzate in base al rischio individuale.

In prima istanza, questo lavoro si è proposto di analizzare il profilo di espressione di microRNA circolanti. Queste piccole molecole di RNA non codificante presenti nel plasma, potrebbero infatti costituire nuovi biomarcatori facilmente analizzabili che possono fornire informazioni sia riguardo alla biologia del MM che delle sue caratteristiche cliniche. L'intento è stato quello di ottimizzare una metodica per l'analisi di queste molecole in pazienti affetti da mieloma multiplo e di studiarne la correlazione con gli aspetti clinici noti più rilevanti della definizione prognostica della malattia, in particolare con lo sviluppo di lesioni ossee litiche.

In seguito sono stati analizzati campioni di sangue midollare e periferico di pazienti con malattia alla prima ricaduta allo scopo di studiare l'immunofenotipo caratteristico delle cellule tumorali e la loro evoluzione durante il trattamento terapeutico. In particolare abbiamo cercato di valutare la malattia minima residua mediante citofluorimetria multiparametrica. Inoltre, nel sangue periferico dei pazienti in trattamento abbiamo studiato la presenza di popolazioni cellulari con attività immunomodulante per cercare eventuali effetti sulla risposta al trattamento.

Si è inoltre cercato di studiare le caratteristiche di cellule staminali tumorali che potessero costituire il serbatoio proliferante e resistente alla terapia per il mieloma multiplo.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Analisi di microRNA circolanti

#### 3.1.1 Pazienti

Per lo studio dei microRNA circolanti sono stati analizzati campioni alla diagnosi di 47 pazienti affetti da mieloma multiplo, con età compresa tra i 39 e gli 80 anni (mediana 60 anni). Il gruppo di pazienti in studio è piuttosto eterogeneo dal punto di vista clinico, biologico, genetico e prognostico. La Tab.3.1 riassume le principali caratteristiche dei pazienti analizzati. Sono stati anche presi in esame anche i campioni di plasma di 10 donatori sani (età media 59 anni), utilizzati per analizzare le differenze di espressione tra sani e malati.

Età mediana 60 (39 - 87)			
Pazienti	No.	Pazienti	No.
Sesso		Catene leggere libere	
M	25	κ	30
F	22	λ	13
D&S		Iposecnerenti	
I	24	Non secernerenti	2
II	4	Smoldering	17
III	19	Citogenetica	
ISS		t(11;14)	7
I	29	t(4;14)	6
II	10	t(14;16)	2
III	7	del 13	11
Ig		del 17	2
IgG	27	Lesioni litiche	
IgA	11	Assenza di lesioni litiche	
			20

**Tab.3.1** Caratteristiche dei pazienti con MM alla diagnosi.

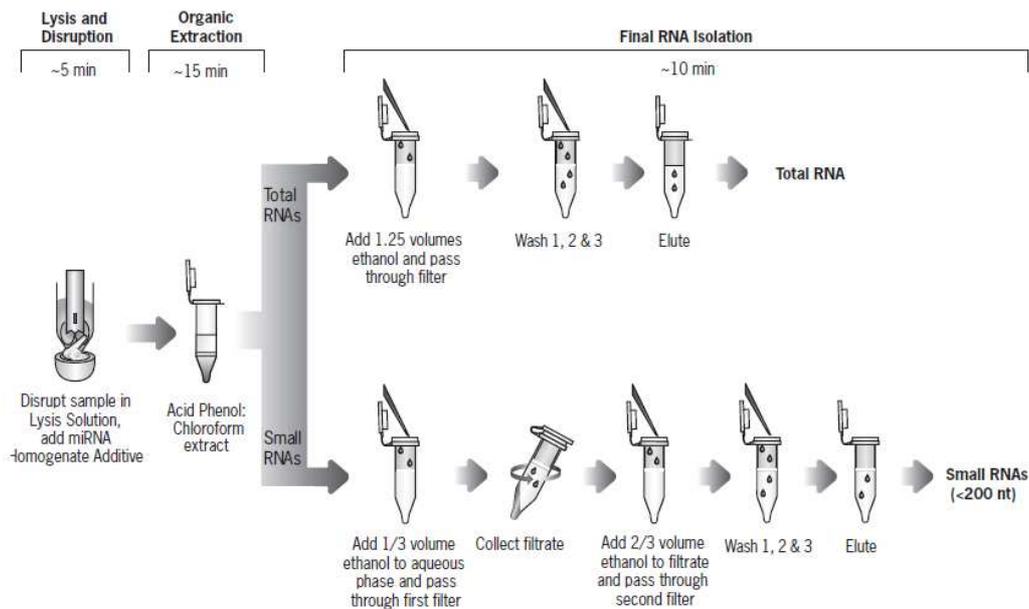
### **3.1.2 Separazione del plasma da sangue periferico**

I campioni di sangue periferico prelevati dai pazienti sono stati sottoposti a centrifugazione a temperatura ambiente per permettere la separazione del plasma dalla componente cellulare. Sono stati processati in provette BD Vacutainer<sup>®</sup>. Le provette contenenti il prelievo vengono centrifugate a 380g per 10 minuti. Il plasma raccolto viene aliquotato e conservato ad una temperatura di -80°C. Al momento di processarlo, il plasma viene scongelato a temperatura ambiente.

### **3.1.3 Estrazione di RNA da plasma**

Il kit miRvana associa la separazione con una soluzione di fenolo cloroformio e l'utilizzo i filtri in silice leganti l'RNA. L'estrazione viene effettuata a partire da aliquote di plasma di 500 µl. Al campione vengono inizialmente aggiunti 300 µl di soluzione lisante, contenenti detergenti e β-mercaptoetanololo. In seguito si aggiunge una soluzione omogeneizzante pari a 1/10 del volume del lisato. Il campione viene incubato 10 min in ghiaccio. Al termine dell'incubazione viene aggiunto un volume di soluzione di fenolo-cloroformio e si agita vigorosamente per omogeneizzare il campione. Si procede quindi alla separazione in fasi per centrifugazione per 5 minuti a 10000g a temperatura ambiente. Al termine della centrifugazione si preleva la fase acquosa e la si trasferisce in una nuova provetta. Il protocollo prevede a questo punto di scegliere se effettuare un'estrazione dell'RNA totale o ottenere un estratto contenente solo RNA di lunghezza inferiore a 200 nucleotidi. L'estrazione dell'RNA totale prevede l'aggiunta di 1,25 volumi di etanolo al 100% alla fase acquosa recuperata. La soluzione viene miscelata, caricata sull'apposita membrana legante l'RNA e centrifugato a 10000g per 30 secondi. Si elimina l'eluato e si procede al lavaggio del filtro. Al termine del lavaggio si lascia evaporare l'etanolo dal filtro e si eluisce il campione in 80 µl di acqua. La procedura per ottenere un eluato arricchito di piccoli RNA prevede l'aggiunta alla fase acquosa recuperata di un volume di etanolo pari a 1/3 del volume della fase acquosa stessa. Dopo aver miscelato la soluzione, si carica sulla colonna e si centrifuga a 10000g per 30 secondi a temperatura ambiente. Si ottiene così un eluato purificato dalle

molecole di RNA totale che rimangono legate al filtro. All'eluato si aggiungono 2/3 del volume di etanolo al 100% e si procede con la filtrazione su una nuova colonna. Terminata la filtrazione, è necessario procedere con il lavaggio del filtro. Dopo il lavaggio è possibile eluire le corte molecole di RNA in 80ul di H<sub>2</sub>O priva di RNAsi.

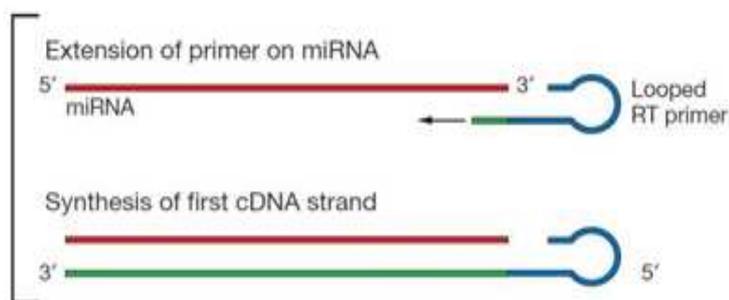


**Fig.3.1** Fasi di estrazione dei microRNA da plasma con il metodo miRvana®.

### 3.1.4 Retrotrascrizione

La reazione di retrotrascrizione consente di ottenere cDNA a partire da RNA utilizzando l'attività catalitica di DNA-polimerasi RNA-dipendenti, le retrotrascrittasi. Prevede l'utilizzo di oligonucleotidi particolari poiché la lunghezza del template, costituito dai microRNA, è molto ridotta (20-23 paia di basi) e non consente l'utilizzo degli oligonucleotidi generalmente utilizzati per la retrotrascrizione, di lunghezza pari a 15-20 paia di basi. Gli oligonucleotidi utilizzati per la retrotrascrizione dei microRNA formano ripiegamenti interni, definiti "loop", con un'estremità sporgente al 5'. L'oligonucleotide si appaia a un'estremità del microRNA e quest'ultimo funge da template per la retrotrascrizione del primo filamento. Il filamento di DNA complementare al microRNA funge da template per la trascrizione del secondo filamento di cDNA complementare al primo. Questo procedimento determina la presenza degli oligonucleotidi utilizzati per la retrotrascrizione all'interno delle molecole di

cDNA ottenute. La presenza di queste sequenze è fondamentale per le reazioni successive di PCR quantitativa poiché gli oligonucleotidi usati sono in parte complementari alle sequenze degli oligonucleotidi utilizzati durante la retrotrascrizione.



**Fig.3.2** Schema di amplificazione dei microNRA mediante “loop primers”.

#### **3.1.4.1 Retrotrascrizione con “Megaplex™RT Pool Primer”**

Il sistema di amplificazione Megaplex (Applied Biosystems) consente di amplificare simultaneamente 380 miRNA diversi con una miscela di oligonucleotidi specifici all'interno di una reazione di retrotrascrizione multipla. In un volume totale di 7.5 µl sono contenuti Reverse Transcription Buffer 1X, dNTPs 20mMoli, MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50 U, RNase Inhibitor 2 U, Megaplex™RT primers 1X, MgCl<sub>2</sub> e 3µl di RNA totale. I campioni vengono retrotrascritti tramite 40 cicli termici di tre fasi (16°C per 2 minuti, 42°C per 1 minuto e 50°C per 1 secondo) seguiti da una denaturazione dell'enzima a 85°C per 5 minuti.

#### **3.1.5 Preamplificazione**

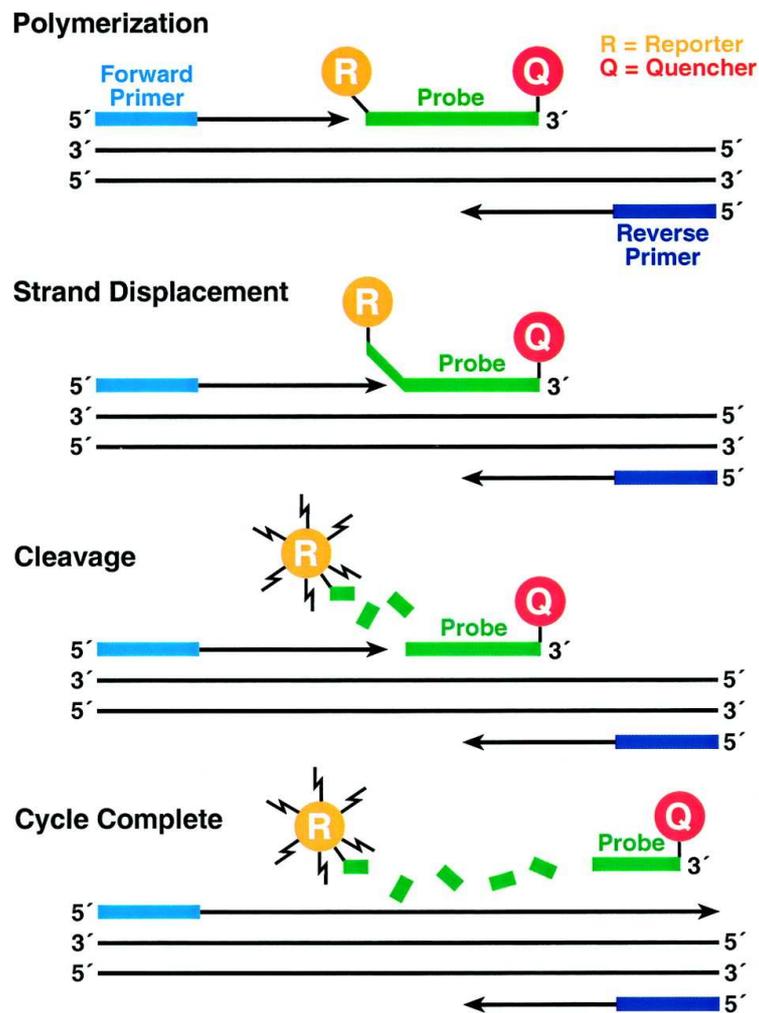
La reazione di preamplificazione ha lo scopo di aumentare la quantità di **templato** presente nel campione retrotrascritto, risulta perciò particolarmente utile nel caso in cui la quantità di microRNA contenuta sia particolarmente ridotta. La reazione consiste in una PCR di 12-14 cicli: il numero ridotto di cicli è necessario per non alterare il rapporto quantitativo tra i diversi microRNA presenti nel campione. Gli oligonucleotidi utilizzati per la preamplificazione sono

MegaPlex microRNA specifici. Nel volume finale di 25µl sono contenuti TaqMan®PreAmp Master Mix 1X, Megaplex™ PreAmp Primers 1X e 2.5 µl di cDNA (necessariamente retrotrascritto con oligonucleotidi Megaplex™). I cicli termici prevedono 10 minuti a 95°C, 2 minuti a 55°C , 2 minuti a 77°C, 95°C per 15 secondi e 60°C per 4 minuti per 12-14 cicli, ed infine 99.9°C per 10 minuti.

### **3.1.6 Real Time PCR**

A differenza della PCR tradizionale, la Real Time PCR (RT PCR) permette la quantificazione dell'amplificato man mano che esso si accumula durante la reazione attraverso la misurazione della fluorescenza emessa da particolari sonde. La fluorescenza emessa viene misurata ed espressa attraverso curve di amplificazione che permettono la quantificazione del template iniziale con alta precisione. Il segnale di fluorescenza, proporzionale alla quantità di template accumulata, è generato da sonde fluorescenti sequenza-specifiche, come le sonde TaqMan®, o da molecole fluorescenti che si intercalano alla doppia elica di DNA, SybrGreen®. In questo studio sono state utilizzate sonde TaqMan®MGB, costituite da oligonucleotidi in grado di appaiarsi al template in posizione compresa tra l'oligonucleotide senso e antisense. Le sonde presentano una molecola non fluorescente, definita "*quencher*", legata all'estremità 3', e una molecola "*reporter*" legata all'estremità 5'. Quando la sonda è integra non avviene emissione di fluorescenza in quanto, se eccitata dall'apposito laser dello strumento, l'energia emessa dal *reporter* al 5' viene totalmente assorbita dal *quencher* al 3'. In seguito, durante la polimerizzazione la sonda appaiata al template viene degradata dalla DNA polimerasi stessa: la degradazione della sonda allontana il *quencher* dal *reporter*. In questo modo quando il *reporter* viene eccitato dalla radiazione laser, la fluorescenza emessa non viene più assorbita dal *quencher* (che si trova ora ad una distanza troppo elevata) e viene misurata dallo strumento. La quantità di fluorescenza emessa dal campione è proporzionale alla quantità di *reporter* che emette fluorescenza e di conseguenza è un indice della quantità di prodotto accumulato. Le sonde utilizzate in questo caso presentano al 3' del *quencher* un MGB: *Minor Groove Binder*. Questa molecola ha la funzione di stabilizzare il legame della sonda al template, aumentandone la temperatura di *melting*. L'accumulo di prodotto

viene espresso da una curva di amplificazione che descrive l'andamento dell'intensità di fluorescenza ad ogni ciclo di amplificazione.



**Fig3.3** Amplificazione con il metodo *TaqMan Real Time*.

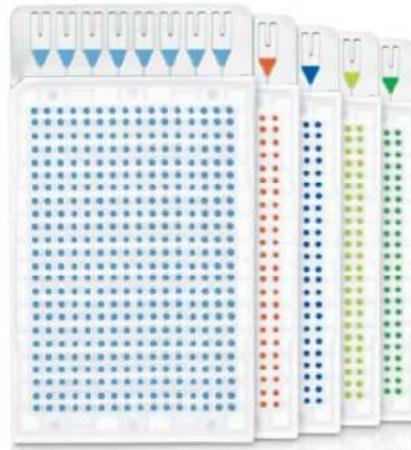
All'interno della curva si possono individuare tre fasi ben distinte: una fase esponenziale, in cui la quantità di prodotto raddoppia ad ogni ciclo di amplificazione, una fase lineare, in cui l'accumulo di prodotto inizia a rallentare poiché i reagenti vanno consumandosi, ed infine la fase di *plateau* in cui ormai tutto il prodotto è stato amplificato e la quantità di fluorescenza emessa non aumenta più. I dati vengono analizzati considerando la fase esponenziale della reazione, infatti, ad ogni ciclo di PCR il prodotto raddoppia e la quantità di target può essere espressa come  $2^n$ , dove n indica il numero di cicli di amplificazione effettuati. Vengono così determinati i tre parametri indispensabili per l'analisi

della reazione: *i*) linea di base (definita comunemente *Baseline*), *ii*) la soglia (o *Threshold*), *iii*) il ciclo soglia (o *Cycle of threshold*, Ct). La *baseline* indica il livello di fluorescenza emessa non specifica, ovvero determinata dalla presenza di rumore di fondo e non dalla reazione di amplificazione stessa; la *baseline* può essere impostata automaticamente dal *software* di analisi per ogni pozzetto, oppure può essere impostata manualmente dall'operatore, a seconda delle esigenze. La *threshold* indica invece il livello minimo di fluorescenza specifica, ed è un parametro molto importante in quanto permette di determinare il ciclo soglia; la *threshold* viene posizionata automaticamente dal *software* o anche in questo caso può essere determinata manualmente dall'utente. La *threshold* viene posizionata in corrispondenza dell'inizio della fase esponenziale, quando l'intensità di fluorescenza indica l'accumulo di prodotto specifico. Definendo la *threshold* si definisce quindi anche il Ct per ogni campione, ovvero il ciclo di PCR in cui la fluorescenza accumulata raggiunge la soglia di fluorescenza specifica, non quella accumulata come rumore di fondo ma quella derivata dall'accumulo specifico di prodotto.

La quantificazione del template viene calcolata trasformando il valore di Ct di ogni miRNA nel corrispondente valore di espressione di  $2^{-Ct}$ .

#### **3.1.6.1 TaqMan® MicroRNA Arrays (Applied Biosystems)**

Il sistema TaqMan® MicroRNA Arrays (Applied Biosystems) è costituito da piastre da 384 pozzetti al cui interno sono contenuti gli oligonucleotidi e la sonda TaqMan specifica per un singolo microRNA (Fig.). In un'unica reazione è pertanto possibile analizzare l'espressione di 381 miRNA differenti e di 3 miRNA nucleolari (RNU48, RNU6, RNU44) utilizzati come controlli endogeni della reazione. La miscela contenente *TaqMan® Universal Master Mix* e il prodotto di preamplificazione viene caricato sulla "card" da 384 pozzetti. La "card" contiene 8 porte ognuna della quali viene caricata con 100 µl di miscela contenente il campione. In totale vengono perciò caricato 800µl.



**Fig.3.4** Cards microfluidiche per l'amplificazione dei miRNA con tecnologia TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Arrays, Applied Biosystems.

Si procede poi alla centrifugazione delle *cards* per 2 minuti a 1200g per far depositare il campione in ciascun pozzetto. Terminata la centrifugazione, la card viene sigillata e preparata per essere caricata su *ABI Prism HT7900* per la reazione di PCR quantitativa. Dopo la denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti, vengono effettuati 40 cicli di amplificazione a 95°C per 15 secondi e 60°C per 60 secondi.

### **3.1.7 Software di analisi**

I dati relativi alle reazioni di amplificazione quantitativa sono stati analizzati con il software *AbiPrism SDS2.1* fornito da Applied Biosystems. I valori di Ct risultati superiori a 35 in almeno il 75% dei pazienti sono stati esclusi dalle successive analisi. I dati selezionati sono stati normalizzati calcolando i ratio (rapporti reciproci) tra i vari miRNA.

I risultati ottenuti sono stati processati con Microsoft Excel e rappresentati mediante l'utilizzo di grafici creati con il programma *Graph Pad Prism* e con il programma R (*R Development Core Team, 2008*), utilizzato anche per le successive analisi statistiche.

### 3.1.8 Analisi statistica dei dati

I dati ottenuti in seguito alla procedura di amplificazione mediante cards microfluidiche di 384 microRNA sono stati riportati in grafici che mostrano i livelli di espressione di microRNA.

È stata effettuata una *Cluster Analysis Unsupervised* sui valori  $2^{-Ct}$  ottenuti dai campioni dei pazienti affetti da MM e dei donatori, per verificare la presenza di microRNA che potessero differenziare i sani dai malati e dividere i pazienti in gruppi distinti in base alla loro condizione clinica. L'analisi è stata poi ripetuta sui *ratio* dei miRNA estratti dai vari campioni. In seguito sono state effettuate delle indagini di *class comparison*, tramite test *t* di Student, per identificare differenze relative all'espressione di microRNA in due gruppi di pazienti, suddivisi sulla base di alcune caratteristiche cliniche comuni nel mieloma multiplo. Sono stati considerati statisticamente significativi i *ratios* che mostravano un FDR < 0,05.

### 3.1.9 Gruppi di classificazione dei pazienti per l'esecuzione di *class comparison*

I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi sulla base di aspetti clinici caratteristici del mieloma multiplo, per valutare l'associazione tra i profili di espressione dei microRNA e alcuni dei metodi classificativi più comuni noti per il MM.

Il primo criterio distingue i pazienti sulla base della produzione di componente monoclonale di isotipo IgG o IgA, le più comunemente espresse nel MM, e sulla base delle catene leggere prodotte, kappa ( $\kappa$ ) oppure lambda ( $\lambda$ ). In diversi studi, infatti, è stata dimostrata l'associazione tra alcuni isotipi d'immunoglobuline e il differente andamento clinico dei pazienti. In particolare l'isotipo IgA sembra comportarsi come fattore prognostico negativo indipendente, influenzando la sopravvivenza globale (OS *overall survival*) e la sopravvivenza priva di eventi avversi (EFS *event-free survival*) [119].

I pazienti sono stati divisi in seguito in base allo stadio di malattia definito secondo il Sistema di Stadiazione Internazionale (ISS), che si basa sui valori di  $\beta$ 2microglobulina e albumina. Con questa indagine si è cercato di individuare una correlazione tra lo stadio di malattia, definito grazie ad un sistema di stadiazione noto, orientato alla valutazione prognostica, e il profilo di

espressione dei microRNA di pazienti affetti da MM. Il primo gruppo comprende i pazienti allo stadio I, pertanto con valori di  $\beta$ 2microglobulina ed albumina normali, mentre il secondo gruppo include i pazienti agli stadi II e III con valori di  $\beta$ 2microglobulina anomali, superiori a 3,5mg/dl (Tab. 1.1) [6].

Infine i pazienti sono stati suddivisi rispetto alla presenza di lesioni ossee franche rilevate con le metodiche di imaging standard, per valutare la correlazione tra il profilo di espressione dei microRNA e l'attività della malattia ossea. Sono stati inclusi nel gruppo di pazienti con malattia ossea attiva tutti i pazienti che presentavano fratture patologiche conclamate e lesioni osteolitiche verificate con le immagini di radiologia convenzionale, secondo la definizione ufficiale del sistema di stadiazione di Durie-Salmon (vedi Tabella 1.1). Due dei pazienti inclusi presentavano immagini radiografiche definite dubbie dal radiologo esaminatore, caratterizzate da elevata rarefazione ossea, suggestive di infiltrazione patologica e meritevoli di indagini più approfondite. Per questi pazienti sono state prese in considerazione le immagini di RM, che documentavano un'infiltrazione diffusa ubiquitaria di malattia e marcata ipointensità in T1 con *enhancement* dopo iniezione di gadolinio, ritenute indicative di un carico di malattia importante e associata a un rischio di progressione aumentato rispetto ai pattern d'infiltrazione minima, focale o a sale e pepe [14]. Per questo motivo i pazienti sono stati inseriti nel gruppo dei soggetti con malattia attiva. Inoltre in un altro paziente che presentava indagini radiografiche suggestive, ma non conclamate, sono state documentate lesioni litiche alla TC; per l'elevata sensibilità della TC nell'identificazione di lesioni osteolitiche questo paziente è stato considerato appartenente al gruppo dei soggetti con malattia attiva [14]. Il gruppo di pazienti con lesioni ossee non attive include pazienti con radiografie negative o con sola manifesta riduzione del tenore calcico, e pattern di risonanza magnetica ritenuti a basso carico tumorale, ovvero i pattern di infiltrazione focale minima e a sale e pepe, pertanto non ancora meritevoli di trattamento [14].

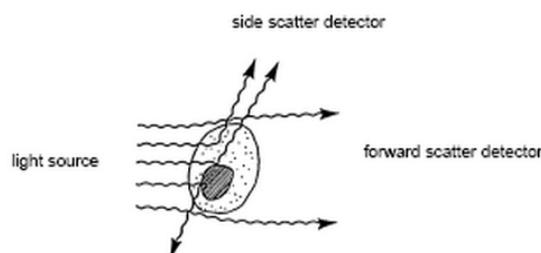
### 3.2 Citometria a flusso

La citometria a flusso è una tecnica che consente l'analisi automatica di sospensioni cellulari monodisperse, misurandone le caratteristiche fisiche e/o biochimiche all'interno di un flusso laminare che interseca una sorgente di eccitazione. Per svolgere le sue funzioni un citometro richiede: *i)* un sistema fluidico che convoglia le cellule al punto di misura, *ii)* un sistema ottico che genera e raccoglie segnali luminosi, *iii)* un sistema elettronico che converte i segnali ottici in proporzionali segnali elettrici per digitalizzarli ed analizzarli per mezzo di un computer, *iv)* un sistema software per l'analisi dei dati.

Il citometro a flusso esegue analisi statistiche su campioni di particelle microscopiche disperse in sospensione liquida, principalmente attraverso misure di tipo ottico sfruttando fenomeni di diffusione della luce (*scattering*) o di fluorescenza. La "cella a flusso" è uno speciale capillare realizzato solitamente in quarzo sintetico nel quale un apparato idropneumatico dedicato consente di ottenere un effetto caratteristico noto come "focalizzazione idrodinamica". Grazie ad esso le singole particelle in sospensione vengono forzate a fluire al centro del capillare stesso, idealmente contenute in un "tubo di flusso" in moto laminare (*core*) di dimensioni estremamente ridotte (tipicamente 5-20 nm).

Le particelle così disposte passano attraverso un raggio laser di forma ellittica. Il fascio di luce è focalizzato tramite l'ausilio di una lente.

Colpite dal laser, le cellule emettono diversi segnali di luce diffusa in base alle proprie caratteristiche fisiche e morfologiche. In particolare, la luce che attraversa la cellula (*Forward Scatter*) viene raccolta da un rilevatore posto a 180° dalla fonte della radiazione ed è correlata alle dimensioni e la forma della cellula, mentre la luce riflessa a 90° (*Side Scatter*) è da attribuire a parametri della morfologia cellulare come la granulosità del citoplasma (Fig.3.5).



**Fig. 3.5** Schema dei segnali di luce diffusa emessi dalle cellule: FSC e SSC.

I rilevatori ottici (fotomoltiplicatori, fotodiodi) trasformano i segnali elettronici analogici attraverso sensori optoelettronici dopo un opportuno condizionamento spettrale (filtraggio). Infine questi segnali sono digitalizzati e inviati all'unità di elaborazione dati che ha il compito di predisporli opportunamente per le analisi statistiche richieste dall'operatore e successivamente registrati in forma di *files*.

Il processo descritto sopra si svolge durante qualche microsecondo per ogni particella misurata, poiché la velocità con cui transita nel capillare è nell'ordine alcuni metri al secondo, mentre la sezione del fascio ottico illuminante ha le dimensioni che di solito non superano i 30 $\mu$ m.

Molte molecole a significato antigenico o recettoriale sulla membrana, nel citoplasma nel nucleo delle cellule possono essere messe in evidenza con ligandi fluorescenti o MoAb (anticorpi monoclonali). I MoAb sono marcati con fluorocromi quali per esempio: FITC, PE, APC ecc... Ogni fluoroforo presenta una caratteristica banda di lunghezza d'onda per l'eccitazione e una diversa per l'emissione.

Le radiazioni emesse dal laser eccitano gli atomi della sostanza fluorescente coniugata all'anticorpo e, in seguito all'assorbimento di energia, gli elettroni passano ad un livello energetico superiore per poi tornare al livello energetico originario liberando l'energia assorbita sotto forma di radiazioni elettromagnetiche aventi lunghezza d'onda maggiore rispetto alla radiazione incidente. La lunghezza d'onda della sorgente di eccitazione costituisce perciò un limite alla scelta dei fluorocromi da impiegare in una singola lettura.

Ci si deve inoltre accertare che le bande di emissione siano sufficientemente diverse tra loro in modo da poter essere facilmente separate con filtri ottici e misurate ciascuna da un proprio fotomoltiplicatore.

Sono stati utilizzati due citofluorimetri durante gli esperimenti. *MACSQuant<sup>TM</sup> Analyzer (Miltenyi Biotec)* dotato di tre laser (VIO 405nm, Blue 488nm, Red 635nm) ed è in grado di registrare l'emissione in sette canali di fluorescenza (Fig. 3.6).

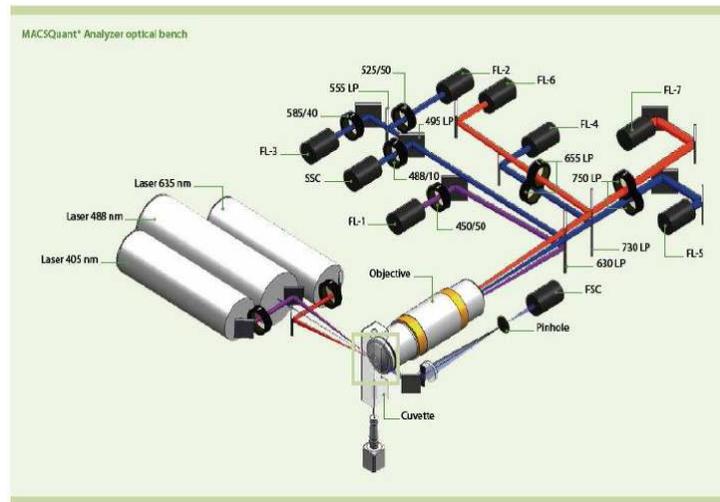


Fig. 3.6 Sistema ottico e canali di fluorescenza del MACSQuant™ Analyzer.

Il secondo strumento utilizzato è *BD FACSAria Special Order system* dotato di tre laser: Blue 488nm, Red 633nm, UV 355nm (Fig. 3.7)



Fig. 3.7 FACSAria Special Order System.

### 3.2.1 Identificazione citometrica delle plasmacellule neoplastiche nel mieloma multiplo

Direttamente dal sangue midollare si prelevano due aliquote da 100 µl l'una. Una di queste costituisce il controllo negativo, pertanto non viene marcata e viene utilizzata per individuare la popolazione presente nel campione sulla base delle sole caratteristiche fisiche. La restante aliquota viene marcata con anticorpi coniugati a 5 fluorocromi diversi per individuare le popolazioni d'interesse. La marcatura del campione di MM viene effettuata utilizzando un

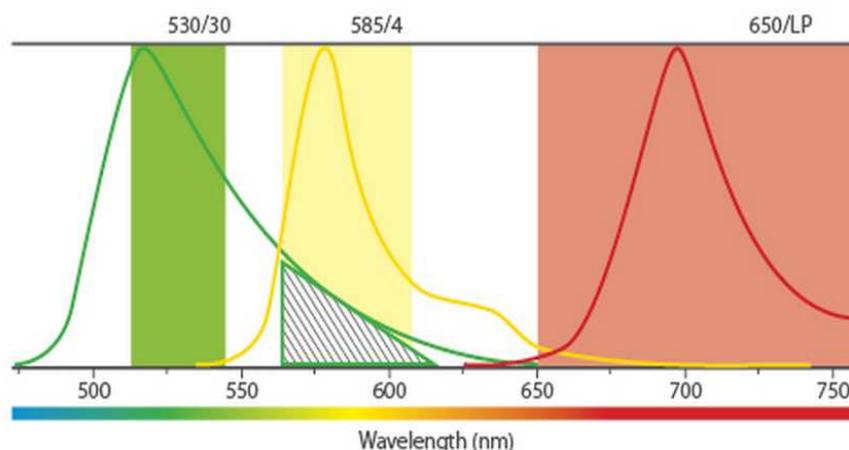
pannello di anticorpi che permette di individuare al meglio le plasmacellule tumorali. Sono stati utilizzati anticorpi monoclonali per i seguenti determinanti antigenici: CD38 FITC/CD138 PE/CD56 Pe-Cy-5/CD19 APC/CD45 VIOblue. Vengono aggiunti 10 µl di ogni anticorpo al campione tranne per l'anticorpo coniugato al fluorocromo APC di cui vengono ne vengono aggiunti 6 µl.

Dopo 20 minuti di incubazione a 4°C al buio, entrambi i preparati vengono incubati con 1ml di BD FACS *Lysis Solution* concentrato 1x che, grazie alle sue caratteristiche ipotoniche, permette di lisare i globuli rossi e di preservare i leucociti. Il tampone viene fornito ad una concentrazione 10x e deve essere diluito con H<sub>2</sub>O. La lisi ha una durata di 10 minuti e deve essere effettuata a temperatura ambiente e al buio per evitare che i fluorocromi coniugati agli anticorpi vengano danneggiati dalla luce. Dopo centrifugazione a 300xg per 5 minuti segue un lavaggio in 1 ml di PBS FACS (DPBS + 2% FBS), e una centrifuga a 300xg per 5 minuti. Rimosso il surnatante, le cellule vengono risospese in 200-400 µl di PBS FACS e mantenute a 4°C al buio fino alla lettura al citofluorimetro.

### **3.2.2 Compensazione**

Sebbene il sistema di lenti, specchi, filtri e l'attenzione posta nella selezione di fluorocromi con spettri di emissione separati, una parte di emissione propria di un fluorocromo, può essere inopportuna letta anche sugli altri canali, specialmente quelli di lunghezza d'onda simile.

Durante la lettura dei campioni è necessario quindi tener presente che l'emissione dei diversi fluorocromi si sovrappone in alcuni punti e che questo può alterare la positività o la negatività che una particolare sottopopolazione mostra per un certo antigene (Fig. 3.8).



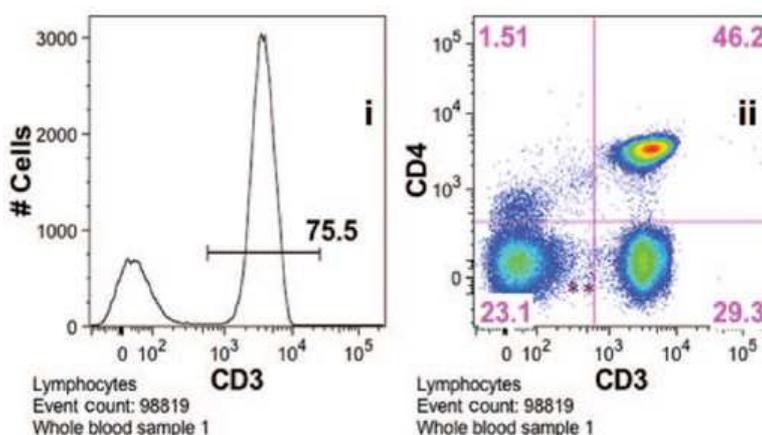
**Fig. 3.8** Un esempio della sovrapposizione che si può osservare tra le lunghezze d'onda di emissione dei fluorocromi FITC e PE. La fluorescenza rilevata in PE dovuta al FITC deve essere sottratta o compensata dal rilevatore di PE.

A questo scopo è necessario sottrarre da un certo canale una quota fissa di segnale relativo all'emissione di un altro fluorocromo e questo procedimento prende il nome di compensazione. Per il procedimento di compensazione sono state utilizzate le biglie BDTM CompBeads (BD Biosciences). Vengono impiegate due tipi di biglie: le BDTM CompBeads Anti mouse Ig, k che legano le catene leggere delle immunoglobuline murine e le BDTM CompBeads Negative Control (FBS) che non hanno capacità di legame nei confronti delle immunoglobuline. Si prepara un tubo da 5 ml per ogni fluorocromo che viene utilizzato nella lettura citofluorimetrica e un tubo come controllo negativo. A ogni tubo vengono aggiunti 100  $\mu$ l di PBS FACS (DPBS + 2% FBS), una goccia (circa 60  $\mu$ l) di BDTM CompBeads Negative Control e, tranne nel controllo negativo, una goccia di BDTM CompBeads Anti mouse Ig, k. Successivamente vengono aggiunti ai tubi corrispondenti 10  $\mu$ l di anticorpo coniugato ai seguenti fluorocromi: VioBlue, FITC, PE, PeCy5, APC. Segue un'incubazione di 20 minuti a temperatura ambiente al buio dopo la quale viene aggiunto 1 ml di PBS FACS a ogni tubo e viene effettuata una centrifugazione a 300xg per 5 minuti. Rimosso il surnatante, il pellet viene risospeso in 200  $\mu$ l di PBS FACS. Il citofluorimetro MACSQuant™ Analyzer è dotato della funzione di autocompensazione, perciò i campioni vengono letti al citofluorimetro che esegue automaticamente il bilanciamento delle fluorescenze. Viene quindi assegnata una matrice di compensazione che può essere applicata alla lettura

dei campioni e che può essere eventualmente modificata anche in fase di analisi.

### 3.2.3 Analisi citofluorimetrica

I dati ottenuti durante la lettura vengono elaborati ed analizzati mediante l'utilizzo del programma MACSQuantify (*Miltenyi Biotec*). Tale applicazione consente di riprodurre il dato citofluorimetrico acquisito attraverso la creazione di istogrammi o rappresentazioni bidimensionali. L'istogramma riporta in ascissa l'intensità di fluorescenza e in ordinata il numero di cellule che esprimono o meno l'antigene; mentre le rappresentazioni bidimensionali, definite "dot plot", permettono di visualizzare la distribuzione delle varie popolazioni e di correlare più parametri tra loro (Fig 3.9).



**Fig. 3.9** Rappresentazione del dato citofluorimetrico attraverso istogramma (sinistra) e "dot plot" (destra).

Tramite l'analisi bidimensionale con *Forward* e *Side Scatter* è possibile visualizzare e selezionare popolazioni cellulari che presentano differenti parametri fisici, eliminare eventuali cellule morte o detriti cellulari, consentendo così di ottenere dati molto precisi. È poi possibile individuare le sottopopolazioni d'interesse sulla base degli antigeni espressi. Nello specifico, per escludere i detriti cellulari durante l'analisi delle plasmacellule tumorali, ci si è basati sui loro tipici parametri di *scattering* secondo metodiche affermate descritte in letteratura [126]

### **3.3 Studio delle Cellule staminali di mieloma multiplo**

#### **3.3.1 Campioni**

In questo studio sono stati analizzati campioni di sangue midollare appartenenti a 18 pazienti affetti da Mieloma Multiplo: 13 in terapia, 5 alla diagnosi. Il gruppo di pazienti è eterogeneo per età e sesso: 13 maschi, 5 femmine, età media 60 anni.

In parallelo sono state studiate Linee cellulari di Mieloma Multiplo: LP-1, KMS-12 BM, ARH 77. Queste sono state messe in coltura con *medium* composto da RPMI + 10% FBS ed incubate a 37°C con 5 % di CO<sub>2</sub>.

#### **3.3.2 Separazione delle plasmacellule CD138+**

Il metodo MACS (Magnetic Activated Cell Sorter, Miltenyi Biotec) permette di separare le cellule esprimenti un antigene specifico dalle restanti cellule presenti nel campione attraverso microsfere coniugate con anticorpi monoclonali. Le microsfere CD138 possono essere utilizzate per isolare o depletare le plasmacellule umane. L'antigene CD138 è espresso su plasmacellule normali o maligne, ma non sulle cellule B circolanti, cellule T, granulociti e monociti. Per la separazione, le cellule sono marcate magneticamente con le microsfere e separate su una colonna posta in un campo magnetico con separatore MACS (*Miltenyi Biotec*). Le cellule CD138 marcate sono trattenute nella colonna, quelle non marcate, invece, defluiscono da essa. Dopo la rimozione della colonna dal campo magnetico, le cellule possono essere raccolte. Il campione di sangue midollare viene centrifugato a 300 x g ad una temperatura di 4°C per 10 minuti, separando e poi eliminando il plasma. Al termine dell'incubazione si aggiungono 10ml di buffer freddo e si centrifuga a 300 x g per 10 minuti.

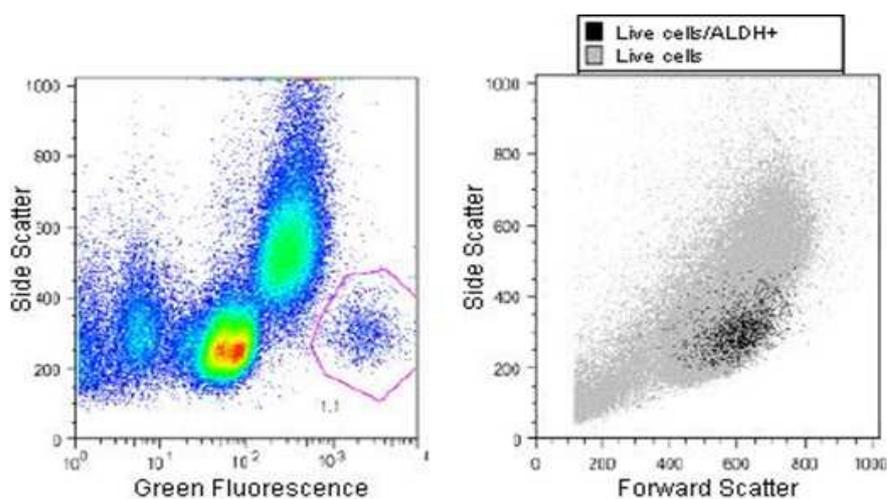
Il pellet viene risospeso in 3 ml di running buffer e viene eseguita la doppia selezione positiva secondo il procedimento "possel-d2".

#### **3.3.3 ALDEFLUOR<sup>®</sup> Assay**

L'ALDEFLUOR<sup>®</sup> Assay (*Stem Cell Technologies*) è un saggio non immunologico per l'identificazione le cellule staminali/progenitrici sulla base dei livelli intracellulari dell'enzima aldeide deidrogenasi 1A1.

L'aldeide deidrogenasi citosolica (ALDH1A1) è una proteina citosolica che catalizza l'ossidazione di molteplici aldeidi intracellulari in acidi carbossilici ed è coinvolto in diverse vie metaboliche cellulari. E' dimostrato che nelle cellule staminali è presente un livello elevato di quest'enzima, probabilmente è correlato al sistema di detossificazione della cellula e si pensa essere in parte responsabile della resistenza ai farmaci [110].

Tramite la citometria a flusso è possibile identificare quelle cellule che possiedono elevati livelli di ALDH funzionale. Questo risultato è ottenibile aggiungendo un substrato che in presenza dell'enzima viene convertito per formare un prodotto fluorescente (Fig. 3.10)



**Fig 3.10** Analisi citofluorimetrica delle cellule positive al saggio Aldefluor.

Potenzialmente si può associare la visualizzazione delle cellule Aldefluor positive con l'utilizzo di anticorpi coniugati con molecole fluorescenti per caratterizzare al meglio le popolazioni cellulari indagate.

Il substrato sintetico dell'aldeide deidrogenasi utilizzato nel kit ALDEFLUOR<sup>®</sup> viene fornito in forma inattiva (BODIPY<sup>®</sup> - aminoacetaldeide - dietil acetato, BAAA-DA) e deve essere quindi convertito nel substrato attivo (BODIPY<sup>®</sup> - amino acetaldeide, BAAA). Per fare ciò si aggiungono 25 µl di DMSO (Dimetil Solfossido) al reagente inattivo e si lascia in incubazione per un minuto a temperatura ambiente. Segue una reazione di idrogenazione con l'aggiunta di 25 µl di 2NHCl ed un'ulteriore incubazione per 15 minuti. Terminata quest'ultima

incubazione vengono aggiunti 360 µl di ALDEFLUOR® Assay Buffer. Tale buffer contiene un inibitore dei trasportatori appartenenti alla famiglia degli ABC transporters i quali se attivi potrebbero causare l'estrusione del prodotto fluorescente dalle cellule. A questo punto il substrato può essere aliquotato e conservato a -20 °C.

Il saggio prevede la lettura citofluorimetrica di un test e di un controllo negativo. Le cellule sottoposte al saggio citofluorimetrico derivano da midollo osseo sottoposto a lisi con 10 ml di ammonio cloruro. L'incubazione della lisi viene effettuata per 10 minuti a temperatura ambiente. Segue una centrifuga a 300xg per 10 minuti.

Alle cellule da indagare precedentemente risospese in 1 ml di Assay buffer vengono aggiunti 5 µl di ALDEFLUOR attivato. Rapidamente si prelevano 500 µl del preparato e dopo averli trasferiti nel controllo negativo vengono incubati con 5 µl di dimetilaminobenzaldeide (DEAB). Il DEAB è in grado di inibire l'aldeide deidrogenasi.

Il test e il controllo negativo vengono incubati a 37°C per 45-60 minuti. Terminata l'incubazione si può effettuare la marcatura con gli anticorpi. Gli anticorpi aggiunti vengono incubati per 30 minuti al buio a temperatura ambiente. Al termine si esegue una centrifuga a 300xg per 5 minuti e il pellet viene risospeso in 500 µl di AssayBuffer.

I campione vengono preservati a 4 °C gradi al buio fino al momento della lettura al citofluorimetro.

Il prodotto fluorescente della reazione (BAA amino acetato) è eccitabile da un laser a 488 nm ed emette ad una lunghezza d'onda di 512 nm. Tale emissione è sovrapponibile allo spettro di emissione dell'isotiocianato di fluorescina (FITC).

#### **3.3.4 Compensazione ALDEFLUOR® Assay**

Il saggio Aldefluor è compatibile con le tecniche di immunofenotipizzazione, ma a causa della sovrapposizione spettrale del reagente con fluorocromi che vengono rilevati al di sotto dei 650 nm è opportuno utilizzare anticorpi coniugati a fluorocromi che emettono lunghezze d'onda più elevate come per esempio APC.

Nel caso in cui si vogliono utilizzare fluorocromi a lunghezza d'onda inferiore è opportuno eseguire una compensazione specifica. Il test di controllo necessario per definire le popolazioni negative al saggio possiede anch'esso un' elevata fluorescenza in FITC, per questo motivo è stata effettuata una compensazione su sangue periferico trattato con il reagente Aldefluor inibito. In questo modo è stato possibile creare una compensazione basata sull'elevata fluorescenza in FITC che ha permesso la marcatura delle cellule con 5 fluorocromi diversi. La procedura di compensazione ha previsto la preparazione di 7 tubi contenenti ciascuno un milione di cellule derivate dalla lisi di sangue periferico. Ogni aliquota cellulare è stata trattata con il reagente Aldefluor e con l'inibitore e in seguito è stata incubata ognuna con un anticorpo diverso. Nel primo tubo non è stato aggiunto alcun anticorpo, nei restanti 6 sono stati aggiunti rispettivamente 10 µl di CD3 FITC, CD45 VIO, CD45PE CD5 PerCP, CD3 Pe-Cy 7 e 6 µl di CD4 APC. Aggiunti gli anticorpi è seguita un'incubazione di 20 minuti a 4°C al buio. Terminata l'incubazione è stato aggiunto 1 ml di PBS FACS a ogni tubo ed è stata effettuata una centrifugazione a 300 x g per 5 minuti. Rimosso il surnatante, i pellet sono stati risospesi in 200 µl di PBS FACS. A questo punto i tubi contenenti cellule di sangue periferico marcati con anticorpi differenti sono stati sottoposti alla funzione di autocompensazione del MACSQuant™ Analyzer.

Il citofluorimetro ha eseguito un bilanciamento delle fluorescenze dei fluorocromi basandosi sull'elevata fluorescenza del FITC conferita dal saggio Aldefluor. La matrice di compensazione assegnata e applicata alla lettura dei campioni è stata in seguito modificata e adattata alle caratteristiche di ogni campione in fase di analisi.

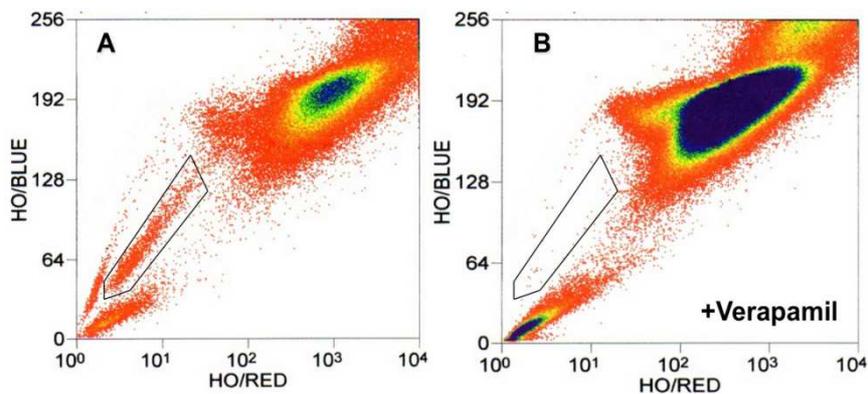
### **3.3.5 Side population**

In citometria a flusso una *side population* (SP) è una popolazione sub-laterale di cellule che è distinta dalla popolazione principale sulla base degli indicatori impiegati.

Per definizione le cellule di una *side population* si distinguono per le loro caratteristiche biologiche, ad esempio possono presentare caratteristiche di staminalità, ma la natura esatta di questa distinzione dipende dai marcatori utilizzati. Le cellule staminali possono essere identificate grazie alla loro

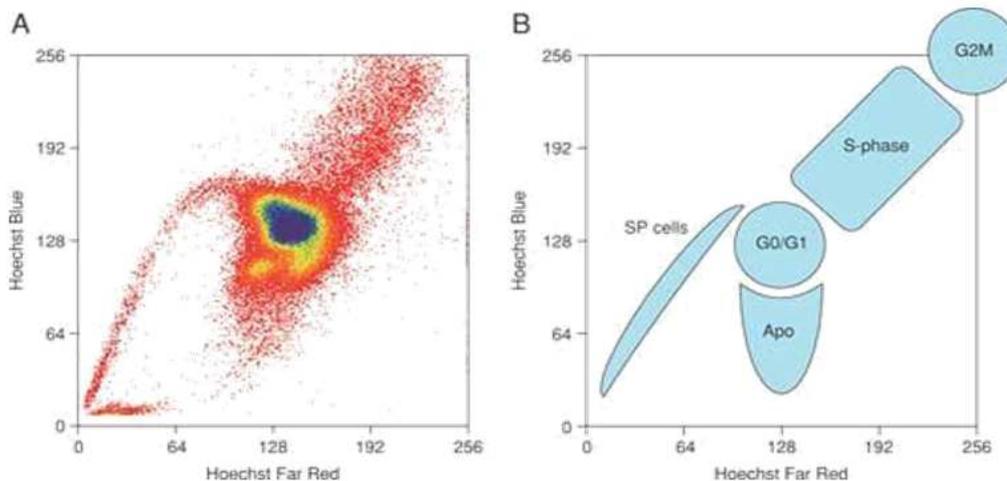
capacità di espellere un colorante, l'Hoechst. L'Hoechst 33342 è un bis-benzimide molto lipofilico, in grado di attraversare la membrana cellulare intatta e di legarsi al DNA, preferenzialmente in zone ricche in AT. Il colorante è eccitato da lunghezze d'onda UV (l'eccitazione massima è di 395nm) ed emette sia nel blu a 424/44 nm sia nel rosso 622/30 nm. In tutti i tessuti le cellule vengono colorate in maniera omogenea con Hoechst, fatta salva una piccola "coda" di cellule con caratteristiche di staminalità dotate di fenotipo MRD (*multidrug resistance*). Il fenotipo MRD è associato ad un aumentato efflusso di farmaci dalle cellule mediato da trasportatori ABC (ATP-Binding cassette). Questi trasportatori, nelle cellule umane, comprendono la p-glicoproteina e ABCG2. La presenza delle pompe determina l'estrusione, oltre che di farmaci genotossici, anche di coloranti come l'Hoechst 33342 [109].

Questi trasportatori possono essere specificatamente inibiti da agenti come Verapamil e Reserpina. Confrontando la distribuzione nei canali di emissione dell'Hoechst delle cellule trattate con gli inibitori rispetto a quelle non trattate è possibile identificare la regione delle cellule che costituiscono la *side population* (Fig. 3.11).



**Fig. 3.11** *Side population*. Gli inibitori dei trasportatori ABC permettono di identificare con precisione le cellule in grado di estrudere il colorante Hoechst.

Il colorante Hoechst grazie alle sue capacità di attraversare le membrane intatte delle cellule e di legarsi al DNA può essere utilizzato in citofluorimetria per indagare e studiare il ciclo cellulare (Fig. 3.12).



**Fig. 3.12** Il colorante Hoechst è in grado di legarsi al DNA di cellule vitali. Grazie a questa sua proprietà è possibile studiare il ciclo cellulare. Nel citogramma a destra è mostrata la disposizione delle popolazioni cellulari in tutte le fasi del ciclo.

### 3.3.6 Preparazione dei campioni per la lettura della SP

Dopo il processamento del campione (cellule di linee cellulari o di aspirato midollare) si preparano due aliquote (entrambe contenenti lo stesso numero di cellule) che saranno rispettivamente il campione colorato con Hoechst ed il campione inibito da Verapamil. Le cellule devono essere risospese in DMEM + 2% FBS preriscaldato a 37°C ad una concentrazione di 2 milioni/ml. Si effettuano due lavaggi con centrifugata a 1500 rpm.

Ad uno dei due campioni si aggiunge il Verapamil. Questo viene preparato a partire da una soluzione concentrata 2,5mg/ml che deve essere diluita 1:50 direttamente nel campione. All' aliquota di cellule trattate con Verapamil si aggiunge un pari volume di DMEM 2% FBS. I campioni con e senza verapamil vengono incubati a 37°C per 10 minuti. A questo punto, ad entrambi i campioni si aggiunge un volume di Hoechst tale da ottenere una concentrazione finale di 5 µg/ml di colorante in ogni campione.

Una volta aggiunto il colorante, si procede all'incubazione delle cellule per 90 minuti, ad una temperatura di 37°C al buio (per evitare il danneggiamento della fluorescenza del colorante). Durante l'incubazione è raccomandato agitare di tanto in tanto i campioni. Al termine dell'incubazione si centrifugano i campioni per 5 minuti a 1500 rpm a 4°C. Seguono due lavaggi con PBS freddo.

Fino al momento della lettura i campioni devono essere assolutamente conservati in ghiaccio. Prima dell'analisi si aggiunge ioduro di propidio (PI) per

valutare la mortalità cellulare. Ad entrambi i campioni si aggiunge una concentrazione di PI pari a 2µg/ml.

### **3.3.7 Valutazione della mortalità cellulare**

Il colorante PI (ioduro di propidio) utilizzato in citofluorimetria è in grado di intercalarsi al DNA e, quando eccitato a 488 nm, emette un picco di fluorescenza a 615-620 nm e penetra solo le cellule morenti che presentano un'alterazione nella permeabilità di membrana. Durante la fase di analisi il suo utilizzo consente di valutare quindi il tasso di mortalità cellulare del campione.

La fluorescenza del PI può essere rilevata in due canali, quello del rosso e del giallo, che rispettivamente corrispondono ai canali utilizzati per la rilevazione della fluorescenza dei fluorocromi PE-Cy5 e PE.

## **3.4 Pazienti con MM ricaduto/refrattario**

La casistica di pazienti con mieloma multiplo ricaduto/refrattario in studio comprende 100 pazienti con età variabile tra 41 e 75 anni (mediana = 65) (Tab. 3.2). Questi pazienti hanno ricevuto precedentemente una linea di terapia che, a seconda dell'indicazione terapeutica e dell'andamento, che prevedeva l'impiego di un agente chemioterapico, dell'inibitore del proteasoma bortezomib o di agenti immunomodulanti quali la talidomide e la lenalidomide in associazione a corticosteroidi. Inoltre, molti dei pazienti in studio hanno ricevuto un trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche. In particolare, 44 pazienti hanno effettuato come trattamento di prima linea una terapia con bortezomib e desametasone, e di questi 6 hanno avuto in aggiunta anche la talidomide; 10 pazienti hanno effettuato terapia con lenalidomide e desametasone; 21 pazienti hanno invece ricevuto in precedenza farmaci chemioterapici quali vincristina e adriamicina; 23 soggetti sono stati precedentemente trattati con talidomide.

Pazienti	N°
sesso	
Maschi	55
Femmine	45
isotipo	
IgG	68 (47 k; 16 λ)
IgA	17 (6 k; 8 λ)
IgD	2 (2 λ)
micromolecolare	3 (1 k; 1 λ)
stadiazione ISS	
1	29
2	17
3	7
stadiazione D & S	
I	12
II	16
III	12

**Tab. 3.2** Caratteristiche dei pazienti con MM ricaduto/refrattario.

Lo schema di trattamento per questi pazienti ha previsto la somministrazione in alternativa di bortezomib o lenalidomide, ciascuna in associazione a desametasone e ciclofosfamide (agente chemioterapico). I pazienti hanno ricevuto 3 cicli di trattamento, definiti di induzione, seguiti da una rivalutazione della malattia secondo i criteri IMWG (*International Myeloma Working Group*). Coloro che hanno ottenuto almeno una risposta parziale (una riduzione della componente monoclonale circolante di almeno 25%) hanno ricevuto tre ulteriori cicli di trattamento. Al termine di questi, una seconda rivalutazione è stata effettuata e i soggetti che hanno avuto almeno una risposta parziale sono stati sottoposti alla fase di consolidamento.

<b>VCD (bortezomib, ciclofosfamide, desametasone)</b>	
Bortezomib (Velcade <sup>®</sup> )	1,3mg/m <sup>2</sup> , e.v. nei giorni 1, 8, 15, 22
Ciclofosfamide (Enodxan <sup>®</sup> )	500 mg/m <sup>2</sup> , e.v. nei giorni 1 e 8
Desametasone (Soldesam <sup>®</sup> )	20 mg, p.o. nei giorni 1-2, 8-9, 15-16, 22-23.
Nella fase di induzione il VCD viene somministrato ogni 35 giorni	
Nella fase di consolidamento il VCD viene somministrato ogni 2 mesi, ovvero la durata del ciclo è di 35 giorni come nei cicli precedenti, seguito da un periodo di riposo di 25 giorni.	

<b>RCD (lenalidomide, ciclofosfamide, desametasone)</b>	
Lenalidomide (Revlimid <sup>®</sup> )	15 mg, p.o. dal giorno 1 al 21
Ciclofosfamide (Enodxan <sup>®</sup> )	500 mg/m <sup>2</sup> , e.v. nei giorni 1 e 8
Desametasone (Soldesam <sup>®</sup> )	20 mg, p.o. nei giorni 1-2, 8-9, 15-16, 22-23.
Nella fase di induzione il RCD viene somministrato ogni 28 giorni.	
Nella fase di consolidamento il RCD viene somministrato ogni 2 mesi, ovvero la durata del ciclo è di 28 giorni come nei cicli precedenti, seguito da un periodo di riposo di 32 giorni.	

**Tab. 3.4** Schemi di trattamento dei pazienti in studio.

### 3.4.1 Campioni biologici

Campioni di sangue periferico e midollare sono stati prelevati dai pazienti in studio prima dell'inizio del trattamento, dopo tre cicli di induzione, dopo 6 cicli di trattamento e dopo 9 cicli di trattamento (a meno che non abbiano interrotto il trattamento).

Per ciascun paziente, ad ognuna delle tempistiche analizzate, sono stati prelevati 20ml di sangue periferico ed un'aliquota è stata utilizzata per l'analisi citofluorimetrica. Aliquote di 100µl di sangue periferico (PB) sono state marcate con anticorpi fluorescinati diretti contro gli antigeni di superficie CD45, CD3, CD19, CD27, Anti-IgD, CD8, CD4, CD31, CD56, CD62L, HLA-DR, Lin, CD33, CD11b opportunamente raggruppati all'interno di ciascun tubo di analisi. Come controllo negativo è stata utilizzata un'aliquota di cellule di sangue periferico non marcate. Alle stesse tempistiche sono stati anche prelevati campioni di sangue midollare. Questi sono stati marcati con anticorpi diretti contro gli antigeni di superficie CD38, CD138, CD45, CD56, CD19, CD20, CD27, CD117, CD28. I campioni di sangue midollare sono stati anche analizzati con il saggio Aldefluor secondo il protocollo descritto nei precedenti paragrafi.

## 4. RISULTATI

### 4.1 MicroRNA circolanti

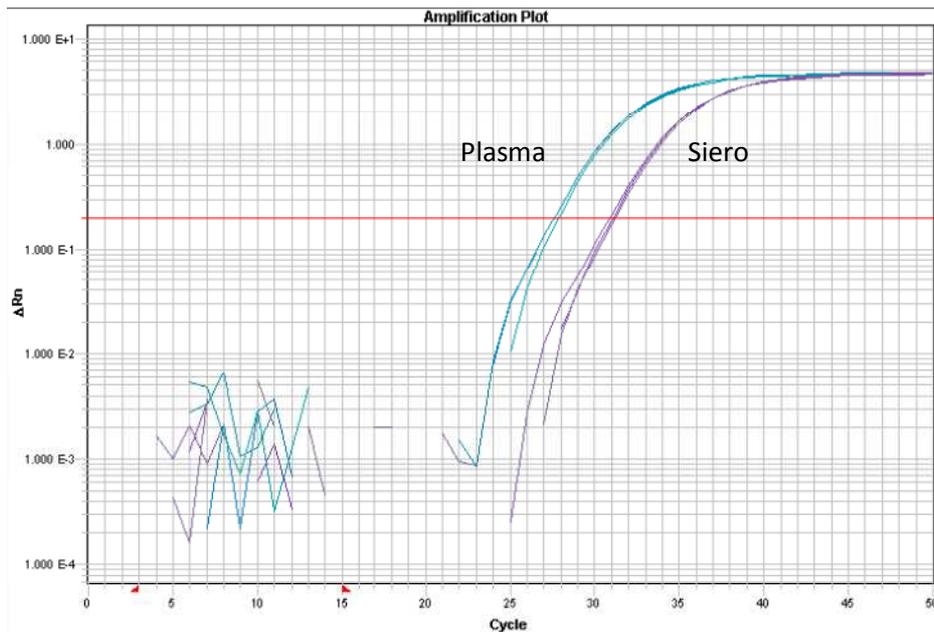
Dopo la scoperta dei miRNA circolanti nel 2008, diversi microRNA sono stati associati a diverse neoplasie, e alle loro caratteristiche di aggressività e prognosi. In questo studio è stato analizzato il profilo di espressione dei microRNA circolanti nel mieloma multiplo, al fine di ritrovare una correlazione tra questi e le caratteristiche clinico-prognostiche ed individuare nuovi biomarkers di attività della patologia.

#### 4.1.1 Estrazione di RNA da plasma

Il primo metodo da mettere a punto è stata l'estrazione di RNA da plasma di sangue periferico. Il plasma è stato ottenuto per centrifugazione dei campioni di sangue periferico in provette contenenti anticoagulante K3-EDTA prelevati da donatori o pazienti.

#### 4.1.2 Differenze tra plasma e siero

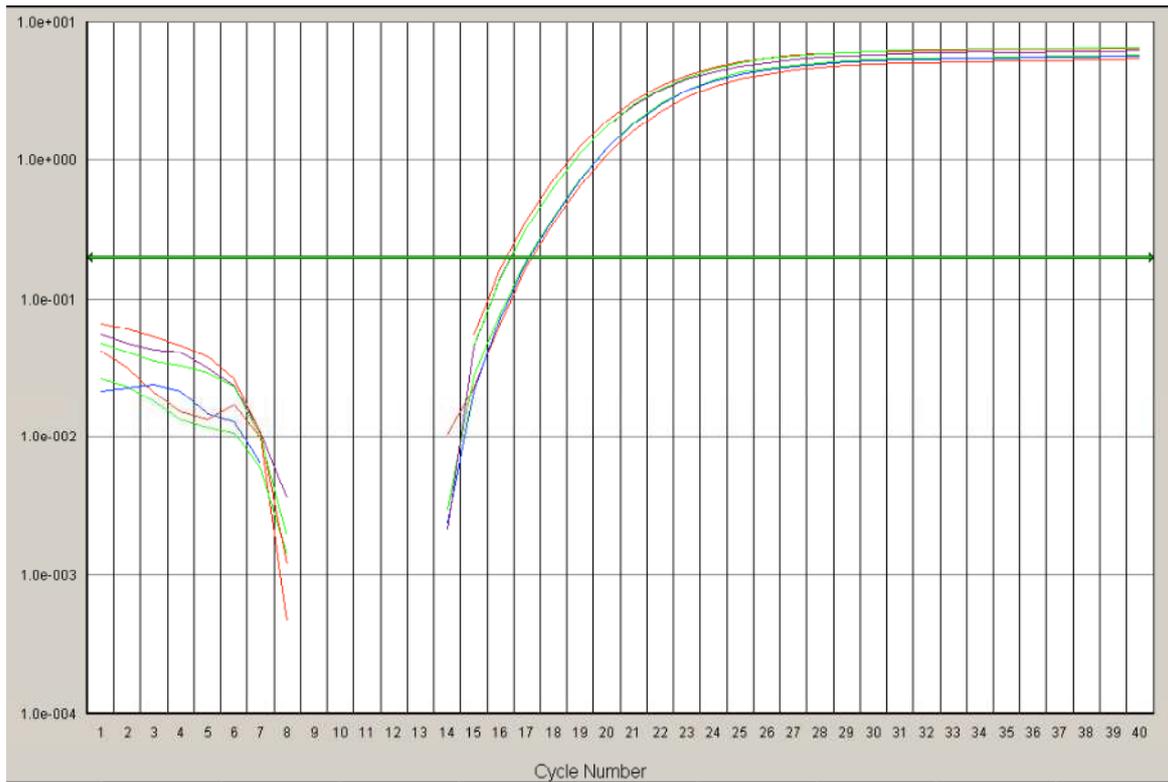
Studi di letteratura mostrano come sia possibile analizzare i miRNA circolanti sia a partire da plasma che da siero. Abbiamo pertanto innanzitutto valutato quale fosse il materiale di partenza con la migliore resa. Per comparare l'efficienza di estrazione e amplificazione dei miRNA estratti, sono stati prelevati uguali volumi iniziali di plasma e siero da un donatore sano. Utilizzando lo stesso protocollo di estrazione ed amplificazione si ottiene una differenza di 3 Ct tra plasma e siero (Fig. 4.1). I dati ottenuti indicano una maggiore efficienza nell'estrazione di microRNA da plasma rispetto al siero. Si è pertanto deciso di procedere con l'analisi del profilo di espressione di miRNA nel plasma di pazienti affetti da mieloma multiplo, rendendo in questo modo l'analisi eseguibile sul materiale rimanente dai prelievi routinari di analisi del sangue, riducendo al minimo l'invasività della procedura.



**Fig. 4.1** Differenza tra estrazione di microRNA da siero e da plasma. Si nota una maggiore efficienza di estrazione nel plasma rispetto al siero, poiché nel primo si ha un Ct inferiore.

#### 4.1.3 Ottimizzazione dell'estrazione

La metodica di estrazione utilizzata nello studio è quella basata sul kit mirVana™ (Ambion) che associa la separazione con soluzione di fenolo-cloroformio all'utilizzo di filtri in silice leganti l'RNA. Il kit mirVana™, come la maggior parte dei kit commerciali, è però ottimizzato per l'estrazione di RNA da tessuti e cellule, per cui si è reso necessario un processo di adattamento del protocollo per l'estrazione da plasma in modo da favorire le fasi successive di quantificazione e analisi. Il plasma è infatti caratterizzato da un alto contenuto proteico (3-7 g/dl) che influisce negativamente sulla procedura di estrazione, rendendola più difficoltosa. Per eliminare la componente proteica del plasma è stata effettuata la digestione con proteinasi K prima dell'estrazione per facilitare il rilascio dei microRNA (Fig. 4.2).



**Fig. 4.2** Curve di amplificazione di campioni estratti dopo incubazione con proteinasi K (sinistra) o meno(destra). Si può facilmente notare come l'adattamento del protocollo all'estrazione di RNA da plasma utilizzando la proteinasi K sia di aiuto per la liberazione dei microRNA dalla componente proteica. E' visibile una maggiore efficienza di amplificazione (un paio di cicli) quando si aggiunge il passaggio di incubazione con proteinasi K prima dell'estrazione.

A modifica del protocollo originale, è stato aggiunto un passaggio di trattamento con Sodio Dodecil Solfato (SDS) ed acido acetico che stimola la precipitazione delle proteine favorendo la liberazione dei miRNA e permettendo una migliore quantificazione in fase di analisi. L'aggiunta di acido acetico prima della separazione con fenolo cloroformio è giustificata dalla presenza di evidenze di letteratura [37] che mostrano come l'efficacia di estrazione aumenti con l'acidificazione del plasma che facilita la separazione dell'RNA dalle proteine. Per verificare l'effettivo miglioramento della resa rispetto al protocollo di estrazione classico e quello modificato con l'aggiunta di acido acetico, sono state estratte in parallelo due aliquote di plasma di un donatore sano. La curva di amplificazione relativa al campione a cui è stato aggiunto l'acido acetico mostra un Ct inferiore di due cicli rispetto all'altro, corrispondente ad una maggiore quantità di miR-16 ed indice di una migliore efficienza di estrazione.

#### **4.1.4 Quantificazione dell'RNA estratto**

Il campione ottenuto è quindi pronto per essere retrotrascritto e successivamente analizzato mediante PCR quantitativa per verificare il profilo di espressione dei miRNA circolanti. Al fine di avere indicazioni sull'efficienza dei protocolli di estrazione e sulla concentrazione necessaria per le successive analisi di amplificazione, si rende necessaria una quantificazione del prodotto estratto. Evidenze presenti in letteratura mostrano una correlazione del contenuto di microRNA del campione con la concentrazione di RNA totale. Nelle fasi preliminari di questo studio si è proceduto alla quantificazione utilizzando uno spettrofotometro. Le concentrazioni registrate sono risultate estremamente basse, vicine al limite di risoluzione dello strumento e pertanto poco attendibili. I campioni inoltre hanno mostrato un'elevata assorbanza nella lunghezza d'onda di 230 nm, suggerendo la presenza di contaminazione da sali e proteine. Come controllo positivo dell'efficienza di estrazione è stato utilizzato un campione di RNA estratto secondo il protocollo mirVana da cellule ottenute dopo separazione da sangue periferico. Data l'impossibilità di ottenere una misurazione sufficientemente precisa della concentrazione di RNA nei campioni, si è deciso di standardizzare il protocollo partendo da un volume fisso di plasma, 500µl. Le differenze di concentrazione che potrebbero esserci tra i diversi campioni di RNA vengono tenute in conto al momento dell'analisi dei dati derivati dall'amplificazione mediante Real Time PCR. Nel calcolo dell'espressione relativa, infatti, i dati ottenuti vengono normalizzati calcolando i rapporti (ratio) reciproci tra i vari microRNA, in modo da eliminare le differenze di quantificazione dovute a diverse concentrazioni di partenza.

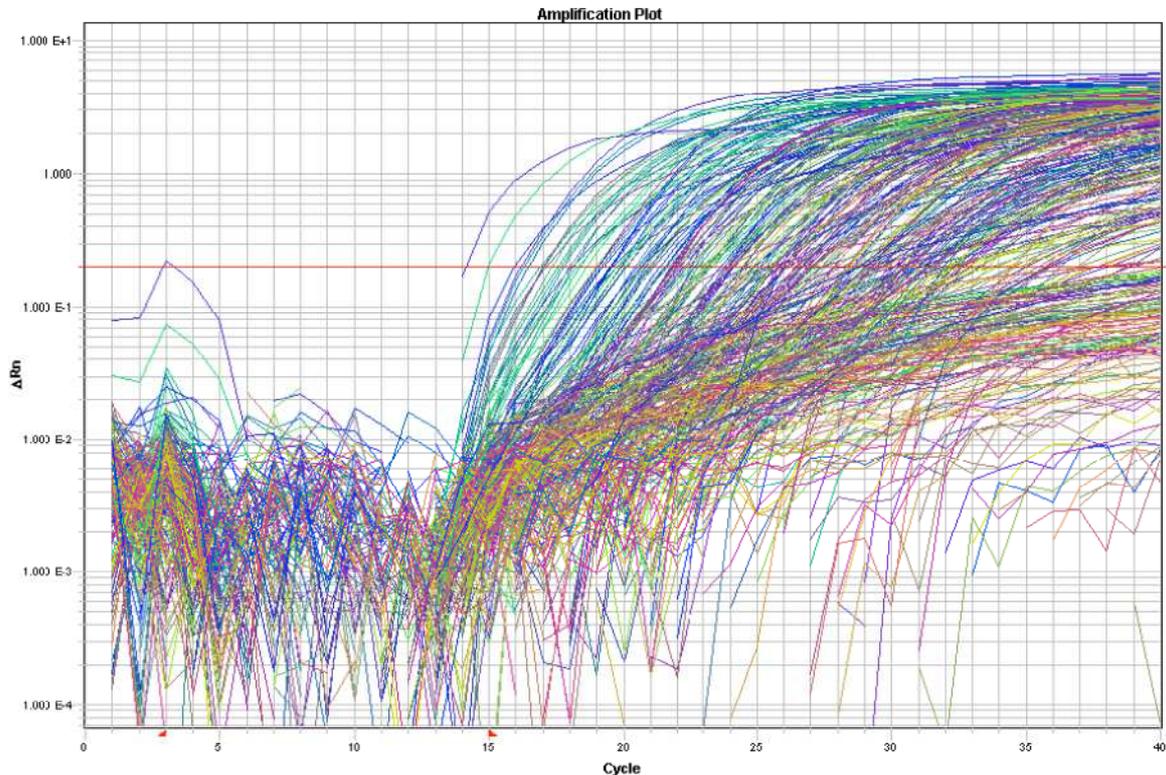
#### **4.1.5 Analisi del profilo di espressione mediante *cards* microfluidiche con tecnologia TaqMan**

L'utilizzo delle *cards* microfluidiche basate su tecnologia TaqMan di Applied Biosystems permette di analizzare contemporaneamente l'espressione di 384 miRNA in ogni campione di plasma analizzato

##### **4.1.5.1 *Cluster analysis***

Dalle prime analisi effettuate è possibile confermare i dati presenti in letteratura che mostrano la presenza stabile di microRNA in fluidi biologici, in

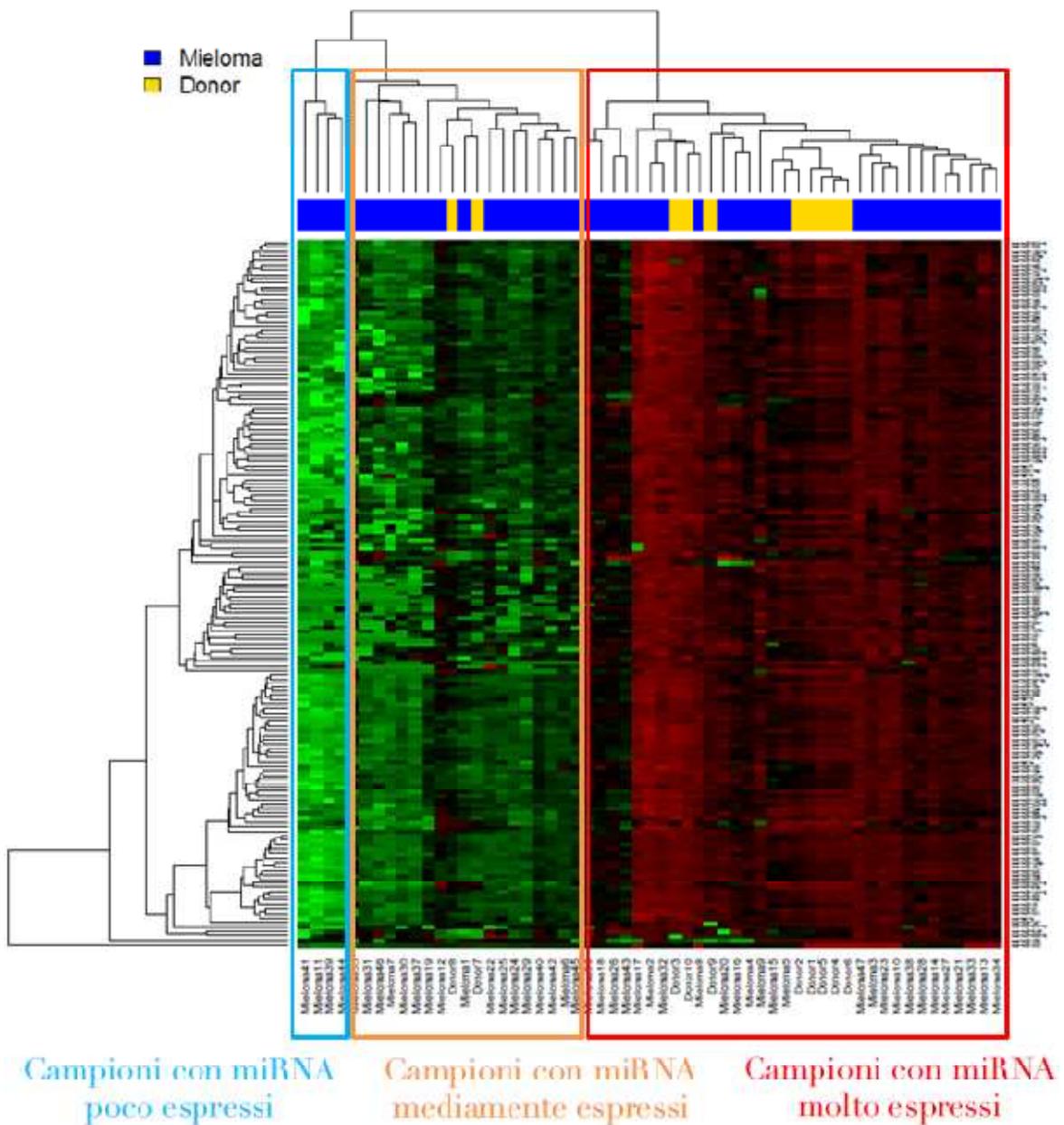
particolare nel plasma [38,39]. In fig. 4.3 si nota come, grazie ad una reazione di amplificazione in PCR quantitativa, è possibile identificarne la presenza nel plasma.



**Fig. 4.3** Curve di amplificazione in *Real Time PCR* di 384 microRNA mediante tecnologia Applied Biosystems con *cards* microfluidiche. Il software di analisi utilizzato è Abi Prism SDS2.2 fornito da Applied Biosystems.

I dati ottenuti dai campioni di 47 pazienti affetti da mieloma multiplo e di 10 donatori sani sono stati utilizzati per produrre una *cluster analysis*, con l'obiettivo di valutare la distribuzione dei soggetti sani e malati sulla base del profilo di espressione dei microRNA. E' stata effettuata un'analisi *unsupervised* (non supervisionata), in cui i dati dei pazienti sono stati inseriti singolarmente, senza specificare a priori le classi di appartenenza in cui suddividere i campioni. L'intento è di giungere, tramite quest'analisi, ad una *class discovery*, ovvero una suddivisione in gruppi (*cluster*) stabilita a posteriori sulla base delle somiglianze relative ai profili di espressione dei microRNA. E' stato utilizzato un algoritmo di *clustering* gerarchico, che considera ogni osservazione (in questo caso il valore di  $2^{-Ct}$  di ogni campione per uno specifico miRNA) come entità a sé stante e procede man mano all'incorporazione nel *cluster*, basandosi su due parametri: 1) metriche di similarità, che definiscono il metodo utilizzato per calcolare la

similità tra i diversi campioni (mediante il coefficiente di correlazione di Pearson); 2) regole di *linkage*, che indicano come unire tra di loro i diversi clusters per formare la struttura gerarchica finale (metodo *average*). La Fig. 4.4 ne mostra la rappresentazione grafica in raggruppamenti gerarchici ad albero (dendrogramma).



**Fig. 4.4** Heatmap e dendrogramma dei dati grezzi di espressione dei 384 miRNA analizzati.

Come si può notare, i dati grezzi hanno mostrato una notevole variabilità legata alla differente quantità di materiale di partenza. I gruppi che vengono a formarsi nella *cluster analysis* sembrano, infatti, suddividersi in base alla quantità di miRNA espresse, e non ad un differente profili di espressione di miRNA.

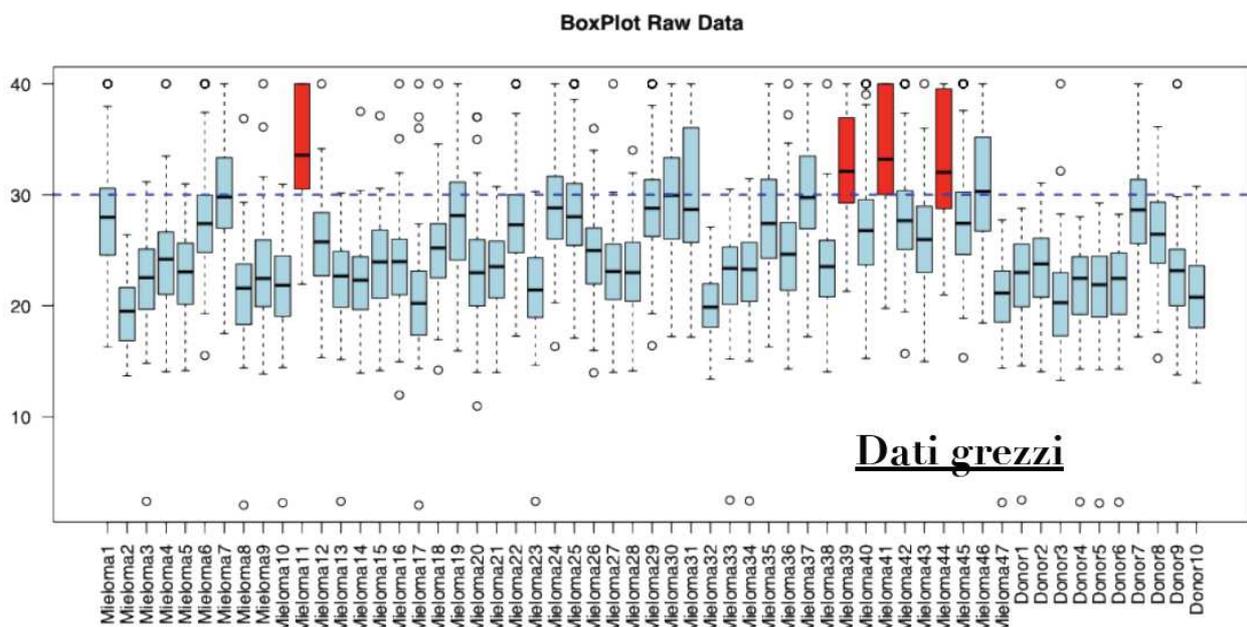
La problematica della quantificazione del materiale è determinata sia dalla differente quantità di RNA di partenza tra i campioni sia da problemi tecnici legati al metodo di amplificazione. La grande potenzialità delle *cards* microfluidiche è di consentire l'analisi contemporanea di un esteso pannello di miRNA in una singola reazione mediante l'uso di una tecnologia di facile utilizzo ed applicabile alla maggior parte dei laboratori. Il plasma, infatti, è ottenuto in seguito ad un semplice prelievo per emocromo: in tal modo è possibile evitare di sottoporre il paziente ad ulteriori indagini, anche invasive. Inoltre grazie a metodiche semplici, quali l'estrazione di acidi nucleici e la PCR quantitativa, è possibile analizzare il profilo di espressione dei miRNA dei pazienti in un lasso di tempo relativamente breve (circa 2 giorni per ottenere i risultati).

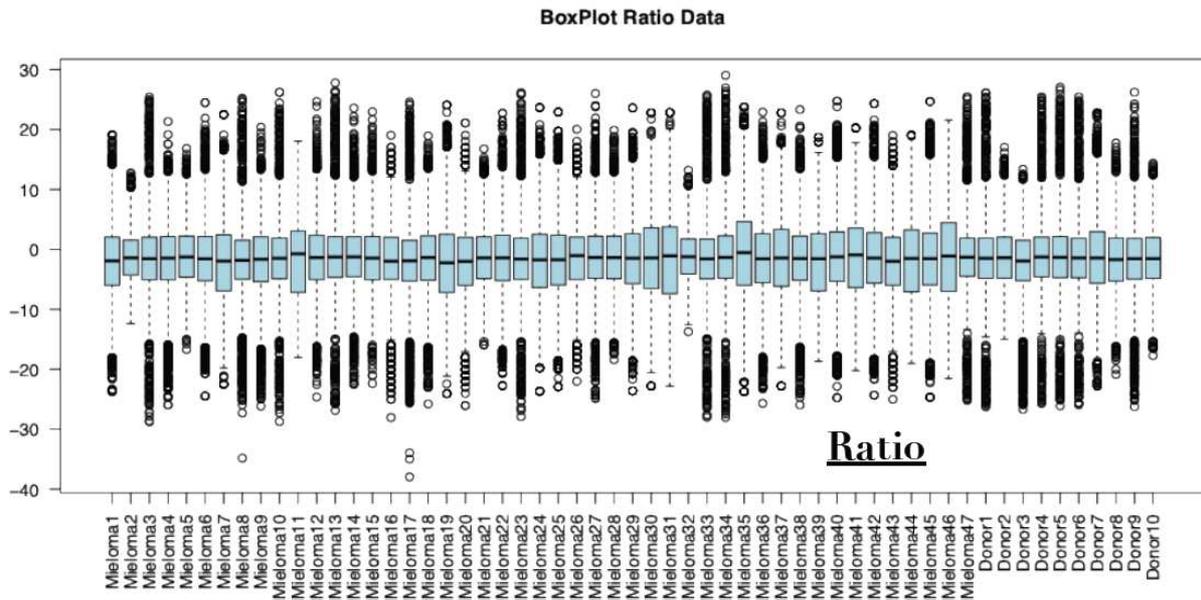
Permangono, tuttavia, delle limitazioni in questo sistema d'analisi. Un primo limite è costituito dalla mancanza di replicati tecnici, ovvero di coppie di primers presenti in più di un pozzetto all'interno della stessa *card*. Solamente un microRNA, infatti, è presente in quadruplicato (il miRNA di riferimento, definito *housekeeping*). Pertanto le *cards* microfluidiche mostrano un grande potenziale, ma il loro utilizzo è probabilmente limitato sono ad indagini preliminari e si rende necessaria una fase di validazione successiva mediante l'utilizzo di saggi singoli che possano analizzare i singoli miRNA con i loro replicati tecnici. In secondo luogo se presenta la problematica legata alle difficoltà nella quantificazione del materiale, come emerso in particolare a seguito della *cluster analysis*. Dato che non è possibile quantificare l'RNA presente in ogni campione, anche per i miRNA *housekeeping* (considerati di riferimento poiché si mantengono stabili tra i vari campioni) si può osservare una variabilità associata a fattori tecnici. Esistono, infatti, diversi fattori che possono influenzare l'analisi, tra cui in particolare la differente quantità di RA iniziale tra i diversi campioni e la disomogeneità nella deposizione del materiale sulla *card*.

Si è quindi reso necessario un metodo per la normalizzazione del dato che consenta di evitare una distorsione sistematica dell'analisi. Invece di utilizzare

un miRNA *housekeeping*, in questo caso si è deciso di utilizzare i rapporti reciproci (*ratio*) tra i vari miRNA, in cui ogni miRNA a turno assume la funzione di *housekeeping*.

I diagrammi a scatola (*box plot*) riportati qui di seguito forniscono una rappresentazione grafica della problematica relativa alla differente quantità dell'RNA estratto dai diversi campioni. Il diagramma a scatola mostra infatti graficamente la distribuzione e gli indici di dispersione dei valori di miRNA misurati nei diversi campioni. 1) Il primo riquadro mostra la distribuzione dei dati grezzi relativi ai miRNA nei vari soggetti. Si può notare che la distribuzione dei valori cambia molto tra i vari individui, a testimoniare una notevole differenza nella qualità di RNA presente in ogni campione. I campioni evidenziati in rosso sono quelli in cui, per la maggior parte dei miRNA analizzati (quasi tutti quelli superiori al primo quartile), la quantità di RNA è minima o assente (valori di Ct superiori a 30 cicli). 2) Il secondo riquadro, invece, mostra la distribuzione dei *ratio* nei vari campioni. Si riscontra immediatamente una maggiore omogeneità nella distribuzione dei campioni, che si assestano tutti su intervalli di valori simili. Questo grafico (Fig.4.5) consente di valutare l'efficacia del metodo di normalizzazione tramite *ratio*, che permette di eliminare il *bias* (errore sistematico) dovuto alla quantità di RNA di partenza.





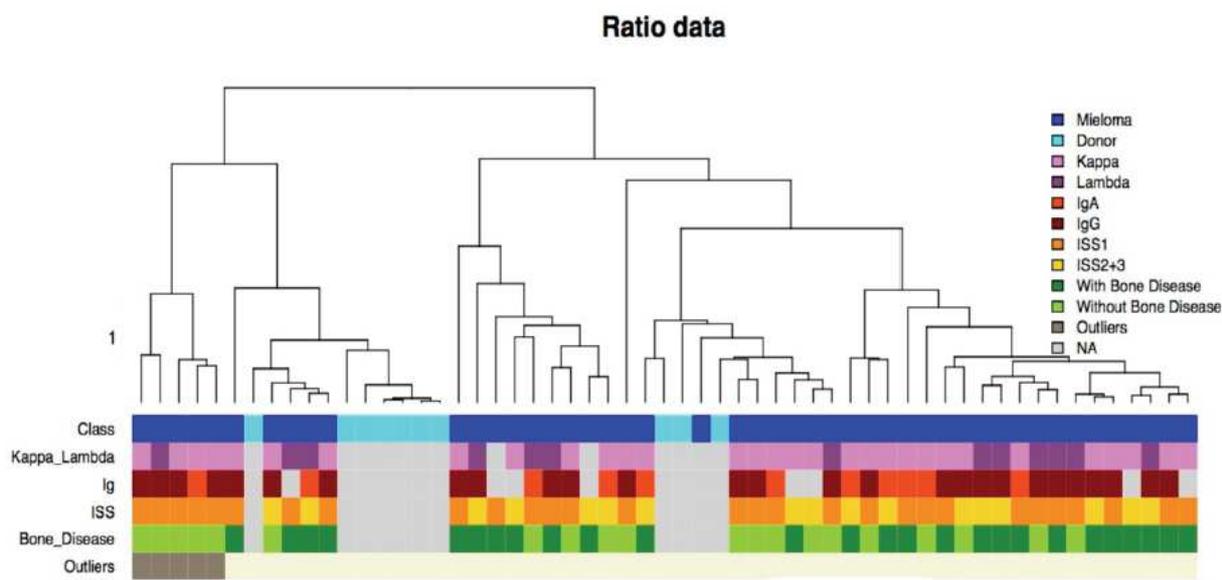
**Fig. 4.5** *Box Plot* raffiguranti la distribuzione dei dati grezzi e dei ratios dei vari miRNA nei diversi campioni.

Quindi la *cluster analysis* è stata effettuata successivamente si *ratios* (Fig.4.6). Infine per ciascun dendrogramma è stata calcolata la stabilità dei *clusters* ottenuti (rappresentata dai riquadri rossi). I *clusters* stabili riuniscono campioni simili sulla base del profilo di espressione dei miRNA.



L'utilizzo dei *ratios* ha consentito di raccogliere i dati in un dendrogramma all'interno del quale sono stati identificati dei *clusters* molto stabili. Tuttavia, esaminando la distribuzione dei campioni si nota che non c'è una divisione netta tra sani e malati. I donatori sani, infatti, non si ritrovano all'interno di un singolo cluster ben distinto dai soggetti malati: 7 donatori sono raggruppati in un cluster stabile, in cui però si riconoscono anche 2 pazienti che al riscontro clinico presentano malattia aggressiva, mentre gli altri 3 donatori si ritrovano sparsi all'interno degli altri gruppi contenenti campioni di malati. Inoltre, confrontando i dati clinici noti dei pazienti raggruppati all'interno dei clusters stabili, non è stato possibile individuare correlazioni tra le caratteristiche dei pazienti e la divisione in cluster secondo il profilo dei miRNA.

La figura seguente, riassume la distribuzione dei campioni ottenuta calcolando il coefficiente di correlazione dei campioni di donatori e pazienti e delle diverse classi cliniche, che saranno prese successivamente in esame per le analisi di *class comparison*.



**Fig. 4.7** Sample correlation.

Si nota facilmente che le classi individuate sulla base del coefficiente di correlazione – rappresentate dalle ramificazioni del dendrogramma – non riflettono la suddivisione dei pazienti decisa a priori sulla base dei dati clinici, espressa dalle caselle colorate relative ai vari campioni, corrispondenti, per

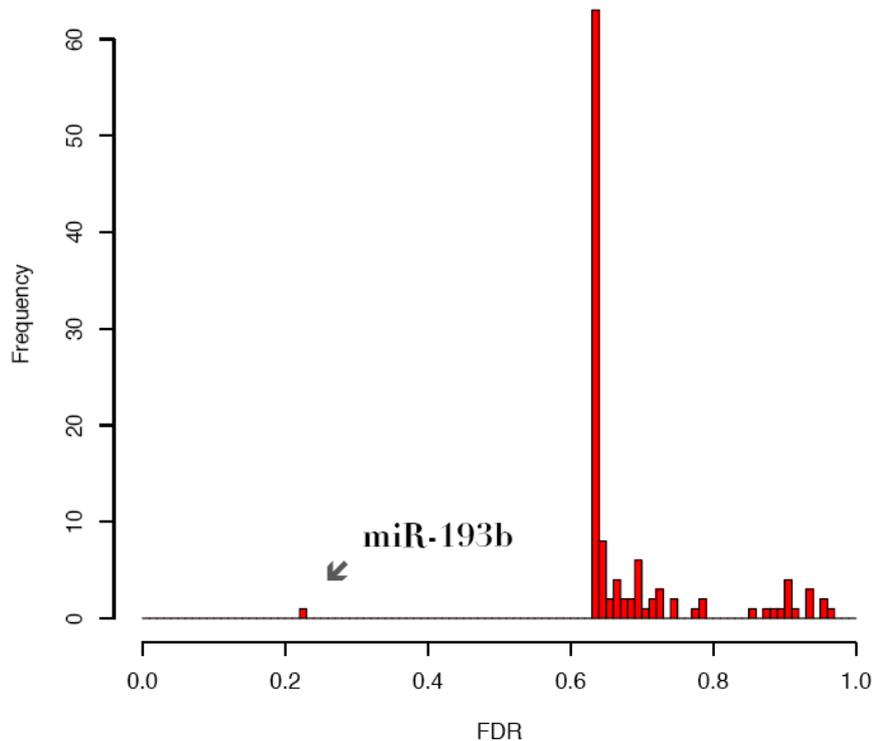
ogni riga, ad una classe diversa (malati/sani; catene leggere libere  $\kappa/\lambda$ ; immunoglobuline IgG/IgA, ISS 1/2-3; lesioni ossee litiche/assenza di lesioni ossee litiche). I diversi pazienti, distinti sulla base di queste caratteristiche, non si riuniscono in gruppi fedeli alla clinica, ma anzi compaiono sparsi all'interno dei differenti *clusters* originati dai profili di espressione dei miRNA.

#### **4.1.6 Class comparison**

Le analisi seguenti sono invece indagini di *class comparison*, effettuate tramite test *t* di Student. In queste analisi vengono stabilite a priori due classi di appartenenza e si valuta se, sulla base dei *ratios* dei microRNA espressi, sia possibile riscontrare una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi. Il test *t* di Student calcola la probabilità statistica che la differenza tra due medie sia dovuta ad errori attribuibili alla casualità. In questo caso si tratta delle medie dei *ratios*, analizzate per i campioni di ogni classe presa in esame. Sono stati considerati statisticamente significativi i rapporti tra i miRNA che mostravano un controllo FDR (*false discovery rate*) inferiore a 0.05. Il controllo FDR indica il valore atteso della popolazione di ipotesi rigettate per errore sul totale delle ipotesi rigettate a seguito di un test statistico. Nel confronto tra due classi mediante test *t*, il calcolo dell'FDR corregge il *p value* ottenuto tenendo conto della molteplicità di confronti effettuati, ottenendo così un *q value*. La *class comparison* tra soggetti malati e sani non ha rilevato una differenza statisticamente significativa tra le due classi. Anche le indagini condotte sui gruppi divisi in base alla produzione di immunoglobuline IgG o IgA, o alle catene libere  $\kappa$  o  $\lambda$ , non hanno prodotto risultati indicativi di differenze. Allo stesso modo, anche per la classificazione in base allo stadio ISS non è stato possibile avere una correlazione significativa tra la clinica ed i profili di espressione dei miRNA.

Dalla comparazione tra il gruppo di pazienti con malattia ossea litica e quelli privi di lesioni, invece, è stato possibile evidenziare numerosi *ratios* differenzialmente espressi tra le due classi in maniera statisticamente significativa. Confrontando i *ratios* si ottengono una serie di rapporti tra due miRNA che sono differenti nei due gruppi. Solo risalendo ai dati relativi ai Ct dei singoli miRNA non normalizzati si potranno identificare i miRNA differenzialmente espressi e quelli stabili nei vari campioni. Nei *ratios* risultati

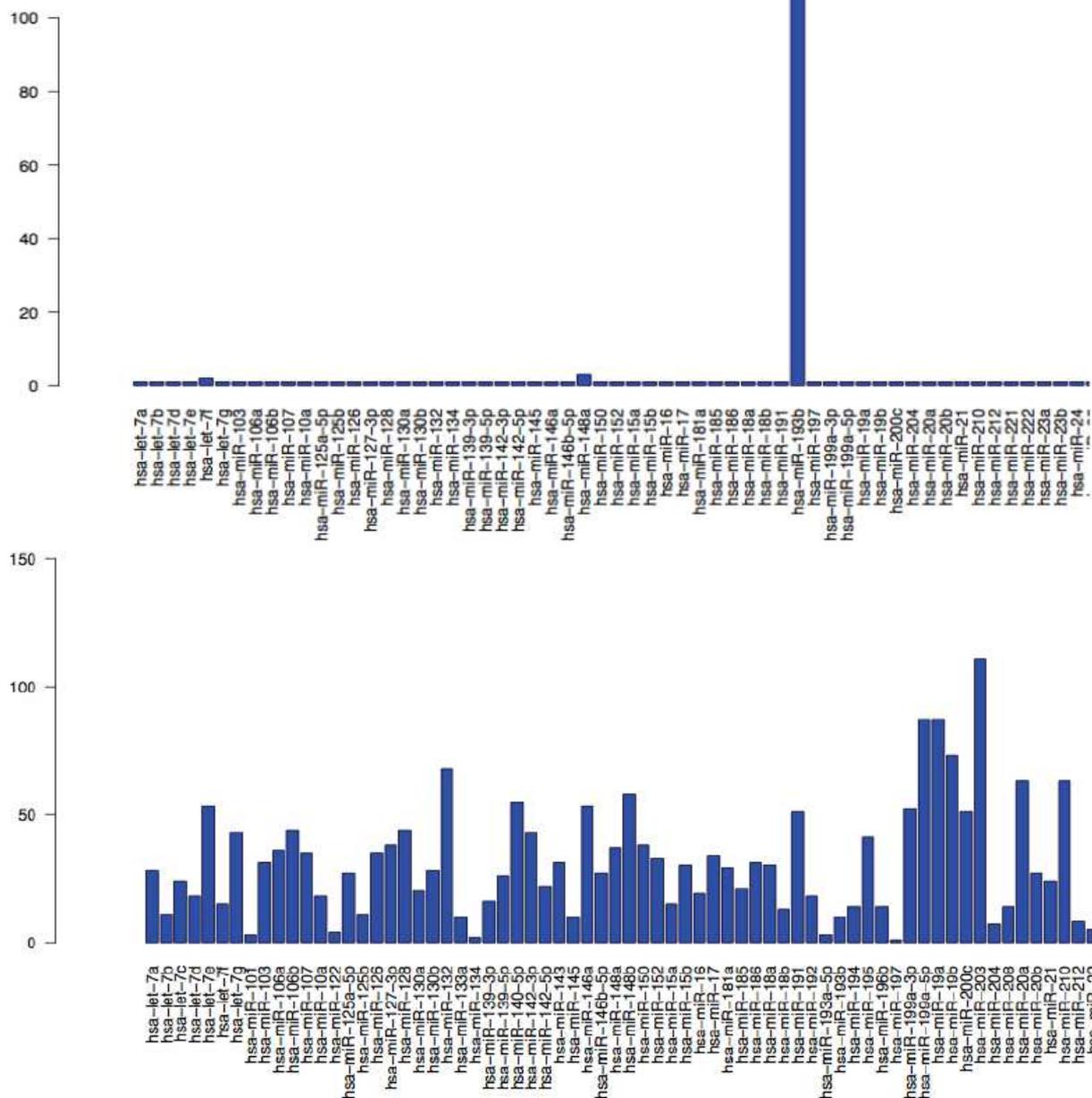
statisticamente significativi ( $FDR < 0.05$ ) è contenuto sempre lo stesso miRNA: miR-193b. Il grafico sottostante mostra la distribuzione degli FDR dei miRNA presenti nei *ratios* differenzialmente espressi tra i due gruppi.



**Fig. 4.8** Distribuzione dei controlli FDR per i miRNA presenti nei ratio differenzialmente espressi.

Si nota come la maggioranza di questi miRNA abbia un FDR prossimo a 1, ad indicare un'espressione stabile all'interno del *dataset*, con valori simili per campioni appartenenti ad entrambe le classi. Questi geni fungono pertanto da normalizzatori dei *ratios* in cui sono contenuti. Al contrario, miR-193b è l'unico a mostrare un FDR prossimo a 0 poiché è differenzialmente espresso tra i due gruppi.

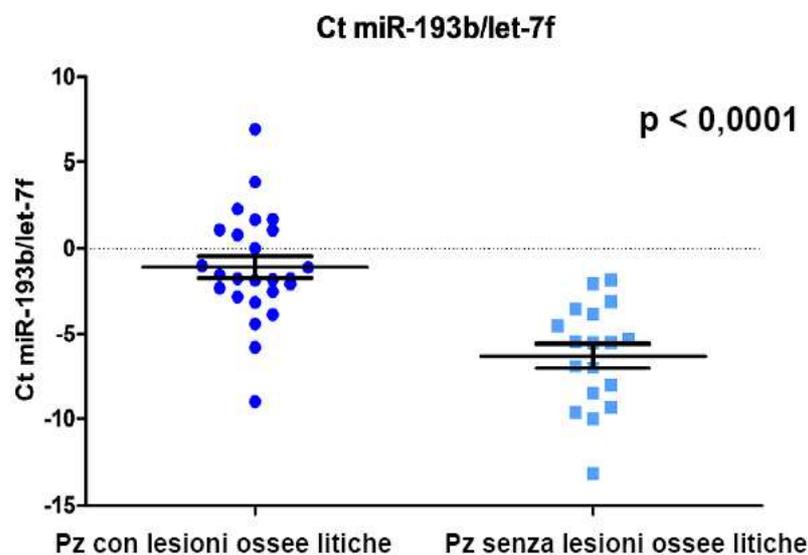
Nella Fig.4.9 è rappresentata la frequenza dei diversi miRNA all'interno dei *ratios* differenziali tra le due classi.



**Fig. 4.9** Frequenze dei vari miRNA nei ratios differenzialmente espressi nelle 2 classi relative alla malattia ossea (grafico superiore) e nel confronto tra donatori e malati. (grafico inferiore).

Si nota come nel primo grafico (relativo al confronto sulla malattia ossea) un solo miRNA, il miR-193b, sia presente in tutti i rapporti statisticamente significativi con una frequenza del 100%. Il secondo grafico, relativo al confronto tra sani e malati, mostra invece che le frequenze di ciascun microRNA all'interno dei campioni che compongono il dataset sono estremamente diverse e non è possibile individuare uno o pochi miRNA differenzialmente espressi tra le due classi.

Il grafico di dispersione mostrato di seguito rappresenta la diversa espressione di miR-193b all'interno dei due gruppi di pazienti con e senza lesioni ossee litiche, in rapporto all'espressione di hsa-let-7f che invece è stabile per entrambi i gruppi (*ratio* di Ct di miR-193b/let-7f). Dalla rappresentazione grafica si può notare come vi sia una differenza significativa ( $p < 0.0001$ ) tra i due gruppi di pazienti, con un'iperespressione di mR-193b nei pazienti con lesioni ossee litiche.



**Fig. 4.10** Differente espressione di miR-193b in rapporto a hsa-let-7f tra i pazienti con lesioni ossee litiche e quelli senza lesioni ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.1.7 miR-193b

Dalle analisi statistiche relative all'espressione dei miRNA nei diversi gruppi si deduce che miR-193b è differentemente espresso nei gruppi di pazienti con lesioni ossee litiche rispetto ai pazienti che non presentano queste lesioni. Pertanto, si è deciso di effettuare un'analisi dei possibili geni bersaglio di questo miRNA utilizzando il sistema informatico di predizione Targetscan. I risultati prodotti da questa ricerca hanno evidenziato che il cluster conservato di miR-193 presenta possibili siti di legame su miRNA codificati da molti geni: andando a ricercarne in letteratura le funzioni geniche è emerso che alcuni dei bersagli di

miR-193 son coinvolti nella regolazione del metabolismo osseo. La tabella seguente contiene alcuni dei geni bersaglio regolati da miR-193.

microRNA	Possibili geni bersaglio
miR-193	CNBP
	KRAS
	KIT
	IGFBP5
	LGR4
	CALM
	SPECC1L
	ING5

**Tab. 4.1** Possibili geni bersaglio di miR-193 predetti dal programma informatico di predizione *Targetscan*.

In letteratura è stata confermata una correlazione tra il *cluster* miR-193 e ING5 (membro numero 5 della famiglia di inibitori della crescita): un recente lavoro ha infatti dimostrato che l'incremento dell'espressione di miR-193 comporta la riduzione dei livelli di ING5, inibitore della crescita cellulare, in modo tale da favorire la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali del midollo osseo, le quali manifestano una potenziale differenziazione osteogenica e sembrano coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi ossea [120,121].

Per gli altri possibili bersagli in letteratura si è riscontrato che 1) CNBP regola positivamente la proliferazione degli osteoblasti, quando viene iperespresso, e promuove la differenziazione dei progenitori in osteoblasti maturi; 2) IGFBP5 (Proteina 5 legante il fattore di crescita insulino-simile) stimola l'attività e la proliferazione osteoblastica tramite un meccanismo IGF- dipendente [122]; 3) i geni che modulano l'espressione della Calmodulina (CALM) sembrano avere un ruolo nella regolazione dell'osteoclastogenesi [123]. 4) anche per KIT è stata descritta un'associazione con il metabolismo osseo, in particolare per l'espressione di recettori funzionali di c-kit da parte degli osteoclasti maturi e dei loro precursori [124]. Inoltre, uno studio pubblicato su *Blood* nel 2010 [125] ha

messo in luce effetti diretti dell'*Imatinib* sul riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti e sulla deposizione osteoblastica di matrice ossea, proprio grazie alla sua azione inibitrice di c-kit e altri geni.

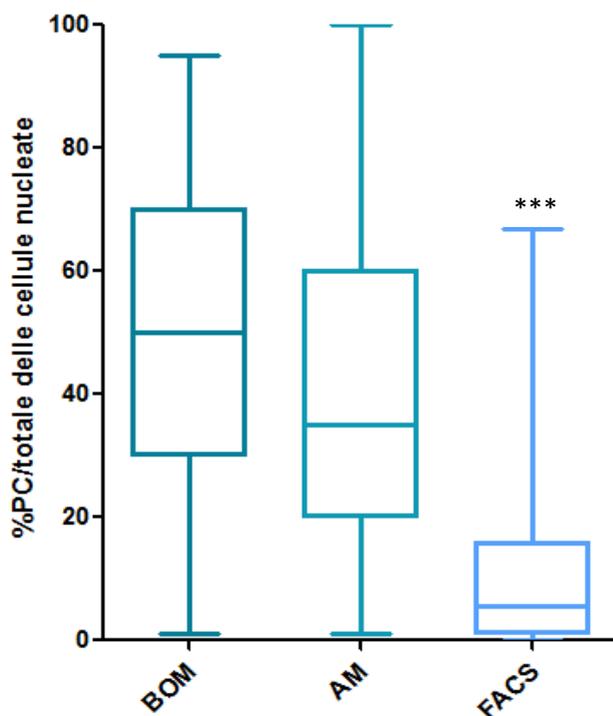
## **4.2 Studio dell'immunofenotipo nel Mieloma Multiplo ricaduto o refrattario**

La terapia del MM in prima linea è progredita notevolmente negli ultimi anni, soprattutto grazie all'introduzione del melphalan (un agente chemioterapico appartenente alla famiglia delle mostarde azotate) ad alte dosi e a nuovi agenti. Tuttavia, la maggior parte, se non tutti i pazienti, hanno una ricaduta di malattia. L'andamento clinico di questi pazienti è sostanzialmente migliorato grazie alla disponibilità di agenti innovativi quali la talidomide, il bortezomib (Velcade®) e la lenalidomide (Revlimid®), capaci di indurre una risposta nei pazienti con malattia non più responsiva alla chemioterapia convenzionale. Pertanto, in questo studio abbiamo analizzato una casistica di pazienti alla prima ricaduta di Mieloma Multiplo che sono stati sottoposti ad un trattamento contenente bortezomib o lenalidomide associato a ciclofosfamide e desametasone.

### **4.2.1 Studio delle plasmacellule tumorali in campioni di sangue midollare**

I campioni di sangue periferico e sangue midollare sono stati raccolti da pazienti con mieloma multiplo al momento della ripresa di malattia ma prima dell'inizio del trattamento con bortezomib o lenalidomide. Questi campioni sono stati caratterizzati mediante Citometria a Flusso Multiparametrica (*Multiparametric Flow Cytometry*, MFC) (vedi paragrafo 3.4). In primo luogo abbiamo identificato le plasma cellule patologiche all'interno del nostro campione e ne abbiamo espresso la numerosità come percentuale di cellule CD138+/CD38+ sul totale di cellule nucleate. Nella pratica clinica viene considerata diagnostica la percentuale di plasmacellule all'analisi morfologica della Biopsia Osteo-midollare (BOM) [127]. Per avere un'indicazione della rappresentatività del campione analizzato rispetto all'infiltrato midollare di cellule tumorali rilevato con le altre metodiche, abbiamo confrontato le percentuali di plasma cellule rispetto alla cellularità totale del campione rilevate

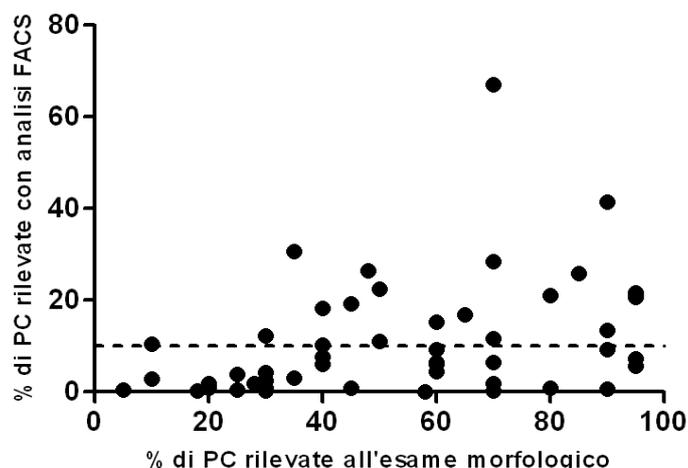
con analisi morfologica al microscopio della BOM, dell'aspirato midollare (AM) e all'analisi citofluorimetrica multiparametrica (FACS). In Fig. 4.11 sono rappresentati i dati relativi a 100 pazienti con MM ricaduto/refrattario.



**Fig. 4.11** Confronto tra la percentuale di plasmacellule identificate all'analisi morfologica su BOM, all'aspirato midollare o con citofluorimetria. BOM: media 52,19%, da 1 a 95%; AM: media 41,7%, da 2 a 100%; Campione FACS: media 9,98% da 0,1 a 76%.

Come si può notare, vi è una grande variabilità sia all'interno di ciascuna metodica che tra una e l'altra. Tuttavia, se il campione biotico e l'aspirato utilizzato per la diagnosi o la stadiazione di malattia sembrano essere al quanto coerenti uno rispetto all'altro, la percentuale di plasmacellule rilevate in citofluorimetria risulta significativamente minore ( $p < 0,0001$ ). Questo dimostra che l'analisi morfologica effettuata sulle biopsie riesce ad individuare un numero superiore di plasmacellule; il dato è confermato sia raggruppando i campioni, che analizzandoli a livello del singolo paziente. Abbiamo incrociato i dati relativi all'analisi morfologica della BOM e ne tra le plasmacellule rilevate in BOM e

quelle riscontrate al FACS per lo stesso paziente. In Fig. 4.12 sono rappresentati graficamente questi dati.



**Fig. 4.12** Corrispondenza tra le PC riscontrate all'analisi morfologica rispetto al FACS per lo stesso paziente. La linea tratteggiata al 10% rappresenta il limite diagnostico per la patologia.

Come mostrato in altri studi [128], questo è dovuto sia alla distribuzione delle cellule maligne all'interno delle nicchie midollari, che alla tecnica del prelievo. L'esame morfologico infatti, viene eseguito su strisci di sangue midollare a partire da spicole ricche di lipidi che sono il santuario delle plasmacellule; per contro, l'analisi citofluorimetrica utilizza solo cellule del fluido midollare. E' ampiamente descritto [128] che solo il primo millilitro di aspirato midollare rappresenta un campione puro di midollo; poiché la maggior parte degli aspirati da noi analizzati contiene almeno 2-3ml (fino a 10ml) di materiale, inevitabilmente, le plasmacellule saranno diluite con sangue midollare circolante nelle nicchie.

Questi dati, in accordo con quelli di letteratura, dimostrano che l'analisi citofluorimetrica non può sostituire quella morfologica. D'altro canto, l'analisi FACS è in grado di discriminare le plasmacellule maligne rispetto a quelle sane in base ai marcatori di superficie espressi, il che non è possibile con la sola analisi morfologica.

#### 4.2.2 Immunofenotipo delle plasmacellule da sangue midollare prima del trattamento

In Tab. 4.2 sono riassunti gli antigeni espressi dalle plasmacellule presenti nel campione di sangue midollare dei pazienti con mieloma multiplo ricaduto/refrattario prima di iniziare il trattamento terapeutico. I risultati mostrano che il profilo di espressione delle cellule mielomatose è molto diverso tra i vari campioni. Le cellule maligne di una minoranza di pazienti mantengono l'espressione di antigeni di superficie tipici degli stadi maturativi precoci dei linfociti B: l'espressione del CD19 è stata riscontrata nel 15% dei casi, compresi quelli con espressione eterogenea di questo antigene. Mentre il CD20 e il CD45 sono stati rilevati rispettivamente nel 17% e 37% dei casi (incluso i campioni con espressione elevata o media dell'antigene).

Frequenza e modalità di espressione antigenica in pazienti con MM ricaduto/refrattario (n = 96)

Antigene	Espressione antigenica (%)					Pazienti			
	+ omog.	+dim omog.	Eterogeneo			neg		pos	
			+	-	- omog.	No.	%	No.	%
CD19	2	6	7	22	63	76	85	13	15
CD20	2	7	7	8	73	80	83	16	17
CD45	3	29	2	32	33	61	65	32	35
CD56	37	25	13	2	22	23	25	69	75
CD117	7	-	39	15	39	48	54	41	46
CD28	6	1	13	5	74	66	79	17	21
CD27	7	1	44	20	31	38	46	44	54

**Tab. 4.2** I profili di espressione antigenici sono stati classificati come (+) altamente positivo, (+ dim.) positivo e (-) negativo. Inoltre è stato distinto se l'espressione sulle plasmacellule era omogenea (livelli di espressione simili in tutte le plasmacellule) o eterogenea (differenti livelli di espressione tra le plasmacellule). La frequenza di espressione antigenica è stata calcolata su 96 pazienti come la percentuale di casi in cui  $\geq 20\%$  delle plasmacellule maligne erano positive per quell'antigene.

L'espressione intensa dell'antigene CD56, un marcatore coinvolto nell'ancoraggio delle plasmacellule alle strutture stromali, era presente nel 37% della nostra casistica, il 25% mostrava un'espressione ridotta di questo antigene, mentre negli altri casi questo antigene era parzialmente o completamente negativo. Circa la metà dei campioni analizzati (il 46%) è risultato positivo per l'antigene CD117, un recettore tirosin chinasi non

espresso dalle plasmacellule sane. Altri antigeni, quali CD28 e CD27, la cui espressione è caratteristica dei linfociti T, sono stati rilevati nel 21% e 54% dei casi rispettivamente.

In seguito abbiamo suddiviso la nostra casistica di pazienti in base al trattamento terapeutico ricevuto in prima linea, allo scopo di indagare se vi fossero dei profili di espressione distintivi. Abbiamo distinto tre gruppi: quelli che hanno ricevuto un trattamento con Bortezomib (n=44), quelli che hanno ricevuto Lenalidomide (n=11) ed un terzo gruppo che è stato trattato con altre terapie (n=50). Non sono state riscontrate differenze significative nell'espressione degli antigeni nei gruppi di pazienti che hanno seguito differenti terapie.

Antigene	Pazienti			
	Totali		Bortezomib in prima linea	
	Pos.	Neg	Pos	Neg
CD19	15	85	16	85
CD20	17	88	12	83
CD45	35	60	40	65
CD56	75	15	85	25
CD117	46	43	57	54
CD28	21	88	12	79
CD27	54	46	54	46

**Tab. 4.3** Profilo di espressione antigenica dei pazienti che hanno ricevuto un trattamento con Bortezomib in prima linea.

In Tab. 4.3 sono comparate le percentuali di espressione degli antigeni analizzati nei pazienti che hanno ricevuto come prima terapia il Bortezomib rispetto alla totalità della popolazione. La numerosità del gruppo di pazienti che hanno ricevuto lenalidomide è troppo esigua per poter avere una significatività in analisi della percentuale di espressione.

#### **4.2.3 Immunofenotipo e risposta alla terapia**

Abbiamo poi studiato l'eventuale correlazione tra l'espressione antigenica delle plasmacellule tumorali ed il tempo alla progressione.

Antigene	N°Pz.	Mediana sopravvivenza (giorni)	p
CD45			
-	70	335	0,049
+	11	495	
CD56			
-	26	402	0,4
+	64	351	
CD19			
-	78	367	0,9
+	12	355	
CD20			
-	76	378	0,6
+	15	331	
CD28			
-	67	374	0,9
+	17	379	
CD27			
-	41	352	0,5
+	40	381	
CD117			
-	49	373	0,8
+	41	368	

**Tab. 4.4** Distribuzione dell'espressione genica e del tempo alla progressione dei pazienti in studio.

Come si può notare dai dati riportati in tabella, l'unico antigene per cui si osserva una differenza nella mediana di sopravvivenza è il CD45. La mancata differenza può essere dovuta sia alla ridotta numerosità del campione che alla grande eterogeneità che caratterizza il gruppo di pazienti presi in analisi. In effetti, i trattamenti terapeutici a cui sono stati sottoposti in prima linea contemplavano agenti chemioterapici quali Vincristina, Adriamicina e Doxorubicina, oppure agenti immunomodulanti quali Thalidomide e Lenalidomide, o l'inibitore del proteasoma Bortezomib. A tutti questi agenti veniva associato il desametasone.

Tuttavia, l'analisi citofluorimetrica si è mostrata attendibile nei casi di pazienti in remissione clinica di malattia con un infiltrato midollare di plasmacellule di circa 1%. Benchè l'analisi morfologica sia nella maggior parte dei casi più affidabile perchè eseguita su un campione più ricco di cellule, il suo limite sta nel riconoscimento della natura benigna o maligna dell'infiltrato. Questa

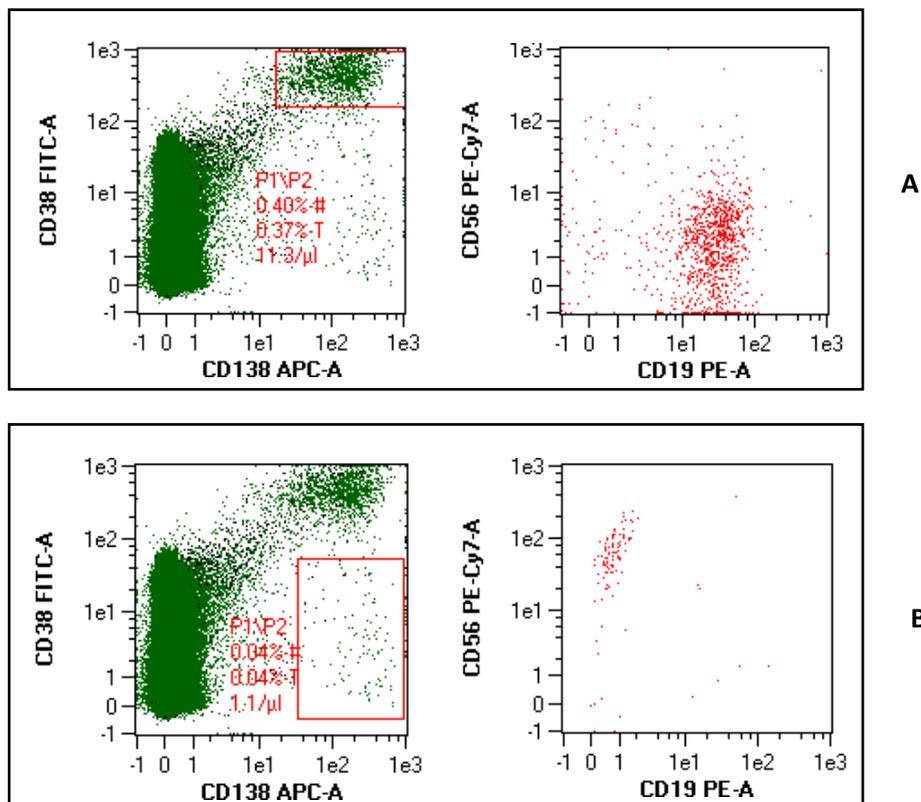
discriminazione è invece possibile analizzando l'espressione degli antigeni di superficie mediante lettura citofluorimetrica.

In alcuni casi, se la qualità dell'aspirato midollare è buona, l'analisi dell'immunofenotipo rileva la presenza delle plasmacellule tumorali anche quando l'esame morfologico risulta negativo per lo stesso campione. La sensibilità della metodica è infatti elevata, al di sotto dello 0,1%.

#### 4.2.4 Analisi differenziale di cloni tumorali plasmacellulari

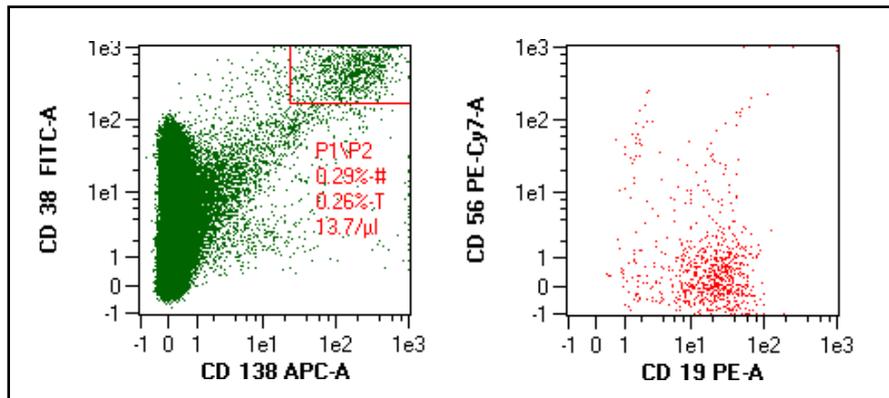
Negli ultimi anni gli studi di genomica sul mieloma multiplo hanno avvalorato sempre di più la tesi di un susseguirsi di ondate di cloni tumorali [129], ovvero la presenza contemporanea di cellule tumorali con caratteristiche diverse che si espandono o riducono in risposta al trattamento terapeutico.

In Fig. 4.13 sono mostrati i citogrammi relativi ad un campione di sangue midollare di un paziente con MM ricaduto/refrattario prima dell'inizio del trattamento.



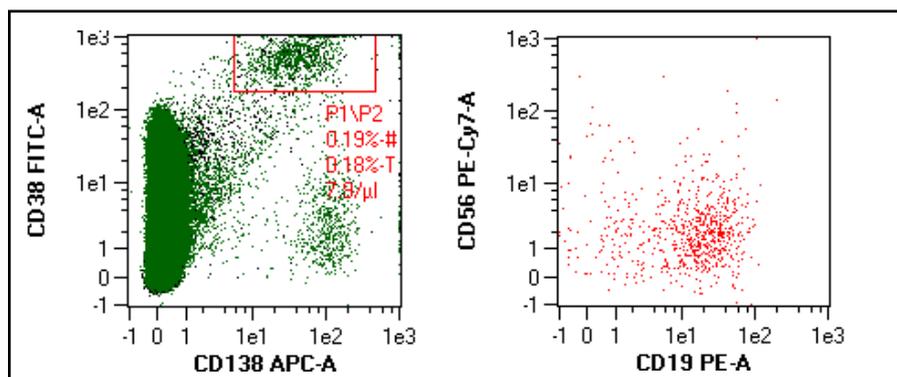
**Fig. 4.13** Analisi della popolazione di plasmacellule di un soggetto prima dell'inizio del trattamento. A) Clone plasmacellulare dominante con elevata espressione di CD138 e CD38. B) Clone plasmacellulare secondario con espressione ridotta di CD38.

In questo campione si può osservare la presenza di un clone di plasmacellule dominante con elevata espressione di CD38, CD138 e CD19 ed espressione intermedia di CD56. Vi è inoltre un piccolo gruppo di cellule che mostrano una ridotta positività per il CD38 e CD19 ed un'espressione elevata di CD56. Dopo i primi tre cicli di trattamento con l'inibitore del proteasoma Bortezomib l'analisi citofluorimetrica rileva la presenza del solo clone principale mentre non si osservano cellule aventi l'immunofenotipo riscontrato nel clone secondario (Fig.4.14).

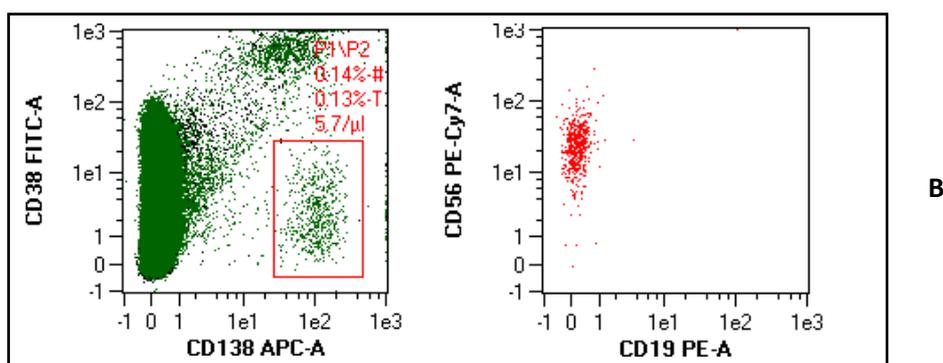


**Fig. 4.14** Dopo i primi tre cicli di trattamento con Bortezomib, si riscontra solo la presenza del clone principale.

Dopo i successivi tre cicli di trattamento sempre con lo stesso regime terapeutico, emerge distintamente il clone secondario a fronte di una riduzione del clone dominante. Questo risultato mostra come anche mediante analisi citofluorimetrica sia possibile notare l'alternanza delle ondate clonali caratteristiche del mieloma multiplo. Suggestisce inoltre che un regime terapeutico possa favorire l'emergenza di cloni tumorali quiescenti che portano poi alla ricaduta di malattia.



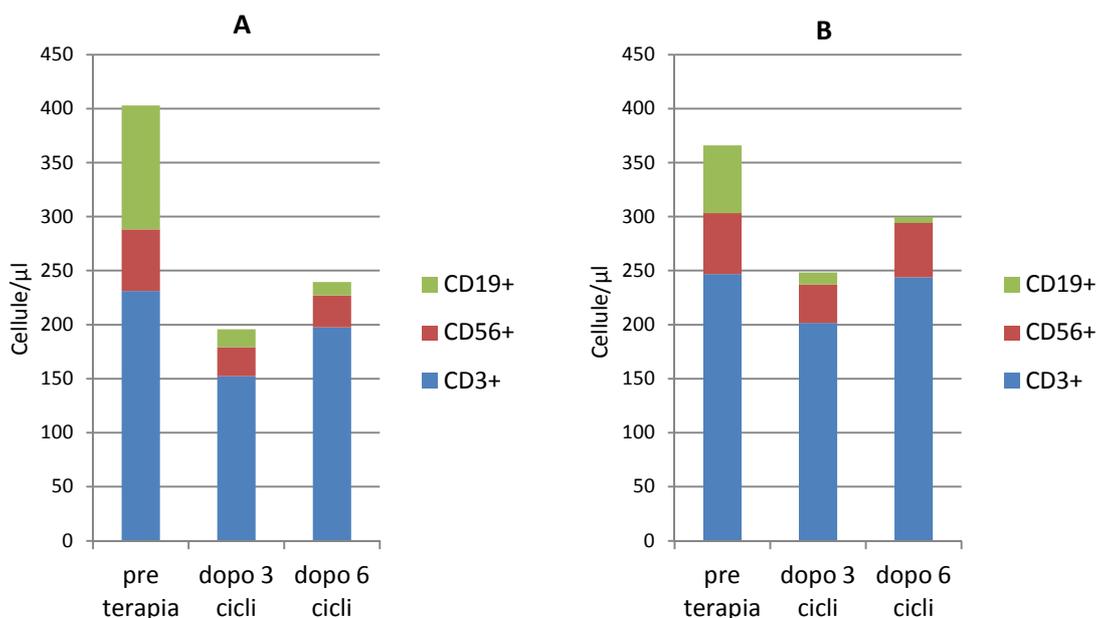
A



**Fig. 4.15** Dopo 6 cicli di trattamento con Bortezomib si rileva un aumento del clone secondario osservato prima dell'inizio del trattamento. A) Clone principale, B) clone secondario.

#### 4.2.5 Analisi immunofenotipica del sangue periferico di pazienti con MM ricaduto/refrattario

Abbiamo inoltre analizzato anche i campioni di sangue periferico dei pazienti con mieloma multiplo ricaduto o refrattario prima e durante il trattamento con bortezomib o lenalidomide. I campioni di sangue periferico intero sono stati marcati con anticorpi specifici per antigeni di superficie. Dopo aver selezionato i leucociti per la positività all'antigene pan-leucocitario CD45, sono state analizzate al loro interno le cellule B (CD19+), i linfociti T (CD3+) e le cellule NK (CD56+). Complessivamente, in tutti i pazienti analizzati in trattamento con entrambi i regimi, abbiamo riscontrato una generale riduzione delle popolazioni linfocitarie nel sangue periferico (Fig. 4.16). Come si può evincere dalla rappresentazione grafica della numerosità dei linfociti presenti nel sangue periferico, l'andamento non mostra differenze tra il gruppo di soggetti trattati col farmaco immunomodulante rispetto a quello trattato con l'inibitore del proteasoma. Questo suggerisce che l'effetto linfocitopenico osservato sia dovuto prevalentemente all'azione della combinazione di corticosteroidi e chemioterapico, e non all'azione immunomodulante della lenalidomide.



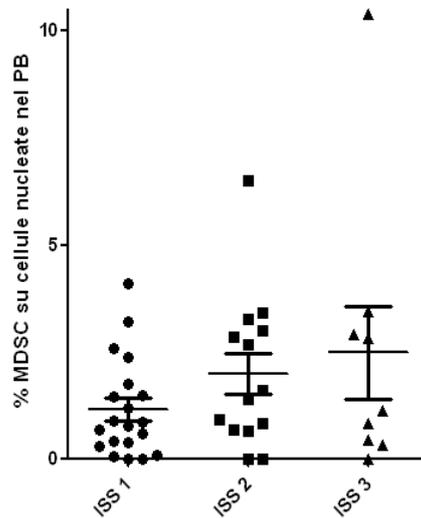
**Fig. 4.16** Rappresentazione grafica della variazione della popolazione linfocitaria nei campioni di sangue periferico durante il trattamento. A) campioni di sangue periferico di pazienti trattati con terapia a base di bortezomib, B) campioni di sangue periferico di pazienti trattati con terapia a base di lenalidomide.

#### 4.2.6 Analisi della popolazione MDSC nel sangue periferico di pazienti con mieloma multiplo

Ci siamo in seguito concentrati in particolare sulla popolazione di cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC). Studi recenti hanno infatti dimostrato che queste cellule, rare o assenti nei soggetti normali, sono presenti in percentuali più elevate nel sangue midollare e periferico di pazienti con mieloma multiplo [130]. Le cellule MDSC sono contraddistinte dalla negatività per i marcatori di *lineage* (Lin-), per il marcatore HLA-DR  $\alpha$  e dalla doppia positività per gli antigeni CD33 e CD11b.

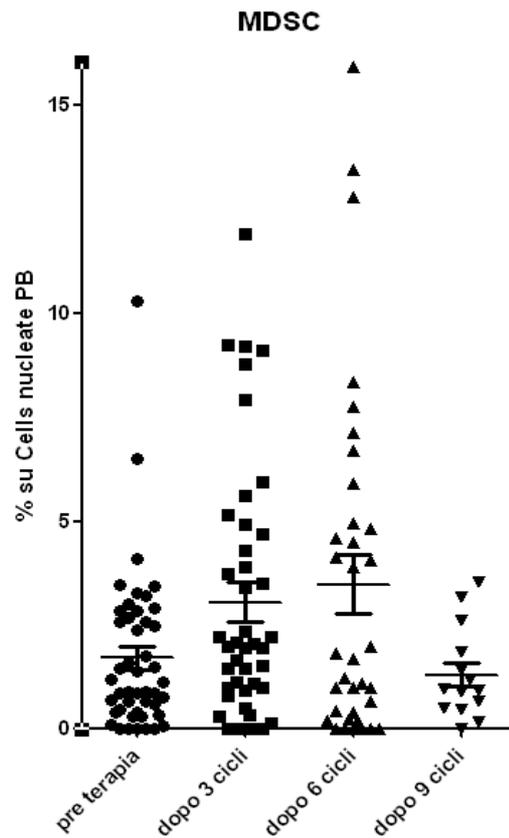
Nella nostra casistica di pazienti con mieloma multiplo ricaduto o refrattario alla prima linea di terapia abbiamo in primo luogo analizzato i campioni di sangue periferico prima dell'inizio del trattamento. In questi soggetti con malattia attiva la numerosità della popolazione di MDSC circolanti è estremamente eterogenea: dalla totale assenza di cellule con immunofenotipo riferibile alle MDSC, ad un massimo di 10,3% rispetto alla totalità di cellule nucleate nel sangue periferico. Successivamente si è cercato di individuare un'eventuale correlazione tra i parametri di malattia e la numerosità di queste cellule. Raggruppando i pazienti in base all'appartenenza ai tre diversi gruppi

di rischio secondo il sistema di stadiazione ISS della malattia, si osserva un incremento della percentuale di MDSC circolanti all'aumentare dello stadio [Fig. 4.17].



**Fig. 4.17** Percentuale di cellule con fenotipo MDSC nei pazienti rispetto alla stadiazione di malattia.

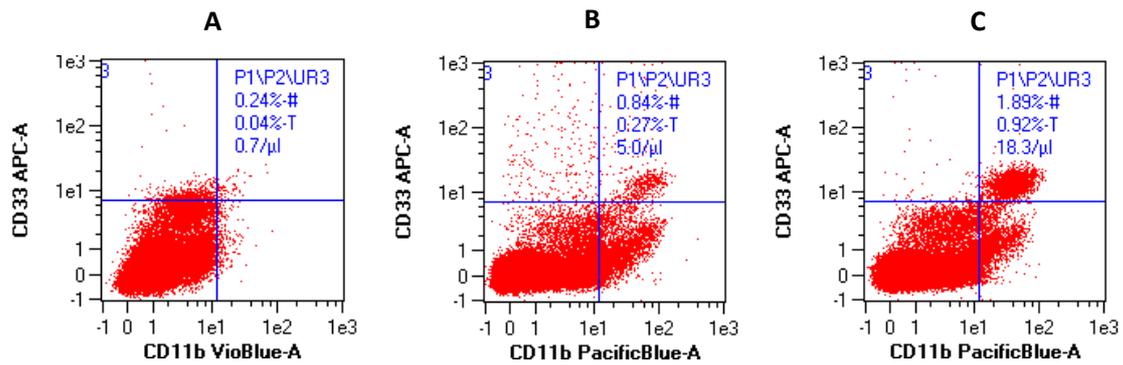
In seguito, abbiamo studiato come varia la popolazione di MDSC durante il trattamento dei pazienti. Sono stati analizzati i campioni di sangue periferico dopo i primi tre cicli di terapia con bortezomib o lenalidomide (prima induzione), dopo i successivi tre cicli (termine dell'induzione) e dopo gli ultimi tre cicli (fine della fase di consolidamento). I dati così ottenuti sono quelli visualizzati in Fig. 4.18 e sono relativi a tutti i pazienti in studio. E' stata evidenziata un'espansione della popolazione di cellule soppressorie di derivazione mieloide durante il proseguimento del trattamento terapeutico.



**Fig. 4.18** Variazione della percentuale di cellule MDSC nel sangue periferico durante il trattamento.

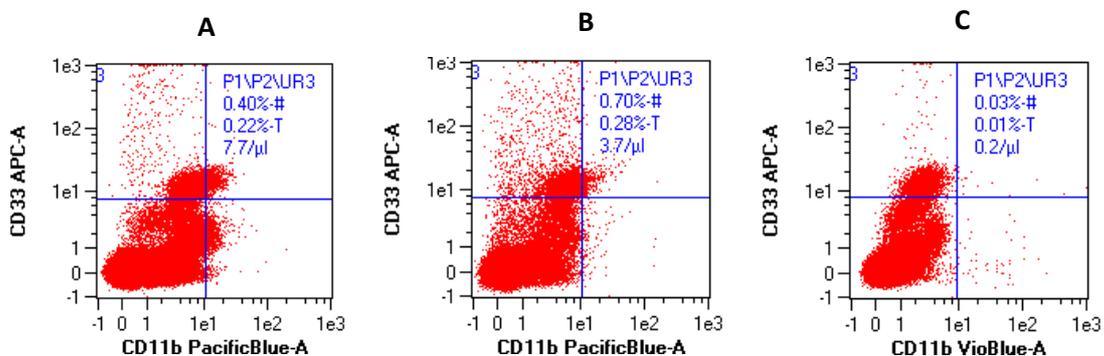
E' opportuno segnalare che i pazienti analizzati dopo il 9° ciclo di trattamento costituiscono quella frazione di soggetti che hanno continuato a mantenere una risposta, a differenza quelli che hanno interrotto la terapia a causa della riduzione dell'efficacia terapeutica. Questi risultati portano ad ipotizzare che, durante il corso della terapia, si mettano in atto una serie di meccanismi immunologici che alterano i rapporti tra le popolazioni immunomodulanti, esitando poi in un'azione protettiva o favorente nei confronti delle cellule neoplastiche. In particolare questa tendenza all'accrescimento della popolazione di cellule soppressorie di derivazione mieloide è stata osservata nel caso di due pazienti trattati con bortezomib.

In Fig. 4.19 sono mostrati i citogrammi relativi ai campioni di sangue periferico di uno stesso paziente prima del trattamento con bortezomib, dopo tre cicli di trattamento e dopo sei cicli di trattamento.



**Fig. 4.19** Analisi della popolazione di MDSC nel sangue periferico di un paziente con MM ricaduto prima del trattamento con Bortezomib (A), dopo tre cicli di trattamento (B) e dopo sei cicli di trattamento (C). A 60 giorni dalla fine del sesto ciclo si è verificata una ripresa di malattia.

La percentuale di MDSC nel sangue periferico aumenta progressivamente durante la prosecuzione del trattamento e a 60 giorni dall'ultimo ciclo di trattamento (corrispondente al campione C) il paziente è andato incontro ad una ricaduta di malattia. Questo dato è in accordo con uno studio che dimostra come la presenza delle MDSC determini l'abrogazione dell'attività citotossica del bortezomib verso le plasmacellule di MM [131]. A conferma di ciò, in Fig. 4.20 è mostrato invece in caso di un paziente che durante il trattamento con bortezomib non ha sviluppato l'espansione delle popolazione soppressoria MDSC ed ha ottenuto una remissione clinica duratura della malattia.



**Fig. 4.20** Analisi della popolazione di MDSC nel sangue periferico di un paziente con MM ricaduto prima del trattamento con Bortezomib (A), dopo tre cicli di trattamento (B) e dopo sei cicli di trattamento (C). Questo paziente ha avuto una remissione clinica duratura della malattia.

Nel loro insieme questi dati suggeriscono un possibile ruolo di questa popolazione immunomodulante nell'espansione delle cellule tumorali e nell'azione terapeutica del trattamento farmacologico.

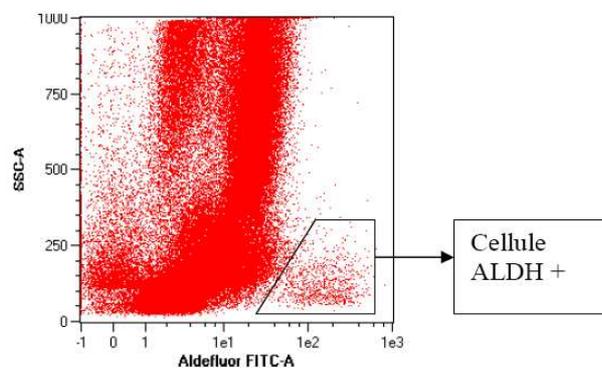
## 4.3 Cellule staminali nel Mieloma Multiplo

### 4.3.1 Analisi citofluorimetrica tramite Aldefluor® Assay di campioni di sangue midollare

Per identificare le cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cells, CSC*) nel MM, i campioni di sangue midollare di pazienti con MM (vedi 3.3.1) sono stati sottoposti a colorazione Aldefluor, un saggio non immunologico in grado di identificare le cellule staminali/progenitrici sulla base dei livelli intracellulari dell'enzima aldeide deidrogenasi (ALDH1A1). L'ALDH è coinvolto nei processi di detossificazione a livello delle cellule staminali mentre la sua attività è pressoché nulla nelle cellule differenziate.

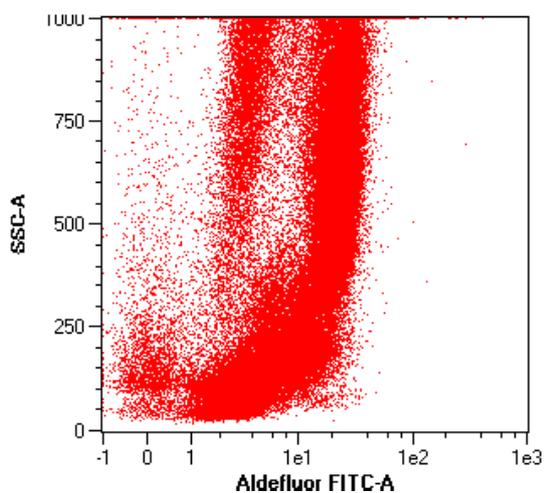
Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che le cellule staminali possiedono un basso SSC alla lettura citofluorimetrica: per questo motivo la fluorescenza intracellulare dell'ALDH è stata combinata alla scala dei valori di SSC con l'obiettivo di agevolare l'individuazione delle cellule staminali/progenitrici ALDH + [110].

In tutti i campioni analizzati è stata riscontrata una popolazione di cellule con SSC ridotto ed elevata positività per ALDH (Fig. 4.21).



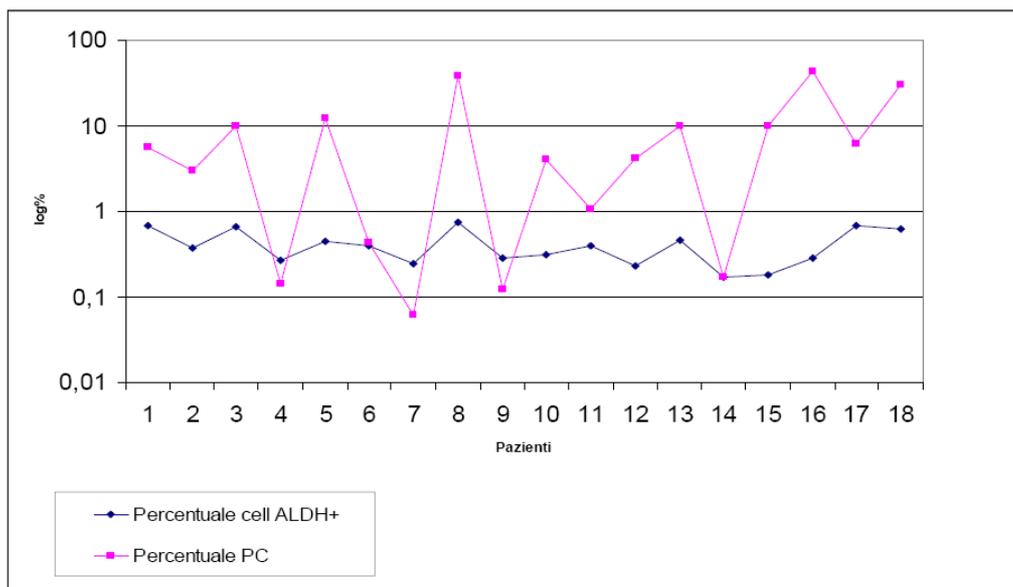
**Fig. 4.21** Campione incubato con BAAA. E' possibile apprezzare una popolazione di cellule midollari ad elevata fluorescenza per il reagente Aldefluor.

Diversamente, quando il campione è stato incubato contemporaneamente con BAAA e DEAB (potente inibitore dell'ALDH) non è stata rilevata la stessa popolazione di interesse, a riprova del fatto che la metodica è dotata di elevata specificità nell'individuare solo le cellule che effettivamente presentano un'elevata attività di questo enzima (Fig.4.22).



**Fig. 4.22** Campione incubato con BAAA. E' possibile apprezzare una popolazione di cellule midollari ad elevata fluorescenza per il reagente Aldefluor.

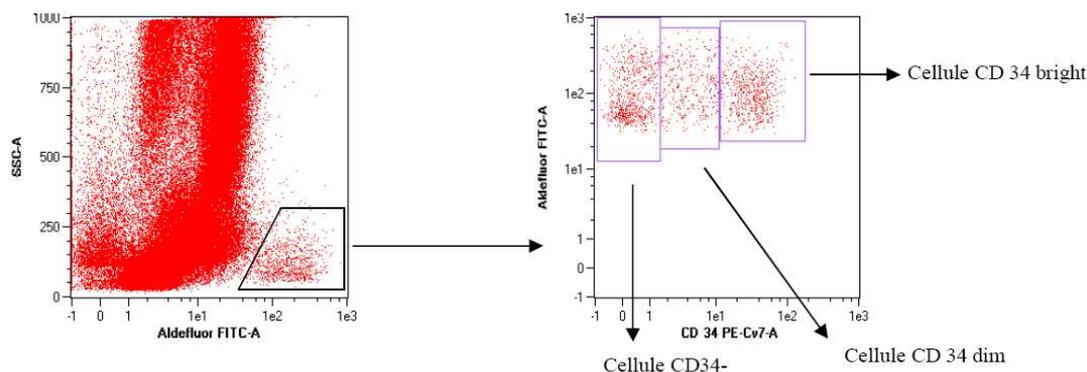
Le percentuali di cellule ALDH+ rilevate sono comprese tra lo 0.17% e lo 0.67% del totale di cellule nucleate nel sangue midollare, con una scarsa variabilità tra un paziente e l'altro. Non è stata riscontrata una correlazione tra l'entità dell'infiltrato midollare di cellule tumorali e quella delle cellule con caratteristiche di staminalità (Fig. 4.23).



**Fig. 4.23** Confronto della percentuale di plasmacellule infiltranti il midollo osseo con la percentuale di popolazione avente caratteristiche di staminalità per ogni paziente analizzato.

Questa evidenza è compatibile con l'ipotesi dell'esistenza delle CSCs, che rappresenterebbero una popolazione esigua all'interno dell'aspirato midollare in grado di sostenere la crescita tumorale grazie alla loro capacità di auto-rinnovamento e differenziazione. Per la natura stessa del saggio, all'interno della popolazione positiva per l'Aldefluor, è compresa anche la frazione staminale "normale" che in un contesto fisiologico costituisce lo 0.05% delle cellule midollari.

Per discriminare le cellule staminali sane da quelle tumorali, abbiamo analizzato la positività per il marcatore di staminalità CD34 all'interno della popolazione ALDH+. In tutti i campioni analizzati sono state individuate tre popolazioni di cellule ALDH+: CD34+ *bright*, CD34 *dim* e CD34- (Fig. 4.24).



**Fig. 4.24.** La popolazione cellulare contenuta nella finestra di analisi a livello delle cellule con elevata fluorescenza BAA e basso SSC è stata studiata per la positività all'antigene CD34. Sono evidenziate le tre popolazioni di cellule CD34-/CD34dim/CD34bright osservate in tutti i campioni analizzati.

In seguito, le cellule con doppia positività per ALDH e CD34 (sia *bright* che *dim*) sono state caratterizzate per l'espressione di altri marcatori di staminalità quali CD117 e CD133. In effetti, queste popolazioni risultano avere una brillante espressione dei marcatori CD117 e CD133, e pertanto costituiscono verosimilmente la popolazione staminale normale. Ci siamo inseguito concentrati sulla frazione ALDH+/CD34-, le cui percentuali rilevate rispetto alle cellule nucleate totali del sangue midollare sono riportate in Tab. 4.5.

Pt #	ALDH+/CD34-	Pt#	ALDH/CD34-
1	31.56	10	40.27
2	2.4	11	32.52
3	43.62	12	48.63
4	80.65	13	31.56
5	67.35	14	31.08
6	21.01	15	31.19
7	65.83	16	75.17
8	39.79	17	43.02
9	38.2	18	31.24

**Tab. 4.5** Percentuali di cellule negative al marcatore CD34 rispetto alla totalità delle cellule aventi caratteristiche di staminalità.

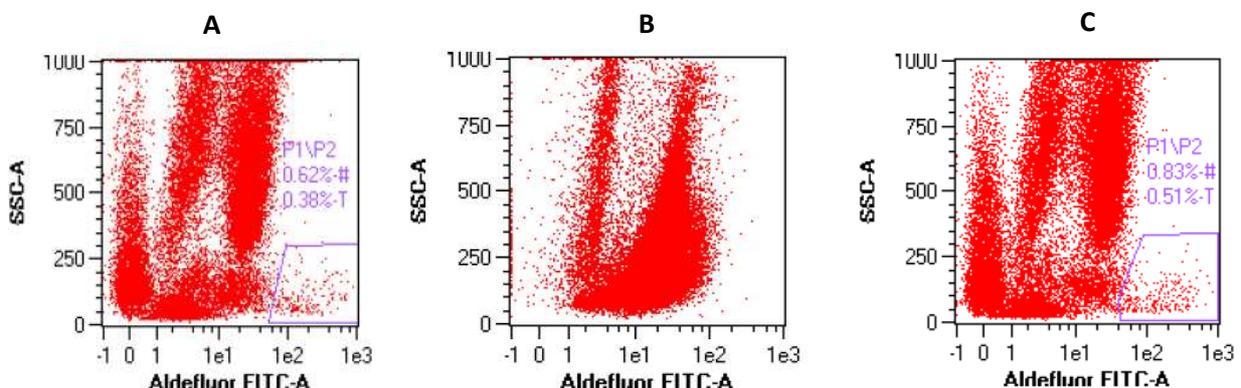
Poiché in letteratura le CSCs del mieloma multiplo sono state descritte come somiglianti a cellule B della memoria (CD28+/CD20+/CD138-) [115,116], abbiamo valutato l'espressione dei marcatori CD138, CD20 e CD27 nella popolazione di cellule ALDH+/CD34-. Per verificare se anche nelle nostre mani le cellule staminali tumorali esprimessero gli antigeni riportati in letteratura, abbiamo marcato i campioni di sangue midollare sottoposti al saggio Aldefluor con anticorpi diretti contro gli antigeni di interesse.

Abbiamo ottenuto dati molto eterogenei, con grande variabilità tra i diversi pazienti. Non in tutti i campioni è stato possibile individuare una popolazione CD34- con immunofenotipo CD138-/CD27+/CD20+; peraltro, l'analisi è resa molto difficoltosa a causa delle piccole percentuali di cellule interessate e dall'elevato numero di anticorpi da indagare.

Al fine di verificare la negatività al marcatore CD138 abbiamo analizzato mediante saggio aldefluor le plasmacellule CD138+ dopo purificazione immunomagnetica.

#### 4.3.2 Analisi di plasmacellule selezionate

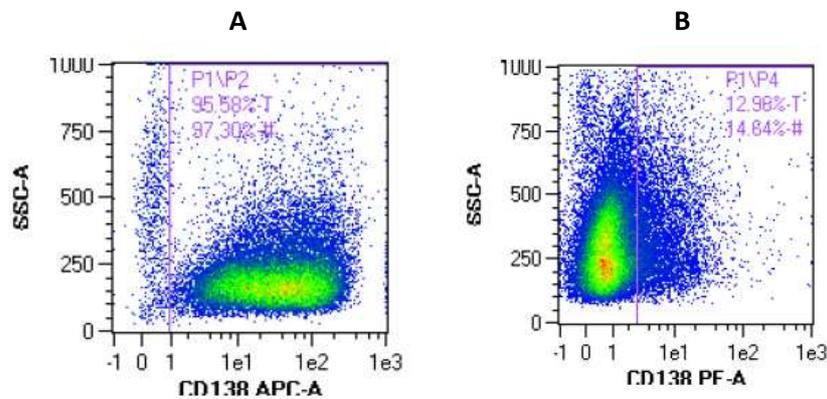
Le plasmacellule CD138+ presenti nel sangue midollare di quattro pazienti sono state purificate col metodo MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting, Miltenyi Biotec*). La frazione positiva ottenuta dopo la purificazione è stata valutata per la positività all'Aldefluor. Nella Fig. 4.25 è riportato un campione rappresentativo dell'analisi con Aldefluor del campione di cellule da sangue midollare prima della separazione e delle frazioni positiva e negativa dopo la selezione immunomagnetica.



**Fig. 4.25** A) Popolazione ALDH+ rilevata in un campione di cellule midollari non selezionate. B) Nelle cellule CD138+ purificate non è apprezzabile la popolazione ALDH+. C) Popolazione ALDH+ rilevata nel campione di midollo osseo depleto delle cellule CD138+

Prima della purificazione, le plasmacellule CD138+ in questo campione costituivano il 6% delle cellule totali, mentre quelle ALDH+ erano pari allo 0,62%. I dati ottenuti mostrano come la frazione positiva della separazione non contenga al suo interno la popolazione ALDH+, che permane invece nella frazione negativa ottenuta dopo la purificazione e pari allo 0.83%. In tutti i campioni analizzati la percentuale di cellule ALDH+ risulta aumentata nella frazione depleta delle plasmacellule a causa della perdita di una parte delle cellule ALDH- durante il processo di purificazione.

Questi dati portano ad ipotizzare che le cellule con caratteristiche di staminalità possano appartenere al comparto CD138-. Un aspetto metodologico emerso durante l'esecuzione degli esperimenti riguarda la riduzione del segnale relativo alla marcatura anti CD138 nelle cellule sottoposte al processo di colorazione con Aldefluor. In effetti, campioni di cellule selezionate CD138+ sottoposte al processo per la rilevazione dell' Aldefluor mostrano una marcata riduzione del segnale per l'antigene stesso.



**Fig. 4.26** A) Purezza della separazione eseguita su un campione di sangue midollare. Il 97,3% delle cellule selezionate è positivo alla marcatura anti-CD138. B) Frazione cellulare CD138+. Le cellule sottoposte a colorazione Aldefluor inibiscono l'espressione dell'antigene di membrana CD138. Solo il 14,6% risulta positivo alla marcatura anti-CD138.

Di seguito sono riportate per percentuali di positività per CD138 per tutti i campioni di plasmacellule purificate prima e dopo l'incubazione col reagente Aldefluor.

<b>Paziente</b>	<b>CD138+</b>	<b>CD138+ cell incubate con BAA</b>
5	99%	14,64%
13	92%	6,10%
17	97%	17,96%
18	90%	10,25%

**Tab. 4.6.** Percentuali della positività al marcatore CD138 e positività al marcatore CD138 delle stesse cellule sottoposte al saggio Aldefluor.

Nel loro insieme, questi dati sono in accordo con quelli di letteratura secondo cui le CSCs sarebbero negative per il marcatore CD138. D'altro canto, è utile tenere presente che si ha una marcata riduzione del segnale relativa al CD138 quando questo viene valutato in concomitanza con il saggio Aldefluor. Pertanto, nell'analizzare i campioni trattati con ALDEFLUOR<sup>®</sup> assay, le cellule positive al marcatore CD138 potrebbero essere erroneamente sottostimate.

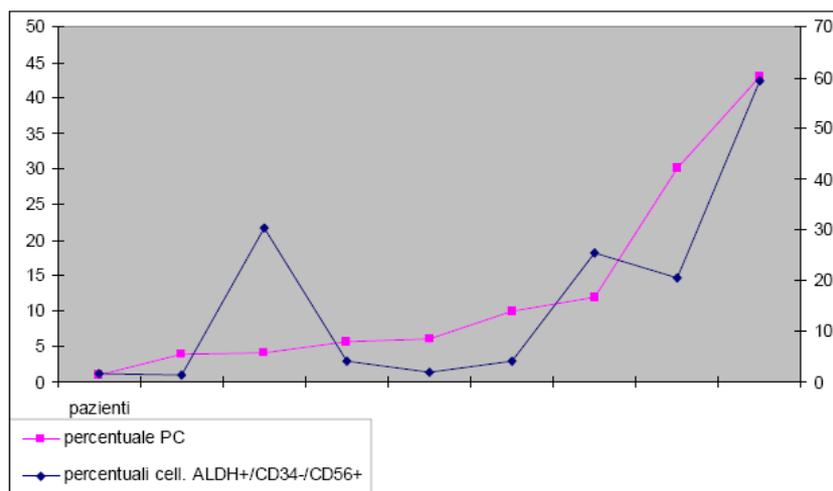
#### **4.3.3 Ricerca di nuovi marcatori delle CSCs**

In seguito ci siamo concentrati sull'identificazione di nuovi marcatori delle CSCs che possano essere proposti come alternativi a quelli già descritti. Abbiamo quindi studiato l'espressione di una serie di antigeni leucocitari la cui espressione è alterata nelle malattie oncologiche, quali CD19, CD31, CD56, CD33 e CD14 nella popolazione ALDH+/CD34- di otto campioni di aspirato midollare (di cui quattro alla diagnosi). Tra tutti quelli analizzati, di particolare interesse è risultato essere il CD56. Questo antigene, detto anche NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) è una glicoproteina transmembrana espressa sulla superficie dei neuroni, glia e muscoli scheletrici. Essa ha un ruolo importante nel meccanismo di adesione cellulare ed è stata riscontrata in diversi tumori umani solidi, quali il carcinoma polmonare a piccole cellule, ed il sarcoma di Ewing. Nel tessuto emopoietico, il CD56 viene espresso dai linfociti NK (*natural killer*) e dai linfociti T citotossici, ed in particolare nel mieloma multiplo è stata descritta una sua espressione aberrante sulla superficie delle cellule neoplastiche nel 70-80% dei casi. Data l'elevata frequenza con cui viene espresso dalle cellule mielomatose, il CD56 è l'antigene più utile per distinguere

le plasmacellule sane da quelle patologiche. Questo antigene è in particolare coinvolto nelle interazioni omotipiche cellula-cellula. In tutti i campioni indagati è stata rilevata una popolazione cellulare CD56+ all'interno della popolazione ALDH+/CD34-. L'espressione di questo marcatore è variabile tra i diversi pazienti, e sembrerebbe essere correlata alla percentuale di infiltrazione delle plasmacellule (Tab 4.7 e Fig. 4.27).

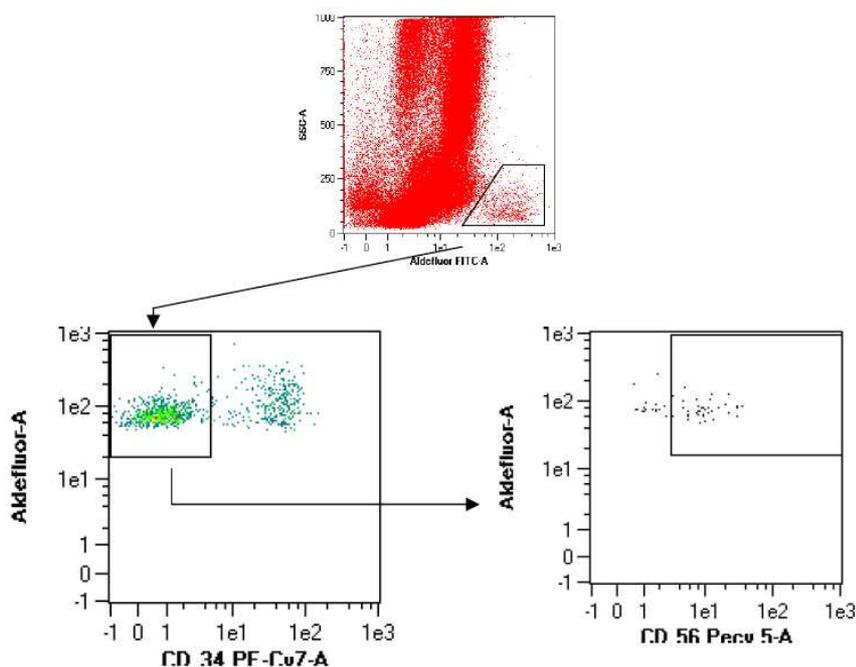
Percentuale PC	Percentuale cell. ALDH+/CD34-/56+
1,7	1,52
4	1,36
4,12	30,46
5,6	4,14
6	1,97
10	3,98
12	25,31
30	20,59
43	59,3

**Tab. 4.7** Espressione dell'antigene CD56 all'interno della popolazione ALDH+/CD34-.



**Fig. 4.27** Confronto tra la percentuale di plasmacellule infiltranti il midollo e l'espressione del marcatore CD56 nella popolazione ALDH+/CD34-.

I risultati ottenuti mostrano che vi è una popolazione con caratteristiche di staminalità (ALDH+), negative per il marcatore CD34 (marcatore dei progenitori emopoietici) e positive per il marcatore CD56 la cui espressione è dimostrata essere aberrante nelle plasmacellule mielomatose (Fig. 4.28). La popolazione in questione è compresa tra lo 0.01% e lo 0.04% delle cellule nucleate midollari.



**Fig. 4.28** Analisi citofluorimetrica della popolazione ALDH+/CD34-/CD56+. Dopo aver selezionato la popolazione ALDH+ è stata studiata la positività al marcatore CD34. All'interno della finestra contenente le cellule ALDH-/CD34- è stata analizzata la positività all'antigene CD56.

Poiché risulta particolarmente difficoltoso reperire campioni di sangue midollare da soggetti sani, abbiamo studiato l'espressione del marcatore CD56 in una condizione patologica differente, quale il linfoma di Hodgkin mediastinico. Il campione di sangue midollare è stato trattato ed analizzato secondo le stesse metodiche utilizzate per i campioni di MM. E' stata così rilevata una popolazione ALDH+ dello 0.1% ed all'interno di questa una frazione CD34- del 49.85%. Di interesse, questo campione relativo ad un contesto patologico diverso non presentava cellule ALDH+/CD45-/CD56+. Pertanto, pur non rappresentando il controllo negativo ideale, questo esperimento conforta l'ipotesi che il marcatore CD56 possa essere specifico delle CSCs del mieloma multiplo.

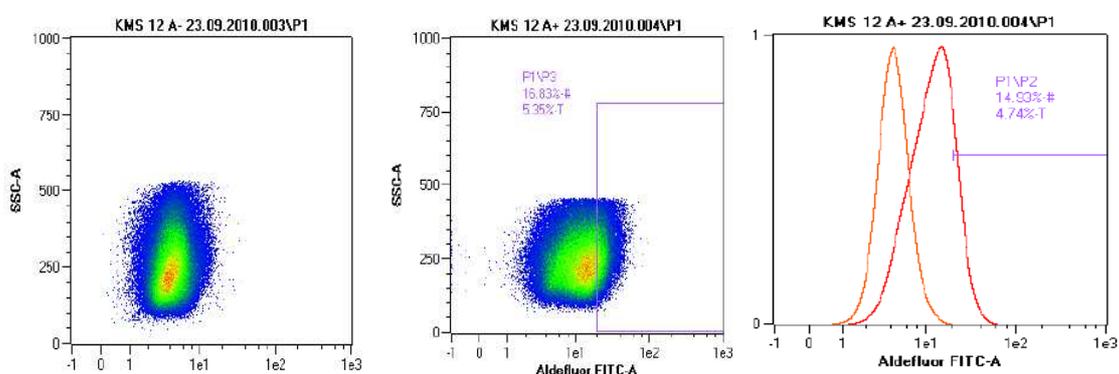
#### 4.3.4. Analisi citofluorimetrica tramite Aldefluor® Assay di linee cellulari di MM

Oltre ai campioni di sangue midollare di pazienti affetti da mieloma multiplo, abbiamo analizzato con saggio Aldefluor 3 linee cellulari di MM: LP-1, KMS-12 BM e ARH77. Inizialmente abbiamo definito l'immunofenotipo delle linee indagando separatamente i marcatori CD138, CD34 e CD56. La loro caratterizzazione è riassunta nella tabella seguente.

	CD138+	CD56+	CD34+
<b>LP-1</b>	91,51%	92,74%	14,46%
<b>KMS-12 BM</b>	41,73%	0,35%	17,75%
<b>ARH 77</b>	8,02 %	0,64%	8,6%

**Tab. 4.8** Immunofenotipo di linee cellulari di mieloma multiplo.

Abbiamo in seguito eseguito il saggio Aldefluor su tutte e tre le linee cellulari. Diversamente da quanto visto sui campioni di sangue midollare, per le linee cellulari non si osserva un netto distacco tra una frazione positiva ed una negativa per l'aldefluor: si ha piuttosto una transizione dell'intera popolazione verso una fluorescenza più elevata.



**Fig. 4.29** Linea cellulare KMS12BM. A) Campione trattato con inibitore dell'ALDH. B) Campione incubato con BAAA. La finestra 3 contiene le cellule ALDH+. C) Isogramma rappresentante le cellule ALDH+. In rosso è raffigurata la fluorescenza delle cellule positive al saggio, in arancio quella delle cellule negative.

La rappresentazione mediante istogrammi dei risultati ottenuti, consente una più precisa discriminazione della popolazione negativa rispetto a quella positiva. Le percentuali delle cellule positive al saggio Aldefluor sono riportate in tabella.

Linea cellulare	Cell ALDH+
LP-1	0,92%
KMS-12 BM	28,47%
ARH 77	1,13%

**Tab. 4.9** Percentuale di cellule ALDH+ per ogni linea cellulare indagata.

Nelle linee cellulari LP-1 e ARH 77 la percentuale di cellule aventi caratteristiche di staminalità è simile a quelle rilevate nei campioni midollari, mentre la linea KMS-12 BM ne mostra una percentuale molto elevata. Le cellule ALDH+ sono state valutate per l'espressione di CD34 ed è stata poi analizzata la sottopopolazione CD34+/CD56+ (Tab. 4.10).

	ALDH+/CD34-	ALDH+/CD34/CD56+
LP-1	91,88%	94,25%
KMS-12 BM	99,42%	0,36%
ARH 77	89,30%	2,17%

**Tab. 4.10** Percentuali delle cellule con caratteristiche di staminalità e negative per il marcatore CD34- e percentuali della sottopopolazione ALDH+/CD34-/CD56+.

Questi esperimenti hanno confermato l'esistenza di una popolazione mielomatosi con caratteristiche di staminalità, negative per il CD34 e positive per CD56.

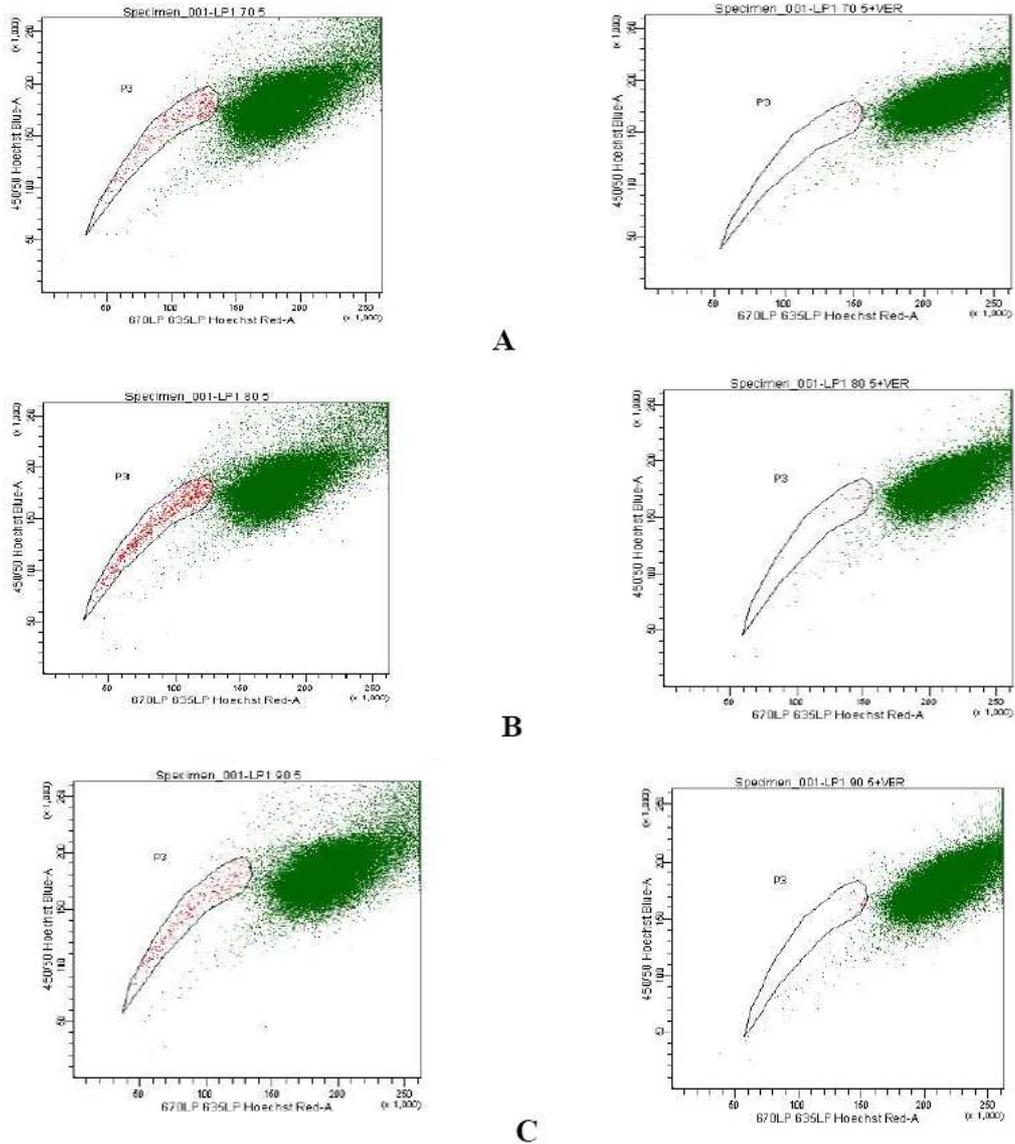
#### **4.3.5 Analisi della Side Population**

Per verificare la consistenza dei risultati ottenuti col saggio Aldefluor®, abbiamo adottato un secondo metodo per identificare le cellule staminali in citometria: lo studio della *side population*. Viene definita una *side population* (SP) quando si ha una popolazione sub-laterale di cellule che è distinta dalla popolazione principale sulla base degli indicatori impiegati.

Le cellule staminali possono essere identificate grazie al loro fenotipo MDR (*multi drug resistance*). Infatti, spesso sulla membrana delle cellule staminali troviamo degli trasportatori appartenenti alla famiglia ABC i quali sono responsabili dell'estrusione di farmaci e di coloranti quali l'Hoechst 33342. I trasportatori ABC possono essere specificamente inibiti da agenti come il Verapamil e la Reserpina. Comparando la distribuzione nei canali di emissione dell'Hoechst delle cellule trattate con gli inibitori rispetto a quelle non trattate è possibile identificare la regione delle cellule che costituiscono la *side population*. Allo scopo di confrontare le due metodiche utilizzate per lo studio delle cellule staminali, abbiamo eseguito i sue saggi sullo stesso campione di sangue midollare e la linea cellulare LP-1.

L'analisi della *side population*, a differenza del saggio Aldefluor, si è rivelata difficoltosa nella scelta delle concentrazioni di colorante da impiegare e nella tempistica di incubazione. In letteratura venivano proposti protocolli differenti per l'analisi della SP [109,132], ed è stato pertanto necessario adattare diversi parametri al tipo di campione che si vuole analizzare. Abbiamo quindi effettuato una titolazione del colorante e testato diverse tempistiche di incubazione per riuscire a visualizzare correttamente le popolazioni cellulari.

Il campione di cellule della linea LP-1 è stato incubato con due concentrazioni diverse di Hoechst: 5µg/ml e 2,5µg/ml. Per ogni concentrazione sono state valutate tre tempistiche differenti di incubazione: 70-80-90 minuti. Alla concentrazione di 2.5µg/ml di Hoechst non è stato possibile visualizzare la SP indipendentemente dal tempo di incubazione, mentre utilizzando una concentrazione doppia di Hoechst è stato possibile identificare il tipico "uncino" dove si posizionano le cellule contraddistinte da MDR (Fig. 4.30]).



**Fig. 4.30** Risultati ottenuti dall'incubazione dei campioni con 5 $\mu$ g/ml con tre diverse tempistiche: A) 70 minuti, B) 80 minuti, C) 90 minuti.

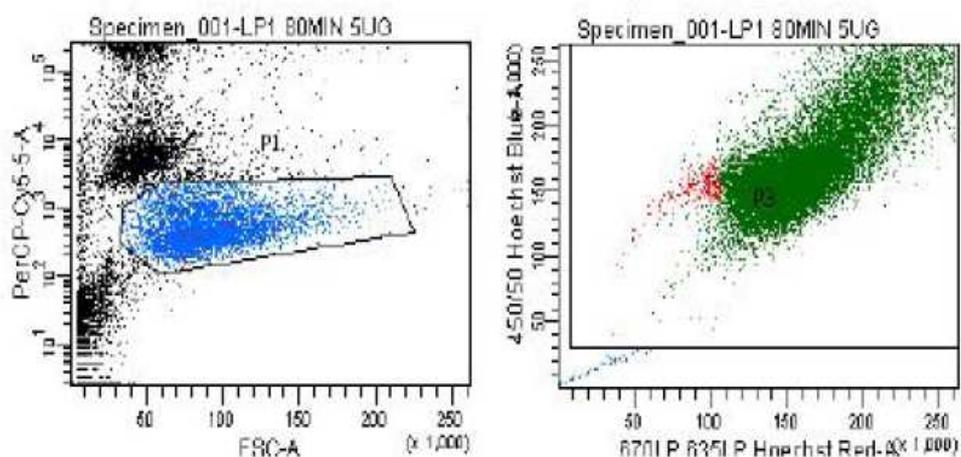
Tempo di incubazione dell' Hoechst (5 $\mu$ g/ml)	Percentuale cell side population	Percentuale di inibizione indotta dal Verapamil
70 minuti	0,9%	88%
80 minuti	1,9%	95%
90 minuti	0,7%	85%

**Tab. 4.11** In tabella sono riportate le differenti percentuali di cellule positive al saggio con le corrispettive percentuali di inibizione indotte dal Verapamil.

Una variazione anche di pochi minuti nell'incubazione con il reagente può determinare una variazione consistente nella percentuale di cellule positive alla *side population*. Dai risultati ottenuti si deduce che le condizioni migliori per visualizzare la *side population* nella linea LP-1 si realizzano ad una concentrazione di 5µg/ml di Hoechst con un'incubazione a 37°C per 80 minuti.

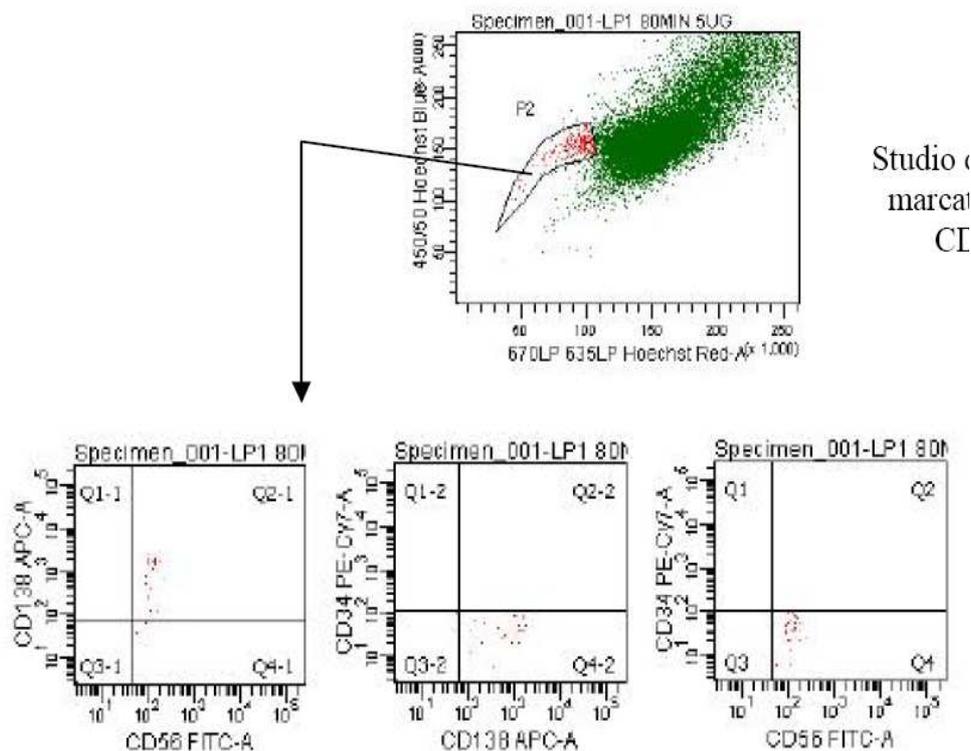
Dopo aver messo a punto la metodica, abbiamo marcato le cellule della linea con gli anticorpi contro gli antigeni CD138, CD34 e CD56 per caratterizzare la popolazione di cellule staminali contenute nella *side population*.

In prima istanza abbiamo valutato la vitalità delle cellule contenute nel nostro campione utilizzando la colorazione con ioduro di propidio (PI). Questo reagente è in grado di penetrare nelle cellule non vitali che hanno perso l'integrità della membrana e di legarsi al DNA. Pertanto, le cellule positive per questo marcatore sono quelle da escludere dall'analisi poiché possono legarsi specificamente agli altri marcatori utilizzati (Fig. 4.31).



**Fig. 4.31** Nel citogramma di sinistra è possibile osservare la positività delle cellule alla fluorescenza del PI, la popolazione (p1) in blu rappresenta le cellule vitali. A destra è mostrato il citogramma contenente la sottopopolazione p1 analizzata nelle emissioni di fluorescenza dell'Hoechst: rosso e blu.

In seguito è stata rilevata una popolazione pari all'1% del totale delle cellule vitali con capacità di estrudere il colorante Hoechst inibita dal Verapamil. Questa è stata studiata per la positività per i tre marcatori indagati (CD138, CD56, CD34) (Fig. 4.32).



**Fig. 4.32** Studio dell'espressione dei marcatori CD34, CD56, CD138 della SP.

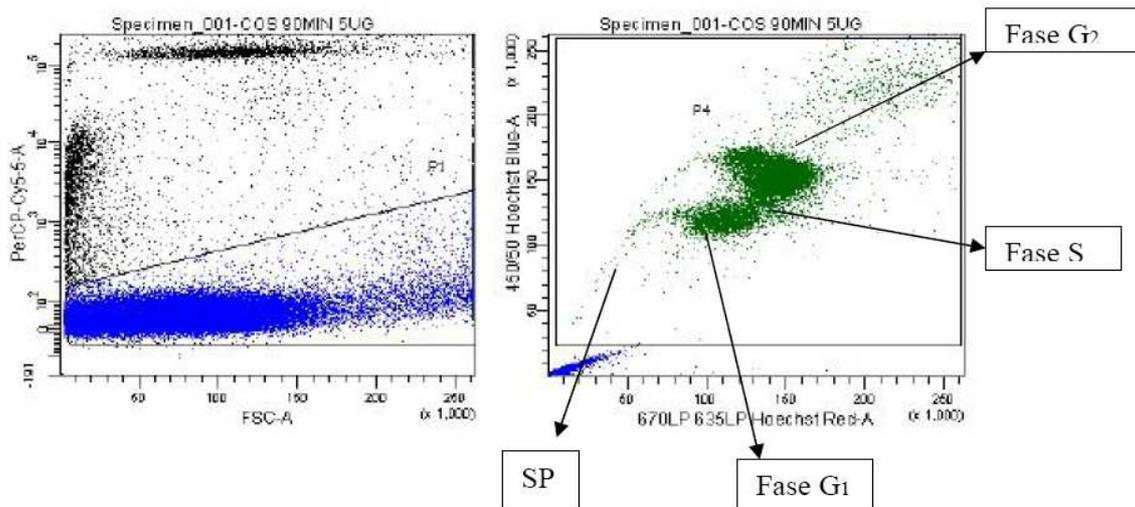
Come mostrato in figura, la SP esprime un immunofenotipo omogeneo. La totalità della popolazione risulta CD34- (mentre le cellule della linea sono positive per il 14%) ed esprime l'antigene CD56. Le cellule CD56+ che rappresentano la totalità delle cellule della SP, risultano essere per l'88,5% positive al CD138 (e negative per l'11,5%).

I risultati ottenuti per la linea LP-1 mediante lo studio della *side population* sono coerenti con quelli ottenuti col metodo Aldefluor (Tab. 4.12).

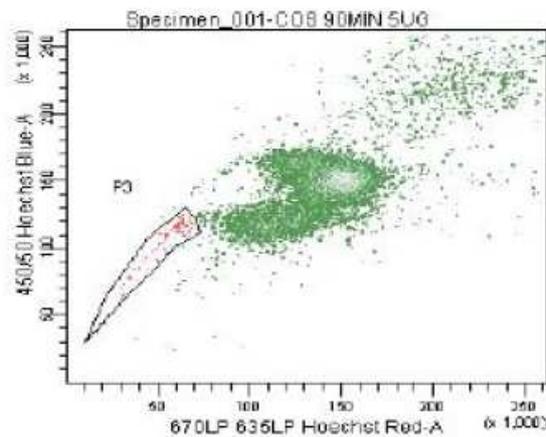
	Cell. positive al saggio	Cell. ALDH+oSP+/CD34-	Cell. ALDH+oSP+ /CD34-/CD56+
Aldefluor assay	0,92%	91,88%	94,25%
SP	1,4%	100%	100%

**Tab. 4.12** Confronto tra i due saggi di staminalità Aldefluor e *Side Population* per la linea cellulare LP-1.

Dopo aver ottimizzato i parametri dell'esperimento sulle linee cellulari, abbiamo sottoposto alla colorazione Hoechst un campione di sangue midollare di un paziente affetto da MM. Le cellule da sangue midollare sono state incubate per 90 minuti con una concentrazione di 5µg/ml. Come per le linee cellulari, la vitalità cellulare è stata rilevata con la colorazione di ioduro di propidio (Fig. 4.33).



**Fig. 4.33** Le cellule con bassa fluorescenza al PI sono state selezionate e studiate per l'emissione della fluorescenza rossa e blu dell'Hoechst. Nel citogramma di destra sono state evidenziate le fasi del ciclo cellulare.



**Fig. 4.34** Side population.

Nel campione di cellule da sangue midollare abbiamo potuto distinguere le differenti fasi del ciclo cellulare: la fase G1 e G2 sono ben definite, il che sostiene la vitalità del campione e la bontà dell'esperimento. La percentuale di cellule all'interno della SP è risultata essere pari allo 0.5% delle cellule

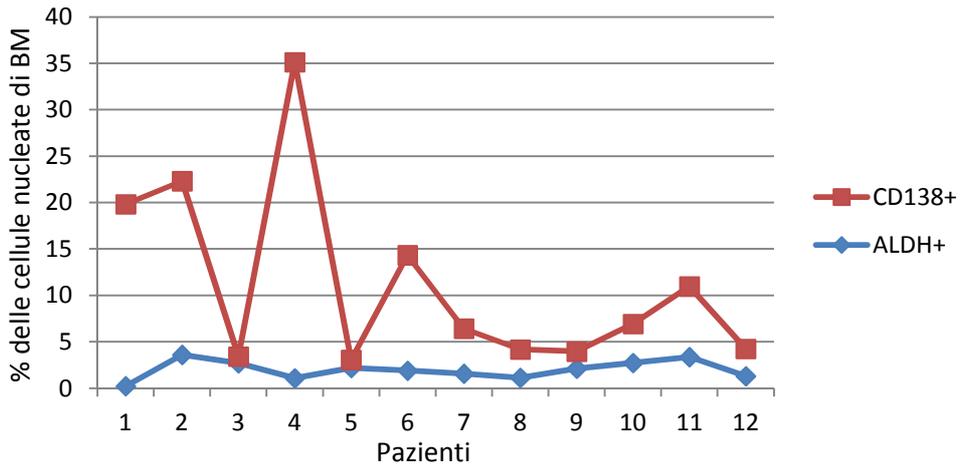
analizzate. Tale valore è coerente con i dati ottenuti tramite analisi Aldefluor di campioni di aspirato midollare prelevati da altri pazienti.

Il saggio per l'analisi della *side population* è un saggio funzionale poiché sfrutta l'attività delle pompe di membrana delle cellule staminali. Questa sua caratteristica però lo rende da una lato estremamente sensibile alle condizioni sperimentali che vanno ottimizzate *ad hoc* per ogni tipo di campione, e dall'altro difficilmente riproducibile e standardizzabile. Al contrario, il saggio Aldefluor si è rivelato essere di semplice esecuzione e riproducibile e pertanto se ne può ipotizzare un utilizzo routinario nella pratica di laboratorio clinico. A conferma di ciò, le due metodiche hanno prodotto risultati del tutto comparabili sia per il campione di linea cellulare che per quello di sangue midollare.

#### **4.3.6. Analisi con Aldefluor<sup>®</sup> Assay di campioni di sangue midollare di pazienti con MM ricaduto o refrattario**

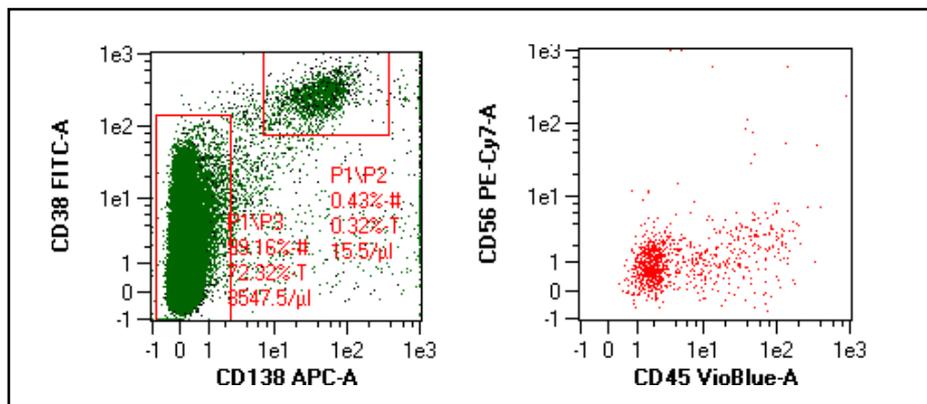
Abbiamo in seguito sottoposto ad analisi con aldefluor alcuni pazienti della nostra casistica di MM alla prima ricaduta di malattia prima e durante il trattamento terapeutico. Sono stati analizzati 12 campioni di sangue midollare prima dell'inizio della terapia, 4 campioni dopo tre cicli di terapia e 3 campioni dopo sei cicli di terapia. Basandoci sui dati descritti sopra, abbiamo effettuato l'analisi su campioni di sangue midollare intero, non depleto delle plasmacellule. Oltre che per l'aldefluor, le cellule sono state marcate anche per gli antigeni di superficie CD138, CD38, CD45 e CD56. La percentuale di cellule ALDH+ tra i diversi campioni raccolti prima dell'inizio del trattamento è dello 0,3 – 2,9% (mediana 1,38%) di tutte le cellule nucleate dell'aspirato midollare.

Anche in questa casistica di pazienti con MM, diversa da quella inizialmente analizzata nella fase di messa a punto della metodica, si conferma l'assenza di una correlazione diretta tra la percentuale di plasmacellule maligne presenti nel campione e la percentuale di cellule ALDH+ (Fig. 4.35).

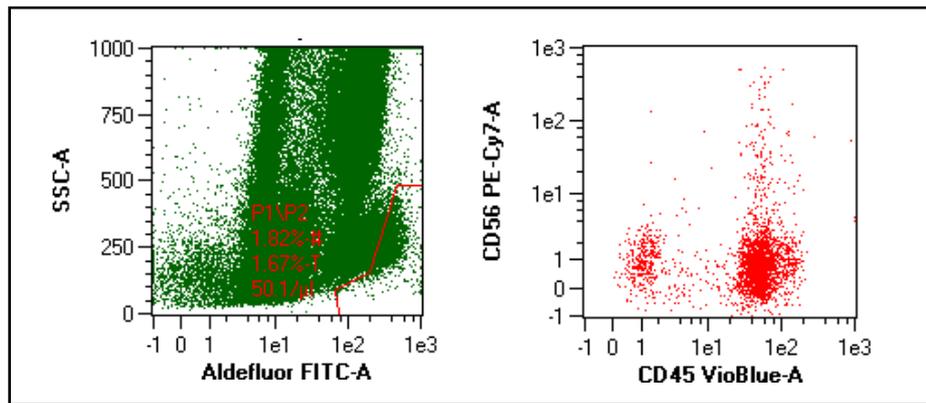


**Fig. 4.35** Rappresentazione della percentuale di cellule ALDH+ e delle plasmacellule CD138+ presenti nei campioni di sangue midollare di pazienti con MM ricaduto o refrattario.

In particolare, abbiamo osservato l'espressione dell'antigene CD56 nei nostri campioni di aspirato midollare, confrontando i dati ottenuti con la sola marcatura superficiale con quelli sottoposti anche alla colorazione con Aldefluor. La seguente figura rappresenta un esempio di analisi citofluorimetrica dello stesso campione di aspirato midollare.



A



**Fig. 4.36** Analisi di un campione di sangue midollare di un paziente con MM ricaduto/refrattario prima dell'inizio della terapia. A) Analisi immunofenotipica con marcatori di superficie, B) saggio Aldefluor e marcatori di superficie

Questi dati suggeriscono che la popolazione di cellule staminali presenti nel sangue midollare di pazienti con MM abbia un fenotipo coincidente con quello delle plasmacellule maligne. Ovvero, se le plasmacellule mielomatose non esprimono il marcatore CD56, non lo esprimono neanche le cellule ALDH+.

## 5. DISCUSSIONE

Il mieloma multiplo è una patologia molto complessa dal punto di vista della classificazione, della prognosi e delle strategie terapeutiche. Questa estrema eterogeneità si ripercuote sull'andamento clinico dei pazienti, che mostrano una significativa variabilità nella sopravvivenza globale OS (*Overall Survival*). Se da un lato vi è una parte dei pazienti con mieloma multiplo, pari circa ad unsesto del totale, che sopravvive per più di dieci anni dalla diagnosi, vi è d'altro canto una frazione di soggetti con decorso clinico molto aggressivo. Come per altre patologie, lo stato di funzionalità globale del paziente (*performance status*) dato dall'età, lo stadio della malattia, le caratteristiche biologiche e la risposta ai trattamenti del singolo paziente, influisce notevolmente sull'andamento clinico della malattia [16]. Data questa grande variabilità, vi è l'importanza clinica di una più dettagliata definizione della malattia e della stratificazione del rischio, nel tentativo di definire delle sottoclassificazioni che consentano un approccio terapeutico e gestionale mirato, basato anche sull'utilizzo di *biomarkers* di malattia.

I sistemi di stadiazione attualmente in uso per il mieloma multiplo (Durie & Salmon e ISS, vedi 1.3) forniscono una buona stima del carico di malattia e sono utili per il confronto dei pazienti negli studi clinici. Tuttavia, la loro valenza pratica nella stratificazione del rischio è spesso limitata [19]. Quest'ultima si basa principalmente, infatti, sulle diverse caratteristiche citogenetiche dei pazienti, che si associano ad un differente esito clinico, associate a fattori legati all'ospite ed agli indici di carico tumorale. Una grande importanza è oggi attribuita al miglioramento della definizione delle sottocategorie citogenetiche, il cui significato clinico e prognostico è oggi oggetto di revisione, anche grazie all'avvento di nuove terapie [16,17]. Inoltre, la diffusione di tecniche più moderne, come l'analisi del profilo di espressione genica (GEP), ha ampliato notevolmente il pannello delle alterazioni geniche riconosciute per il mieloma multiplo. Tuttavia i risultati dei diversi studi sono discordanti e non consentono di fatto una nuova definizione del rischio adattabile alla pratica clinica [17,22]. E'

evidente, pertanto, quanto ancora gli sforzi scientifici siano indirizzati a delineare linee guida più aggiornate ed approfondite.

In questo studio, in primo luogo, è stato analizzato il profilo di espressione dei microRNA in pazienti con nuova diagnosi di mieloma multiplo, nell'intento di ricercare nuovi biomarcatori che possano fornire informazioni maggiori sull'andamento e l'evoluzione della malattia per esigenze di classificazione.

Un biomarcatore ottimale dovrebbe essere facilmente accessibile con metodiche non invasive e dosabile in tutti i pazienti; inoltre dovrebbe garantire un buon grado di sensibilità e specificità per la patologia di cui è indice. Si pensa che microRNA circolanti abbiano un grande potenziale come marcatori diagnostici e prognostici grazie alle loro caratteristiche:

- i) le informazioni geniche che veicolano: essendo molecole regolatrici di determinati RNA messaggeri, i microRNA potrebbero garantire un buon grado di specificità per i processi biologici da questi regolati;
- ii) l'elevata stabilità mostrata nei diversi fluidi biologici: i miRNA infatti resistono alla digestione da parte delle RNAsi plasmatiche e a vari processi di stoccaggio (bollitura, congelamento prolungato, molteplici cicli di congelamento/scongelo, variazione del pH), perciò potrebbero costituire dei marcatori maneggevoli, di facile utilizzo;
- iii) la grande semplicità del prelievo: i miRNA circolanti nel sangue periferico sono estratti da piccole quantità di plasma/siero ottenute con l'avanzo di un semplice prelievo per emocromo; pertanto la loro estrazione consente di non sottoporre il paziente ad ulteriori indagini invasive.

Tuttavia, data la recente identificazione dei microRNA circolanti, non c'è ancora un consenso univoco sulla loro origine e sulle metodiche utilizzate per la loro estrazione e quantificazione [133].

In questo studio, è stato impostato un modello per l'analisi del profilo di espressione dei microRNA circolanti, applicabile in pazienti affetti da mieloma multiplo. Le difficoltà maggiori riguardano la scelta della tecnologia per l'analisi e la quantificazione dei microRNA. In letteratura sono descritti studi comparativi tra i diversi metodi di analisi dell'espressione dei miRNA (sequenziamento genico, qRT-PCR) che dimostrano che sia le tecnologie utilizzate, che la fonte da cui estrarre i miRNA (siero, plasma, esosomi, microvescicole) possono influenzare i risultati in maniera significativa [133]. Nel nostro caso abbiamo

scelto di utilizzare la qRT-PCR, una metodica semplice e facilmente eseguibile nei diversi laboratori, che consente di ottenere la misurazione dei livelli di miRNA in tempi relativamente brevi (circa 2 giorni). Inoltre, si è deciso di estrarre i miRNA dal plasma, a seguito di un esperimento comparativo tra plasma e siero che ne ha dimostrato la maggiore efficienza nell'estrazione. Una problematica di particolare rilievo è anche quella relativa alla quantificazione dell'RNA. E' verosimile che per svariate ragioni, la quantità di RNA presente nel plasma di un soggetto differisca, anche in modo notevole, rispetto a quella rilevabile in un altro individuo. Se si desidera praticare un'analisi comparativa tra i diversi soggetti, per valutare l'espressione differenziale di alcuni microRNA, è necessario ricorrere ad un metodo di standardizzazione per far sì che le differenze quantitative di partenza non si riflettano sulla misurazione dei microRNA. Si è deciso perciò, di partire da una quantità di plasma costante, (500µl) per standardizzare il protocollo (vedi 4.1.4), e successivamente i dati ottenuti dall'amplificazione sono stati normalizzati utilizzando un metodo che prevede il calcolo dei rapporti reciproci (*ratios*) tra tutti i microRNA rilevati con l'analisi. In questo modo si ottiene una quantificazione relativa dei miRNA, che elimina le differenze di quantità assolute calcolando il livello di espressione di ogni microRNA in relazione a tutti gli altri (vedi 4.1.5.1).

Nel raggruppare i pazienti in sottoclassi cliniche e prognostiche, ci siamo imbattuti nelle difficoltà di cui sopra. E' stato condotto uno studio di tipo retrospettivo, nel quale è stato selezionato un gruppo di pazienti di cui erano stati precedentemente conservati in laboratorio i campioni di plasma prelevati alla diagnosi. I pazienti presi in esame avevano caratteristiche cliniche molto eterogenee (Tab. 3.1), che riflettono la complessità con cui si manifesta questa malattia – mieloma secernente o non secernente, sintomatico o asintomatico, malattia ossea avanzata o asintomatica, presenza di localizzazioni extramidollari, citogenetica ad alto o basso rischio. In particolare, per quanto riguarda la citogenetica, non è stato possibile collezionare tutti i dati necessari per una sottoclassificazione completa. Non sempre, infatti, è possibile ricavare dal prelievo di sangue midollare una quantità di materiale sufficiente per eseguire lo studio delle caratteristiche citogenetiche delle cellule mielomatose. Per di più, pur vendendo una casistica monocentrica per lo studio dei microRNA circolanti, sono stati raccolti campioni di pazienti trattati in precedenza presso

altri centri, dove erano già stati valutati i parametri per la stadiazione, non sempre omogenei per tutti i soggetti.

La complessità della patologia si è riflessa anche nei risultati iniziali di questo studio, ottenuti mediante *cluster analysis*. Si è visto come il profilo di espressione dei microRNA, ricavato con un'analisi statistica non supervisionata, non abbia prodotto una suddivisione netta nemmeno tra campioni di donatori sani e di pazienti affetti da mieloma multiplo. Inoltre, la dimostrazione della presenza di cluster stabili all'interno del campione non è stata seguita poi dal riscontro di affinità tra i soggetti dal punto di vista clinico. Analogamente, anche le analisi supervisionate di *class comparison* tra donatori e pazienti hanno prodotto risultati negativi, in contrapposizione peraltro con i dati presenti in letteratura, che confermano l'esistenza di miRNA deregolati nel plasma di pazienti affetti da mieloma multiplo rispetto ai controlli sani [47]. Queste osservazioni suggeriscono che l'eterogeneità del mieloma multiplo richieda probabilmente la selezione di un campione di dimensioni maggiori e più omogeneo nelle caratteristiche cliniche, biologiche e citogenetiche, quando si analizzano i microRNA circolanti nel plasma e non nelle plasmacellule. Infatti, anche le analisi di *class comparison* in seguito condotte non hanno dimostrato una correlazione tra i parametri clinici comunemente utilizzati ed il profilo di espressione dei microRNA, a conferma della grande variabilità di espressione e funzione di queste molecole.

La nostra attenzione si è poi focalizzata sulla malattia ossea, un aspetto caratteristico del mieloma multiplo, che costituisce una variabile oggi misurata sulla base delle indagini radiologiche, facilmente disponibili per tutti i pazienti. Tuttavia, la radiologia tradizionale non offre informazioni riguardo l'evoluzione del rimodellamento osseo. Le nuove tecniche di *imaging* permettono di definire meglio l'entità dell'interessamento osseo (Risonanza Magnetica) e forniscono informazioni di tipo funzionale (PET), consentendo di valutare il grado di attività della malattia ossea [14]. Le metodiche di *imaging* più moderne potrebbero essere affiancate dall'analisi di marcatori biologici specifici, e fornire così in un futuro un quadro più definito della malattia ossea ed una guida migliore per scelte terapeutiche tempestive. E' stato infatti dimostrato che, in alcuni sottogruppi di pazienti asintomatici per malattia ossea, esiste un vantaggio in termini di sopravvivenza nei pazienti trattati con bifosfonati (terapia di prima

scelta per le lesioni osteolitiche ) rispetto a quelli che non ricevono trattamento [8].

L'analisi effettuata in questo studio, in merito all'espressione di microRNA in pazienti affetti da mieloma multiplo con o senza lesioni ossee sintomatiche, ha portato all'identificazione di un microRNA differenzialmente espresso tra i due gruppi: miR-193b. Dall'analisi di *class comparison* effettuata è infatti emerso che questo microRNA è iperespresso nei pazienti che presentano lesioni osteolitiche (vedi 4.1.6, Fig. 4.10), rispetto al gruppo di pazienti che non presentano queste lesioni.

In letteratura non esistono molti dati riguardanti miR-193b, tuttavia è stata già descritta una correlazione tra questo miRNA ed il mieloma multiplo. Uno studio pubblicato nel 2009 dimostra l'iperespressione di un cluster ben conservato, miR-193b-365, in plasmacellule di soggetti affetti da mieloma multiplo [134]. Sempre in ambito ematologico, la deregolazione di miR-193b è stata descritta anche nelle cellule maligne di Leucemia Mieloide Acuta, in cui è stata dimostrata una notevole ipoespressione di questo miRNA, associata alla correlazione inversa con i livelli di c-kit, oncogene responsabile del mantenimento della proliferazione cellulare, spesso elevati in questo tipo di tumori [135]. Pertanto, in questo caso miR-193b avrebbe funzione di oncosoppressore, com'è poi descritto anche per altre neoplasie, ad esempio il melanoma, in cui miR-193b è stato associato alla modulazione negativa dell'espressione della ciclina D1 [136].

La ricerca dei possibili geni bersaglio di miR-193b ha portato a risultati che paiono in linea con le analisi portate avanti in questo studio. Tra i diversi geni regolati dal *cluster* di miR-193 figurano infatti geni coinvolti nel metabolismo osseo e nella regolazione delle cellule protagoniste di questo processo (vedi 4.1.7).

Particolarmente interessante sembra la correlazione di miR-193 con l'espressione di geni (ING5) che regolano la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali del midollo osseo [120]. Queste cellule sono considerate multipotenti, poiché possono differenziarsi in osteoblasti, condrociti ed altri tipi cellulari. La loro attività sembra svolgere un ruolo importante nel mantenimento del metabolismo osseo, non soltanto come precursori diretti degli osteoblasti, ma anche come possibili sostenitori dell'osteoclastogenesi. E'

emerso, da esperimenti *in vitro*, che queste cellule esprimono RANKL, una molecola fondamentale per l'attivazione degli osteoclasti; inoltre i livelli di mRNA di RANKL sembrano ridursi una volta che queste cellule si siano differenziate in osteoblasti maturi. Come effetto della differenziazione delle cellule mesenchimali in osteoblasti maturi, si verifica un aumento dei livelli di OPG [121]. E' possibile che proprio a questo livello della regolazione del metabolismo osseo si svolga l'azione di miR-193. L'inibizione dell'espressione di ING5 da parte del *cluster* miR-193, infatti, consente la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali, ma non agisce sulla loro differenziazione [120]. Studi più approfonditi potranno validare l'effettiva azione su questi processi biologici.

Anche il coinvolgimento degli altri geni nella regolazione dell'omeostasi ossea sembra confermare il ruolo di questo miRNA nello sviluppo delle lesioni osteolitiche. Ad esempio, è stato evidenziato che gli osteoclasti maturi e i loro precursori esprimono un recettore funzionale di c-kit, che sarebbe in grado di mediare l'interazione di questi con le altre cellule del microambiente midollare, cellule stromali, fibroblasti e osteoblasti [124]. Per di più, uno studio recente ha dimostrato che l'Imatinib è in grado di influenzare il rimodellamento osseo con effetto antiosteoclastogenico proprio andando ad inibire la via di segnale di c-kit [125]. Poiché la modulazione di c-kit è già stata correlata alla deregolazione di miR-193b nella leucemia mieloide acuta [135] è possibile che questa correlazione esista anche per l'alterata omeostasi del metabolismo osseo.

Concludendo, il possibile coinvolgimento di miR-193b nel controllo dell'omeostasi ossea e la sua deregolazione in pazienti con lesioni ossee da mieloma multiplo potrebbero aprire la strada a studi più approfonditi per comprendere maggiormente l'azione di questo miRNA e per analizzarne la variazione d'espressione nel decorso della malattia ossea e a seguito della somministrazione delle terapie specifiche.

Un altro aspetto del mieloma multiplo che abbiamo studiato è stato l'immunofenotipo dei soggetti con patologia ricaduta/refrattaria. Benché i pazienti con MM spesso ottengano una risposta al trattamento iniziale, la malattia va comunque incontro ad una ripresa e nel tempo diventa refrattaria ad ulteriori trattamenti. Storicamente il mieloma ricaduto è stato trattato con agenti chemioterapici quali vincristina, ciclofosfamide e desametasone ad alte dosi

[137]. L'avvento dei nuovi agenti immunomodulanti come la lenalidomide, come anche dell'inibitore del proteasoma bortezomib hanno rivoluzionato il panorama terapeutico del mieloma ricaduto. Diversi studi hanno dimostrato un aumento della risposta terapeutica come effetto della combinazione di più agenti: l'aggiunta del desametasone al bortezomib ha portato ad un ulteriore 11-18% di risposta in più [138,139]. La ciclofosfamide, un agente alchilante con comprovata attività nel mieloma multiplo [140] è stata aggiunta nel tentativo di migliorare ulteriormente l'efficacia della combinazione di bortezomib e desametasone. Allo stesso modo anche l'agente immunomodulante lenalidomide viene utilizzato in combinazione con desametasone e ciclofosfamide per aumentare l'efficacia di trattamento nel mieloma ricaduto [141].

Nel nostro studio non sono state osservate differenze nella risposta alla terapia tra i pazienti che hanno ricevuto il trattamento a base di bortezomib o lenalidomide secondo lo schema descritto nel paragrafo 3.4. Pertanto, le analisi successive tengono conto della totalità dei pazienti senza distinzione tra i due bracci.

L'analisi della popolazione di plasmacellule tumorali presenti nei campioni di sangue midollare dei pazienti con MM ricaduto/refrattario ha mostrato, in accordo con dati di letteratura [142], che l'accuratezza della quantificazione del numero di plasmacellule in citofluorimetria può essere problematica a causa della diluizione con sangue periferico o dell'aumentata fragilità delle plasmacellule rispetto agli altri leucociti. Tenendo conto dell'analisi morfologica effettuata sugli stessi campioni di sangue midollare, si può dedurre che gran parte della sottostima osservata in citofluorimetria sia dovuta alla diluizione del sangue periferico o alla scarsa qualità del campione riservato all'analisi citometrica rispetto agli strisci utilizzati per l'indagine morfologica. Infatti, in molti centri, il materiale aspirato utilizzato per la valutazione morfologica e diagnostica costituisce la parte iniziale del prelievo, mentre i campioni riservati agli studi ancillari, come la citofluorimetria, sono prelevati successivamente e possono essere di cattiva qualità con poche cellule midollari poiché è stato prelevato sostanzialmente sangue periferico presente nelle nicchie. I risultati ottenuti con le due metodiche si dispongono su una forbice molto ampia, con alcuni campioni citofluorimetrici con pochissime plasmacellule rilevabili, e strisci

morfologici con più del 30% di plasmacellule. Pertanto, la citofluorimetria non ci da delle informazioni attendibili riguardo al carico tumorale presente nel midollo. Tuttavia, anche se in citometria si tende generalmente a sottostimare la numerosità delle plasmacellule nel midollo, essa è utile nella distinzione tra plasmacellule normali e maligne, e questo può essere molto importante nella valutazione dei campioni dopo trattamento.

L'analisi del profilo di espressione antigenico delle plasmacellule maligne si è dimostrato uno strumento utile per la diagnosi e l'identificazione di *markers* prognostici in diverse patologie ematologiche [143]. Tuttavia, nel contesto del mieloma multiplo, i tentativi di trovare un impatto prognostico delle caratteristiche immunofenotipiche delle plasmacellule hanno portato sovente a risultati contrastanti, probabilmente a causa dell'eterogeneità di trattamento dei pazienti. Nella nostra casistica di pazienti con MM ricaduto o refrattario abbiamo studiato il profilo immunofenotipico delle plasmacellule prima dell'inizio del trattamento con bortezomib o lenalidomide e poi durante la terapia per valutare l'eventuale risposta. Confrontando i dati ottenuti per i pazienti prima dell'inizio della terapia con quelli pubblicati in letteratura [144], è emerso che nella nostra casistica di 100 pazienti non è stato possibile individuare differenze significative in termini di risposta alla terapia. Sebbene la frequenza di espressione antigenica sia in linea con i dati ottenuti da altri gruppi, la nostra casistica è tuttavia troppo eterogenea per poter individuare dei profili immunofenotipici correlati alle caratteristiche della patologia. Le differenze riscontrate rispetto ad altri studi che hanno portato all'identificazione di antigeni la cui espressione ha un valore prognostico sull'esito clinico della malattia, sembra essere attribuibile alla tipologia di pazienti analizzati. Mentre in letteratura sono stati studiati pazienti alla diagnosi, noi abbiamo preso in esame pazienti già trattati con diversi tipi di terapia che sono andati incontro ad una ripresa di malattia, e che sono pertanto eterogenei anche dal punto di vista prognostico.

In seguito abbiamo analizzato i pazienti di sangue midollare dei pazienti dopo tre, sei e nove cicli di terapia. Anche in questo caso ci sono state in alcuni casi delle discrepanze tra i dati ottenuti con la valutazione morfologica dello striscio di midollo osseo e quelli rilevati in citometria. Ciò nonostante, l'analisi citofluorimetrica si è mostrata attendibile nel caso di campioni di pazienti in remissione clinica di malattia. Come detto in precedenza, rispetto all'analisi

morfologica, la citometria ha il vantaggio di poter discriminare tra plasmacellule maligne o normali. Nella nostra casistica, i pazienti in remissione clinica duratura di malattia mostravano all'analisi citofuorimetrica la presenza di sole plasmacellule normali.

Negli ultimi anni gli studi di genomica tumorale hanno messo in dubbio il dogma della biologia del tumore secondo cui i tumori derivano da una singola cellula con successive acquisizioni e l'accumulazione di mutazioni somatiche, selezioni sequenziali che portano alla dominanza del clone più adatto [145]. In particolare gli studi di *deep sequencing* hanno portato a contrastare questo modello ed a rivelare un'architettura clonale più complessa, in cui la progressione tumorale avanza in maniera ramificata piuttosto che lineare, conducendo ad una sostanziale diversità clonale ed alla coesistenza di una vasta eterogeneità genetica [146]. Questo tipo di evoluzione è stata riscontrata anche nel nostro studio (vedi 4.2.4) con l'individuazione in citofluorimetria di due cloni immunofenotipicamente differenti prima dell'inizio della terapia che hanno poi avuto una differente evoluzione in corso di trattamento. Mentre nel campione iniziale si rilevava la presenza di un clone dominante di plasmacellule maligne ed a stento si riuscivano ad individuare cellule con un diverso immunofenotipo, dopo sei cicli di trattamento, abbiamo notato una riduzione del clone principale in favore del secondario. Questi dati supportano l'ipotesi di una pressione selettiva esercitata dal trattamento terapeutico verso i cloni maggiormente espressi, che favorisce l'emersione di nuovi cloni resistenti.

Ci siamo in seguito concentrati sull'analisi immunofenotipica del sangue periferico dei pazienti con mieloma multiplo. Abbiamo valutato le diverse popolazioni di linfociti B, T e cellule NK notando una riduzione delle numerosità di queste cellule dopo i primi cicli di terapia, imputabile alla citotossicità ed all'attività immunosoppressoria del corticosteroide desametasone. In particolare sono state analizzate le cellule immunosoppressive di derivazione mieloide (MDSC). Negli ultimi anni è stata stabilita l'importanza del ruolo delle MDSC nella regolazione della risposta immunitaria del tumore. Questo gruppo eterogeneo di cellule mieloidi è costituito da progenitori mieloidi attivati e cellule mieloidi immature con una potente attività immunosoppressoria [147]. In condizioni fisiologiche, le cellule mieloidi immature differenziano rapidamente in cellule mieloidi mature. L'accumulo di MDSC nel contesto tumorale è il risultato

di due processi: l'espansione del comparto mieloide immaturo e il blocco del loro differenziamento. Nell'uomo le MDSC sono definite dall'immunofenotipo  $Lin^-/HLA-DR^-/CD33^+/CD11b^+$ . In letteratura è riportata la presenza di alterazioni nei livelli di MDSC circolanti [148]. Nella nostra casistica di pazienti con MM ricaduto o refrattario abbiamo rilevato, prima dell'inizio della terapia una percentuale variabile di MDSC circolanti. Sebbene, come nel caso delle altre analisi immunofenotipiche, i pazienti sono estremamente eterogenei per poter individuare un *pattern* distintivo correlato alla clinica, abbiamo osservato tuttavia un *trend* crescente della percentuale di MDSC circolanti con l'aumentare della stadiazione di malattia secondo i criteri ISS. Questo dato è in accordo con l'ipotesi che un accumulo delle MDSC inibisca la risposta immunitaria antitumorale. Un altro aspetto importante dell'azione delle MDSC è la loro interazione con la terapia antimieloma. Studi recenti suggeriscono una riduzione dell'attività citotossica dell'inibitore del proteasoma bortezomib in presenza di quantità crescenti di MDSC [149]. Anche in questo lavoro abbiamo osservato un aumento progressivo delle MDSC presenti nel sangue periferico di un paziente in trattamento con bortezomib in cui è stata riscontrata una ripesa della malattia. Al contrario, è stata osservata una remissione clinica duratura della malattia nel caso di una mancata espansione della popolazione MDSC durante il trattamento con bortezomib. Nell'insieme, questi dati corroborano l'ipotesi di un'azione immunomodulante delle MDSC nell'attività antitumorale del bortezomib.

Un'altra caratteristica del mieloma multiplo investigata in questo lavoro è quella delle cellule staminali tumorali. E' stata così messa a punto una metodica per l'analisi delle cellule staminali di mieloma multiplo mediante il saggio Aldefluor che rileva l'attività dell'enzima aldeide deidrogenasi, caratteristico delle cellule staminali. Questo enzima ha un ruolo importante nel processo di detossificazione delle cellule, e può pertanto influenzare la resistenza al trattamento terapeutico. In molte patologie neoplastiche la capacità di auto rinnovamento è aumentata all'interno delle sottopopolazioni di cellule staminali tumorali, che sono fenotipicamente distinte dalla parte preponderante del tumore. Sia le plasmacellule normali che quelle mielomatose mostrano un'espressione uniformemente elevata di CD138, ma i campioni prelevati da pazienti contengono sottopopolazioni relativamente piccole che esprimono a

bassi livelli o non esprimono affatto questo antigene di superficie [151]. Dall'analisi dei campioni di sangue midollare di soggetti con mieloma multiplo è emersa una mancanza di correlazione tra la numerosità delle cellule ALDH+ e il carico tumorale di plasmacellule. Questa evidenza è a favore dell'ipotesi della presenza di una minima componente di cellule staminali a fronte di una numerosa frazione di cellule tumorali che costituiscono la maggior parte del tumore ma che sono terminalmente differenziate e pertanto prive di capacità proliferativa. Lo studio degli antigeni di superficie espressi dalle cellule ALDH+ ha mostrato la presenza degli antigeni CD27 e CD20 e l'assenza del CD138 (marcatore tipico delle plasmacellule mature), anche se non in tutti i campioni. La negatività per l'antigene CD138 è confermata anche dai dati ottenuti sottoponendo al saggio Aldefluor cellule purificate mediante separazione immunomagnetica per il marcatore CD138. Questi dati sono confortati da studi recenti che confermano la possibilità arricchire la popolazione di cellule staminali del mieloma multiplo sulla base dell'espressione dell'antigene CD138 e della positività per Aldefluor [152]. In seguito abbiamo cercato di individuare nuovi antigeni specifici per le cellule staminali di mieloma multiplo. Tra i vari antigeni leucocitari di cui è stata analizzata l'espressione, il CD56 è risultato quello più interessante da indagare. Questa glicoproteina di membrana ha un ruolo nel meccanismo di adesione cellulare. La sua espressione è stata descritta in diversi tumori solidi come il carcinoma polmonare a piccole cellule ed il sarcoma di Ewing [150]. Le plasmacellule neoplastiche di MM esprimono il CD56 in maniera aberrante nel 70-80% dei casi ed è il marcatore più utile per distinguere le plasmacellule maligne da quelle sane. Nei campioni da noi analizzati è stata riscontrata una popolazione di cellule CD56+ all'interno delle cellule ALDH+-CD34-. L'espressione del CD56 è variabile tra i diversi campioni ma sembra correlare con la percentuale di infiltrazione delle plasmacellule. In aggiunta, non è stata riscontrata la presenza di cellule ALDH+/CD34-/CD56+ nei campioni di aspirato midollare di soggetti con diversa condizione patologica. Lo studio della popolazione staminale ALDH+ all'interno della casistica di pazienti con MM ricaduto o refrattario sostiene i risultati ottenuti in precedenza. Confermando la presenza di una quota ridotta di cellule tumorali del MM con caratteristiche di staminalità che possono costituire il serbatoio di cellule tumorali resistenti alla terapia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Rajkumar SV. et al., *Approach to the treatment of multiple myeloma: a clash of philosophies*, Blood 2011, 118.
2. Yaccoby S. et al., *Mature myeloma cells are proliferative with self-renewal potential*, Blood, 1997, 92.
3. Yaccoby S. et al., *Primary plasma cells growing in SCID-hu mice: a model for studying the biology and the treatment of multiple myeloma manifestations*, Blood 1998, 92.
4. Laubach J. et al., *Multiple Myeloma*, Annual review of Medicine 2011; 62.
5. Korde N. et al., *Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies*, Blood 2011, 117.
6. Kyle RA. Et al., *Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma*, Leukemia 2009, 23.
7. Anderson K. et al., *Pathogenesis of Myeloma*, Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease 2011, 6.
8. Terpos E. et al., *Advances in Imaging and the Management of Myeloma Bone Disease*, Journal of Clinical Oncology 2011, 29.
9. Kristinsson SY. et al., *Bone disease in multiple myeloma and precursor disease: novel diagnostic approaches and implications on clinical management*, Expert Review of Molecular Diagnosis 2011, 11.
10. Roodman GD. et al., *Pathogenesis of myeloma bone disease*, leukemia 2009, 23.
11. Yaccoby S. et al., *Advances in the understanding of myeloma bone disease and tumour growth*, British Journal of Haematology 2010, 149.
12. Roodman GD et al., *Osteoblast function in myeloma*, Bone 2011, 48.
13. Yaccoby s. et al., *Osteoblastogenesis and tumour growth in multiple myeloma*, Leukemia Lymphoma 2010, 51.
14. Dimopoulos M. et al., *International Myeloma Working Group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple myeloma*, Leukemia
15. Terpos E. et al., *The use of biochemical markers of bone remodeling in multiple myeloma: a report of the International Myeloma Working Group*, Leukemia 2010, 24.
16. Kapoor P. and Rajkumar SV. *Update on risk stratification and treatment of newly diagnosed multiple myeloma*, International Journal of Haematology 2011, 94.
17. Fonseca R. et al., *International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review*, Leukemia 2009, 23.
18. Kumar S. et al., *Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high risk cytogenetics*, Blood 2012, 119.

19. Kyle RA. and Rajkumar SV. *Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma*, Leukemia 2009, 23.
20. Palumbo A. and Anderson K., *Multiple myeloma*, New England Journal of Medicine 2011, 364.
21. Rajkumar SV, *Multiple Myeloma: 2012 update on Diagnosis, Risk-stratification and management*, American Journal of Hematology 2012, 87.
22. Shaughnessy JD Jr, *A validated gene expression model of high risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1*, Blood 2007, 109.
23. Waheed S., *Standard and novel imaging methods for multiple myeloma correlates with prognostic laboratory variables including gene expression profiling data*, Haematologica 2012, 97.
24. Pichiorri F., *MicroRNAs: new players in multiple myeloma*, Frontiers in Genetics 2011, 2.
25. Lee RC. et al., *The C. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*, Cell 1993, 75.
26. Winter J., *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation* Nature cell biology 2009, 11.
27. Olena AF., *Genomic organization of miRNAs*, Journal of Cellular Physiology 2010, 222.
28. Pasquinelli AE., *MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship*, Nature Reviews, Genetics 2012, 13.
29. Vasilatou D., *The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis*, European Journal of Haematology 2009, 84.
30. Kong WY, *MicroRNAs in cancer management*, Lancet Oncology 2012, 13.
31. Calin GA and Croce CM, *Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*, Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 2002, 99.
32. Lujambio A and Lowe SW., *The microcosmos of cancer*. Nature 2012, 482.
33. Khoshnaw SM., *MicroRNA involvement in the pathogenesis and management of breast cancer*, Journal of Clinical Pathology 2009, 62.
34. Ma R et al., *Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application*, Journal of Experimental & Clinical Research 2012, 31.
35. Lawrie CH., *Detection of elevated levels of tumor-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma*, British Journal of Haematology 2008, 141.
36. Brase JC, *Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer*. Molecular Cancer 2010, 9.
37. El-Hefnawy T et al., *Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnosis*, Clinical Chemistry 2004, 50.
38. Weber JA., *The microRNA Spectrum in 12 Body Fluid*, Clinical Chemistry 2010, 56.
39. Kosaka N., *Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis*, Cancer Science 2010, 101.
40. Chen X., *Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other disease*, Cell Research 2008, 18.
41. Moussay E. *MicroRNA as biomarkers and regulators in B-cell chronic lymphocytic leukemia*, Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 2011, 108.

42. Fang C., *Serum microRNAs are promising novel biomarkers for diffuse large B cell lymphoma*, *Annals of Hematology* 2012, 91.
43. Schotte D., *MicroRNAs in acute leukemia: from biological players to clinical contributors*, *Leukemia* 2012, 26.
44. Benetatos L., *Deregulated MicroRNAs in Multiple Myeloma*. *Cancer* 2012, 118.
45. Löffler D., *Interleukin-6-dependent survival of multiple myeloma cells involves the Sta3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer*, *Blood* 2007, 113.
46. Roccaro AM., *MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma*, *Blood* 2009, 110.
47. Huang JJ., *Circulating microRNA expression is associated with genetic subtype and survival of multiple myeloma*, *Medical Oncology* 2012, 31.
48. Yoshizawa S., *Downregulated plasma miR-92a levels have clinical impact on multiple myeloma and related disorders*, *Blood Cancer Journal* 2012, 2.
49. Rajkumar SV. et al., *Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomized controlled trial*, *Lancet Oncology* 2010, 11.
50. Cavo M., et al., *Bortezomib-thalidomide-dexamethasone compared with thalidomide-dexamethasone as induction and consolidation therapy before and after double autologous transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results from a randomized phase 3 study [abstract]*. *Blood* 2010, 116
51. Rajkumar SV., *Treatment of myeloma: cure versus control*, *Mayo Clinic Proceedings* 2008, 83.
52. Adams J, *The proteasome: structure, function, and role in the cell*, *Cancer Treatment Review* 2003, 29.
53. Ciechanover A, *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway*, *Cell* 1994, 79.
54. Ciechanover A, *The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life*, *EMBO* , 1998, 17.
55. Groll et al., *Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution*, *nature* 1997, 386.
56. Obeng EA. et al, *Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells*, *Blood* 2006, 107.
57. Adams J., *The proteasome: a suitable antineoplastic target*, *Nature Reviews Cancer* 2004, 4.
58. Dick LR. et al., *Building on Bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anticancer therapy*, *Drug Discovery Today* 2010, 15.
59. Jain S. et al., *Emerging role of Carfilzomib in treatment of relapsed and refractory multiple myeloma*, *Core Evidence* 2011, 6.
60. Kupperman E. et al., *Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer*, *Cancer Research* 2010, 70.
61. Boccadoro M et al., *Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor Bortezomib in cancer therapy*, *Cancer Cell Int.* 2005, 5.
62. Reddy N. et al., *Enhancing activity and overcoming chemoresistance in hematologic malignancies with bortezomib: preclinical mechanistic studies*, *Annals Oncology* 2010, 21.

63. Hideshima T. et al., *mechanism of action of proteasome inhibitors and deacetylase inhibitors and the biological basis of synergy in multiple myeloma*, Molecular Cancer Therapy 2011, 10.
64. Wright JJ. et al., *Combination therapy of bortezomib with novel target agents: an emerging treatment strategy*, Clinical Cancer Research 2010, 16.
65. Zangari M. et al., *Impact of bortezomib on bone health in myeloma: a review of current evidence*, Cancer Treatment Reviews 2011, 12.
66. Agajanian C. et al., *A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies*, Clinical Cancer Research 2002,8.
67. Orłowski RZ. et al., *Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies*, Journal of Clinical Oncology 2002, 20.
68. Papandreou CN. et al., *Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer*, Journal of Clinical Oncology, 2004,22.
69. Richardson PG. et al., *Bortezomib or high-dose dexamethasone in relapsed multiple myeloma*, New England Journal of Medicine 2005, 352.
70. Cavaletti et al., *Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: a neurophysiological and pathological study in the rat*, Experimental Neurology 2007, 204.
71. Cszimadia V. et al., *Effect of an experimental proteasome inhibitor on the cytoskeleton, cytosolic protein turnover, and induction in the neural cells in vitro*, Neurotoxicology 2008, 29.
72. Silverman L. et al., *Proteasome inhibitor associated neuropathy is mechanism based*, Blood 2008, 112.
73. Delforge M. et al., *Treatment-related peripheral neuropathy in multiple myeloma: the challenge continues*, Lancet Oncology 2010,11.
74. Mohty B. et al., *Peripheral neuropathy and new treatments for multiple myeloma: background and practical recommendations*, Hematologica 2010, 95.
75. Richardson PG et al., *Management of treatment-emergent peripheral neuropathy in multiple myeloma*, Leukemia 2012, 26.
76. Sonneveld P, et al., *Dealing with neuropathy in plasma-cell dyscrasias*, Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2010, 423.
77. San Miguel J. et al., *A practical update on the use of bortezomib in the management of multiple myeloma*, Oncologist 2006,11.
78. Lonial S. et al., *Risk factors and kinetics of thrombocytopenia associated with bortezomib for relapsed, refractory multiple myeloma*, Blood 2005,106.
79. Hrusovsky I et al., *Bortezomib treatment in relapsed multiple myeloma: results from a retrospective multicentre survey in Germany and Switzerland*, Oncology 2010, 79.
80. Mitsiades N, et al., *The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications*, Blood 2003, 101.
81. Orłowski RZ et al., *Phase 1 trial of the proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies*, Blood 2005, 105.
82. Jagannath S et al., *Bortezomib in combination with dexamethasone for the treatment of patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma with less than optimal response to bortezomib alone*, Hematologica 2006, 91.

83. Mikhael JR et al., *High response rate to bortezomib with or without dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: results of a global phase 3b expanded access program*, British Journal of Haematology 2009, 144.
84. Lonial S. et al., *Treatment options for relapsed and refractory multiple myeloma*, Clinical Cancer Research 2011, 17.
85. Singhal S. et al., *Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma*, New England Journal of Medicine 1999, 341.
86. Bartlett JB. Et al., *The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents*, Nature reviews Cancer 2004, 4.
87. Marriott JB. et al., *Thalidomide derived immunomodulatory drugs (IMiDs) as potential therapeutic agents*, Current Opinion in Drug Targets Immune Endocrine Metabolic Disorders 2003, 3.
88. Anderson KC. *Lenalidomide and thalidomide: mechanisms of action-similarities and differences*. Seminars in Hematology 2005, 42.
89. Chanan-Khan A. et al., *In vivo evaluation of immunomodulating effects of lenalidomide on tumor cell microenvironment as a possible underlying mechanism of the antitumor effects observed in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL)*, Blood 2005, 106.
90. Kumar S. et al., *Mobilization in myeloma revisited: IMWG consensus perspectives on stem cell collection following initial therapy with thalidomide-, lenalidomide-, or bortezomib-containing regimens*, Blood 2009, 114.
91. Rajkumar SV. et al., *Combination therapy with thalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed myeloma*, Journal of Clinical Oncology 2002, 20.
92. Weber D. et al., *Thalidomide alone or with dexamethasone for multiple myeloma*, Blood 1999, 94.
93. Cavo M. et al., *First-line therapy with thalidomide and dexamethasone in preparation for autologous stem cell transplantation for multiple myeloma*, Haematologica 2004, 89.
94. Rajkumar SV. et al., *Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma*, Blood 2005, 106.
95. Rajkumar SV et al., *lenalidomide plus high dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open label randomized controlled trial*, Lancet Oncology 2010, 11.
96. Harousseau J. et al., *Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of an IFM phase II study*, Haematologica 2006, 91.
97. Jagannath S. et al., *Bortezomib therapy alone and in combination with dexamethasone for previously untreated symptomatic multiple myeloma*, British Journal of Hematology 2005, 28.
98. Jacobus S. et al., *Outcome of elderly patients 70 years and older with newly diagnosed multiple myeloma in the ECOG randomized trial of lenalidomide/high dose dexamethasone (RD) versus lenalidomide/low dose dexamethasone (Rd)*, Haematologica 2010, 95.
99. Gay F. et al., *Safety and efficacy of lenalidomide plus dexamethasone in elderly myeloma patients 70 years of age and older*, Haematologica 2010, 95.
100. Anderson KC. Et al., *Clinically relevant end points and new drug approvals for myeloma*, Leukemia 2008, 22.

101. Magrangeas F. et al., *Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma*, Leukemia 2013, 27.
102. Moreau P. et al., *Multipel myeloma: so much progress, but so many unsolved questions*, Haematologica 2013, 98.
103. Dimopoulos MA., et al., *Emerging therapies for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma*, European Journal of Hematology 2011, 86.
104. Moreau P. et al., *The future of therapy for relapsed/refractory multiple myeloma*, European Journal of hematology 2012, 49.
105. Harousseau JL. Et al., *Better quality of response to lenalidomide plus dexamethasone is associated with improved clinical outcomes in patients with relapsed or refractory multiple myeloma*, Haematologica 2010, 95.
106. Dimopoulos MA. et al., *Treatment of patients with relapsed/refractory multiple myeloma with lenalidomide and dexamethasone with or without bortezomib: prospective evaluation of the impact of cytogenetic abnormalities and previous therapies*, Leukemia 2010, 24.
107. Hamburger AW. And Salmon SE., *Primary bioassay of human cancer stem cells*, Science 1977, 197
108. Bataille R. et al., *The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy*, Haematologica 2006, 91.
109. Goodell MA. Et al., *Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vitro*, Journal of Experimental Medicine 1996, 183.
110. Douville J. et al., *ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitors cells*, Stem cells and development 2009, 18.
111. Pilarski LM. et al., *Monoclonal circulating B cells in multiple myeloma. A continuously differentiating, possible invasive, population defined by expression of CD45 isoforms and adhesion molecules*, Hematol Oncol Clin North Am 1992, 6.
112. Billadeau D. et al., *The bone marrow of multiple myeloma patients contains B cells population at different stages of differentiation that are clonally related to the malignant plasma cell*, Journal of experimental Medicine 1993, 178.
113. Bergsagel PL. et al., *In multiple myeloma, clonotypic B lymphocytes are detectable among CD19+ peripheral blood cells expressing CD38, CD56, and monotypic Ig light chain*, Blood 1995, 85.
114. Rasmussen T. et al., *High numbers of clonal CD19+ cells in the peripheral blood of patient with multiple myeloma*, British Journal of Haematology 1999, 105.
115. Matsui W. et al., *Characterization of clonogenic multiple myeloma cells*, Blood 2004, 103.
116. Matsui W. et al., *Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cells properties, and drug resistance*, Cancer Research 2008, 68.
117. Yaccoby S. and Epstein J., *The proliferative potential of myeloma plasma cells manifest in the SCID-hu host*, Blood 1999, 94.
118. Yaccoby S. et al., *Primary myeloma cells growing in SCID-hu mice: a model for studying the biology and treatment of myeloma and its manifestations*, Blood 1998, 92.
119. Nair B., *Immunoglobulin isotypes in multiple myeloma: laboratory correlates and prognostic implications in total therapy protocols*, British Journal of Haematology 2008, 145.

120. Wang J. et al., *MicroRNA-193 pro-proliferation effects for Bone Mesenchymal Stem Cells after Low-level Laser Irradiation Treatment through Inhibitor of Growth family, member 5*, Stem Cells and Development 2012, 21.
121. Bielby R. et al., *The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone injury*, International Journal for the care of the injured 2007, 38.
122. Andress DL., *IGF-binding protein-5 stimulates osteoblast activity and bone accretion in ovariectomized mice*, American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 2001, 281.
123. Zhang L. et al., *The role of Calmodulin in the Regulation of Osteoclastogenesis*, Endocrinology 2003, 144.
124. Gattei V. et al., *Human Osteoclasts and Preosteoclast Cells (FLG 29.1) Express Functional c-kit Receptors and Interact with Osteoblast and Stromal Cells via Membrane-bound Stem Cell Factor*, Cell growth and differentiation 106, 7.
125. Vandyke K. et al., *Dysregulation of bone remodeling by imatinib mesylate*, Blood 2010, 115.
126. San Miguel JF. Et al., *Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patient*, Blood 1997, 90.
127. Al-Quran S.Z. et al., *Assessment of bone marrow plasma cell infiltrates in multiple myeloma: the added value of CD138 immunohistochemistry*, Human Pathology 2007, 28.
128. Smock KJ. et al., *Quantitation of plasma cells in bone marrow aspirates by flow cytometric analysis compared with morphologic assessment*, Archives of Pathology & Laboratory Medicine 2007, 131.
129. Nizar J.B., *Darwinian evolution and tiding clones in multiple myeloma*, Blood 2012, 120.
130. Ramachandran IR. et al., *Myeloid-derived suppressor cells regulate growth of multiple myeloma by inhibiting T cells in bone marrow*, Journal of immunology 2013, 190.
131. Görgün GT. et al., *Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans*, Blood 2013, 121.
132. Petriz J., *Flow cytometry of the side population (SP)*, Current protocols in cytometry, 2007, 9.
133. Reid G., *Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers*, Critical Reviews of Oncology/Hematology, 2010.
134. Uno K. et al., *Identification of a novel microRNA cluster miR-193b-365 in multiple myeloma*, Leukemia & Lymphoma 2009, 50.
135. Gao Xiao-ning et al., *MicroRNA-193b regulates c-Kit proto-oncogene and represses cell proliferation in acute myeloid leukemia*, Leukemia Research 2011, 35.
136. Chen J. et al., *MicroRNA-193b represses cell proliferation and regulates cyclin-D1 in melanoma*, The American Journal of Pathology 2010, 176.
137. Anderson H. et al., *VAD chemotherapy as remission induction for multiple myeloma*, British Journal of Cancer 1995, 71.
138. Richardson PG. et al., *A phase II study of bortezomib in relapsed refractory multiple myeloma*, New England Journal of Medicine 2003, 348.
139. Richardson PG. et al., *Bortezomib or high dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma*, New England Journal of Medicine 2005, 352.

140. Bergsagel DE. et al., *Phase I/II trial assessing bortezomib and melphalan combination therapy for the treatment of patients with relapsed or refractory multiple myeloma*, Journal of Clinical Oncology 1972, 24.
141. Dimopoulos M. et al., *Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma*, New England Journal of Medicine 2007, 357.
142. Braylan RC. et al., *Impact of flow cytometry on the diagnosis and characterization of lymphomas, chronic lymphoproliferative disorders and plasma cell neoplasias*, Cytometry 2004, 58.
143. Schroers R. et al., *Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia*, Leukemia 2005, 19.
144. Mateo G. et al., *Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy*, JCO 2008, 26.
145. Nowell PC. et al., *The clonal evolution of tumor cell populations*, Science 1976, 194.
146. Marusyk A. et al., *Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?*, Nature Reviews Cancer 2012, 12.
147. Gabrilovich D.I. and Nagaraj S., *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*, Nature Reviews Immunology 2009, 9.
148. Serafini P. et al., *Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function*, Journal of Experimental Medicine 2006, 203.
149. Görgün TG. et al., *Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) regulate tumor growth immune response and regulatory T cell (Treg) development in the multiple myeloma bone marrow microenvironment*, 54<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition 2012.
150. Gardner LJ. et al., *Identification of CD56 and CD57 by flow cytometry in Ewing's sarcoma or primitive neuroectodermal tumor*, European Journal of Pathology 1998, 433.
151. Jakubikova J. et al., *Lenalidomide targets clonogenic side population in multiple myeloma: pathophysiologic and clinical implications*, Blood 2011, 117.
152. Toshihiko T. et al., *Growth differentiation factor 15 enhances the tumor-initiating and self-renewal potential of multiple myeloma cells*, Blood 2014, 123.
153. Paino T. et al., *CD20 positive cells are undetectable in the majority of multiple myeloma cell lines and are not associated with a cancer stem cell phenotype*, Haematologica 2012, 97.
154. Christensen JH. et al., *Characterization of potential CD138 negative myeloma "stem cells"*, Haematologica 2012, 97.
155. Hajek R. et al., *Myeloma stem cell concepts, heterogeneity and plasticity of multiple myeloma*, British Journal of Hematology, 2013, 10.