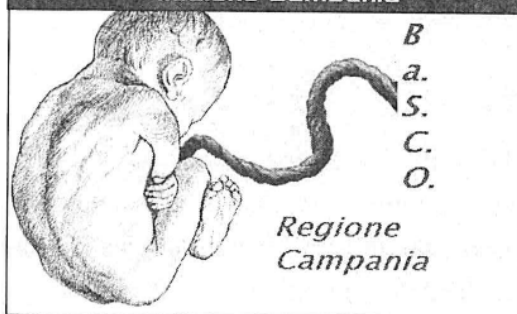




PROGETTO DI RICERCA

“The possible effects of Maternal Microchimerism on outcome of Allogenic Hematopoietic Stem Cell Transplantation from Unrelated Cord Blood Units (UCB): graft failure, occurrence and severity of graft-versus-host-disease, relapse rate.”

BACKGROUND

Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche ha contribuito in modo significativo al miglioramento della prognosi dei pazienti ematologici. Per i pazienti che non dispongono di un donatore familiare, sono state sviluppate negli ultimi 20 anni numerose strategie per la ricerca di un donatore alternativo, come il donatore adulto da registro (MUD), le unità di sangue cordonale adeguatamente caratterizzate e criopreservate (UCB), più recentemente il donatore familiare aplocompatibile. Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia del UCB come fonte alternativa di cellule staminali ematopoietiche; in particolare, studi condotti su pazienti pediatrici hanno evidenziato una sopravvivenza globale e una sopravvivenza libera da malattia sovrapponibili al trapianto da MUD (*Barker et al, Blood 2001*), con lo svantaggio di un attecchimento più lento ma con il vantaggio di una minore incidenza e severità di GVHD (*Rocha et al, NEJM 2000*). Inoltre, l'HSCT da cellule cordonali è caratterizzato da una minore incidenza di recidiva leucemica post-trapianto (*Oran et al, Hematology 2012*), suggerendo che l'attività GvL del trapianto da sangue cordonale è mediata da meccanismi diversi da quelli che provocano GVHD. van Rood et al (*PNAS 2012*), con un'analisi retrospettiva su più di 800 casi, hanno fornito una evidenza indiretta che la attività GvL del HSCT-CB può essere mediata da cellule materne presenti nel sangue cordonale (MMc) e immunizzate verso antigeni paterni ereditati dal feto (IPAs). Infatti, i pazienti che condividevano uno o più antigeni HLA con gli IPAs dell'unità cordonale trapiantata avevano una significativa riduzione della relapse-rate, senza aumento significativo della GVHD. Inoltre, è possibile che le cellule T materne che hanno attraversato la placenta siano T memory cells, IPA-alloreattive; questo spiegherebbe la resistenza dell'effetto IPA alle terapie immunosoppressive abitualmente usate nel post-trapianto (*Burlingham et al, PNAS 2012*).

Per microchimerismo si intende la presenza di cellule geneticamente diverse in un individuo ospite in proporzione inferiore all'1%. La condizione naturale più comune causa di microchimerismo è la gravidanza, in cui il traffico bidirezionale di cellule a livello della placenta può determinare un *engraftment* stabile di cellule emopoietiche sia nella madre che nel feto, con effetti rilevanti sulla memoria immunitaria di entrambi (ad es. tolleranza fetale verso i Non Inherited Maternal Antigens (NIMA), effetto NIMA

osservato nella fase post-trapianto di cellule staminali emopoietiche (*van Rood et al, PNAS 2009, Van der Zanden et al, Biol Blood Marrow Transplant 2014*) e di organi solidi (*Jankowska-Gan et al, Transplantation 2011*). La presenza di cellule materne nel sangue di cordone ombelicale (MMc) è stata descritta già nel 1995 (*Hall et al, Blood 1995, Petit et al, Exp Hematol 1995 Scaradavou et al, Blood 1996*), analizzata con metodologie e risultati differenti, con un range dal 20% al 100% di presenza nelle unità esaminate. Strumentazioni e metodiche più avanzate sono state validate successivamente, con notevole miglioramento della sensibilità e accuratezza dei test (*Kletzel et al, Chimerism 2013*), così come sono state recentemente descritte procedure di FACS sorting con utilizzo di anticorpi anti-HLA in grado di separare da campioni di sangue cordonale cellule microchimeriche materne vitali, in modo da consentirne una valutazione fenotipica e/o funzionale (*Eikmans et al, Chimerism 2011*).

OBIETTIVI

Il progetto propone più livelli e/o fasi di analisi:

1. valutazione quantitativa del MMc in unità di UCB) mediante un approccio basato sulle differenze HLA madre-figlio (*HLA-specific real-time Polymerase Chain Reaction*), allo scopo di definire con accuratezza la presenza e la entità di MMc nelle unità UCB.
2. la possibilità di separare cellule microchimeriche materne dal sangue cordonale è stata descritta di recente da Eikmans et al. La procedura citofluorimetrica di HLA-targeted FACS sorting consente di isolare le cellule materne presenti nel sangue cordonale attraverso la marcatura con una coppia di anticorpi monoclonali anti-HLA, originando una popolazione arricchita di cellule materne vitali. Lo studio si propone di isolare le eventuali cellule microchimeriche materne, sulle quali eseguire successivamente analisi di tipo fenotipico e/o funzionale.
3. dimostrazione diretta di eventuali cellule materne nel ricevente di HSCT-CB mediante HLA-allele specific qPCR nella fase post-trapianto

2. Rocha V et al. *Graft-Versus-Host Disease in Children Who Have Received a Cord-Blood or Bone Marrow Transplant from an HLA-Identical Sibling*. *N Engl J Med* 2000, 342:1846-1854
3. Oran B et al. *Umbilical cord blood transplantation: a maturing technology*. *Hematology* 2012, 2012:215-222
4. van Rood JJ et al. *Indirect evidence that maternal microchimerism in cord blood mediates a graft-versus-leukemia effect in cord blood transplantation*. *Proc Natl Acad Sci* 2012, 109:2509-2514
5. Burlingham WJ et al. *Microchimerism in cord blood: Mother as anticancer drug*. *Proc Natl Acad Sci* 2012, 109:2190-2191
6. van Rood JJ et al. *Reexposure of cord blood to noninherited maternal HLA antigens improves transplant outcome in hematological malignancies*. *Proc Natl Acad Sci* 2009, 106:1952-1957
7. Van der Zanden HG et al. *Noninherited maternal antigens identify acceptable HLA mismatches: benefit to patients and cost-effectiveness for cord blood banks*. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014, 20(11):1791-1795
8. Jankowska-Gan E et al. *Pretransplant immune regulation predicts allograft outcome: Birectional regulation correlates with excellent renal transplant function in living-related donor-recipient pairs*. *Transplantation* 2011, 10:1097
9. Hall JM et al. *Detection of maternal cells in human umbilical cord blood using fluorescence in situ hybridization*. *Blood* 1995, 86:2829-2832
10. Petit T et al. *A highly sensitive polymerase chain reaction method reveals the ubiquitous presence of maternal cells in human umbilical cord blood*. *Exp Hematol* 1995
11. Scaradavou A et al. *Detection of maternal DNA in placental/umbilical cord blood by locus-specific amplification of the noninherited maternal HLA gene*. *Blood* 1996, 88:1494-1500
12. Kletzel M et al. *Validation of chimerism in pediatric recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) a comparison between two methods*. *Chimerism* 2013, 4:1-9