



DOTTORATO DI RICERCA IN BIOPATOLOGIA
XXIV CICLO
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

“CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA E FUNZIONALE
DELLE CELLULE B (CD19+), PLASMACELLULE (CD38+++)
DOPPIO NEGATIVE (IgD-CD27-) SU SANGUE MIDOLLARE
NEI PAZIENTI CON MGUS E MM”

RELATORE

Ch.ma Prof.ssa Giuseppina Colonna Romano

TUTOR

Dott. Francesco Gervasi

CANDIDATO

Dott.ssa Vincenza Tortorici

Indice

CAPITOLO 1 - MGUS, MIELOMA MULTIPLO	4
1.1 GAMMOPATIA MONOCLONALE DI INCERTO SIGNIFICATO (MGUS).....	4
1.1.1 SIGNIFICATO CLINICO DELLA MGUS	5
1.1.2 EZIOPATOGENESI.....	5
1.2 MIELOMA MULTIPLO.....	7
1.2.1 BIOLOGIA DEL MIELOMA MULTIPLO.....	11
1.3 DIAGNOSI DIFFERENZIALE (MM-MGUS).....	13
1.3.1 INDIVIDUAZIONE DELLA POPOLAZIONE PLASMACELLULARE	14
1.3.2 CITOMETRIA A FLUSSO COME STRUMENTO DIAGNOSTICO.....	15
1.3.3 SIGNIFICATO BIOLOGICO E CLINICO DELLE ESPRESIONI FENOTIPICHE UTILIZZATE PER IDENTIFICARE LA POPOLAZIONE PLASMACELLULARE (MGUS E MM).....	16
CAPITOLO 2 – INVECCHIAMENTO E IMMUNOSENESCENZA	19
2.1 INVECCHIAMENTO E IMMUNOSENESCENZA	19
2.2 SISTEMA IMMUNITARIO ED INVECCHIAMENTO.....	23
2.2.1 INFIAMMAZIONE, INVECCHIAMENTO E LINFOCITI T	23
2.2.2 LINFOCITI B.....	27
2.3 MARCATORI DEI LINFOCITI B MEMORIA	29
CAPITOLO 3 - SCOPO DELLA TESI	33

CAPITOLO 4 - MATERIALI E METODI.....	34
4.1 ANALISI IN CITOMETRIA A FLUSSO	34
4.2 REAGENTI.....	37
4.3 PROTOCOLLO ANALITICO PER ASPIRATO MIDOLLARE.....	37
4.4 PROTOCOLLO PER LE IG INTRACITOPLASMATICHE.....	38
4.5 ELENCO DEGLI ANTICORPI UTILIZZATI PER LO STUDIO.....	39
4.6 ANALISI CITOMETRICA.....	40
CAPITOLO 5 – RISULTATI.....	43
CAPITOLO 6 – CONCLUSIONI	52
BIBLIOGRAFIA.....	55

CAPITOLO 1 - MGUS, MIELOMA MULTIPLO

1.1 GAMMOPATIA MONOCLONALE DI INCERTO SIGNIFICATO (MGUS)

La MGUS è la forma più comune di discrasia plasmacellulare. E' una condizione caratterizzata dalla presenza a livello sierico di un picco monoclonale di immunoglobuline, o parte di esse (catena leggera e/o catena pesante), in assenza di criteri diagnostici necessari per diagnosticare un mieloma multiplo o altri disordini linfoproliferativi quali plasmocitoma, macroglobulinemia di Waldenstrom, leucemia linfatica cronica, malattia delle catene pesanti, amiloidosi primaria (Kyle R.A et al., 2006). Si riscontra in circa il 10% dei soggetti di età superiore ai 75 anni; ed è caratterizzata da una infiltrazione midollare plasmacellulare <10%, presenza di una componente monoclonale (CM) <3gr/dl se IgG e <2gr/dl se IgA, assenza di CM nelle urine o comunque proteinuria <3gr/24h, assenza di lesioni osteolitiche, di anemia, di ipercalcemia e di insufficienza renale (Kyle R.A et al., 2006).

Il riscontro di catene leggere monoclonali nelle urine viene correntemente definito “proteinuria di Bence-Jones”. Il paziente con la gammopatia monoclonale d'incerto significato è del tutto asintomatico e la diagnosi di tale condizioni solitamente è del tutto casuale. Tuttavia tale condizione può essere considerata come un

disordine pre-neoplastico in quanto è ormai dimostrata l'elevata frequenza in cui evolve in mieloma multiplo o altri disturbi linfoproliferativi (Kyle R.A, et al., 2002). Approssimativamente il 25% dei pazienti affetti da MGUS sviluppa un processo immunoproliferativo maligno (MM, AL, MW) o linfoproliferativo (LNH, LLC) con un rischio annuo dell'1%.(Weiss et al., 2008).

1.1.1 SIGNIFICATO CLINICO DELLA MGUS

E' stato ormai dimostrato che la MGUS è una condizione caratterizzata dalla tendenza ad evolvere in mieloma multiplo o in altri disordini linfoproliferativi con una percentuale di progressione cumulativa dell'1% all'anno (Kyle R.A, et al., 2002, Kyle R.A, et. al., 2003). La stretta correlazione fra MGUS e successivo sviluppo di mieloma è stata confermata anche in studi più recenti (Landgren O, et al., 2009). In questo studio infatti in tutti i casi in cui era stata fatta una diagnosi di mieloma multiplo in precedenza era stato individuato un quadro di gammopatia monoclonale di incerto significato.

1.1.2 EZIOPATOGENESI

L'eziopatogenesi responsabile dello sviluppo di una MGUS e della sua eventuale successiva progressione in malattia linfoproliferativa è solo in parte nota. La produzione di una

gammopatia monoclonale è conseguente alla proliferazione di un picco monoclonale di plasmacellule. Questo si verifica in seguito a riarrangiamento dei geni delle immunoglobuline da cui risulta la produzione di una proteina monoclonale idiotipica (Bergsagel PL, et al., 2004). Nei pazienti con MGUS, il clone di plasmacellule e la concentrazione delle proteine monoclonali associate, solitamente, rimangono stabili per alcuni anni conservando tuttavia il loro potenziale evolutivo. Mutazioni genetiche, angiogenesi del midollo osseo ed agenti infettivi sembrano giocare un ruolo importante nella progressione da MGUS a mieloma multiplo o ad altri disordini linfoproliferativi. Non è ben conosciuto, tuttavia, lo specifico ruolo di ogni fattore.

1) *ABERRAZIONI CROMOSOMICHE*: alterazioni genetiche sono comuni nel mieloma multiplo e nella gammopatia monoclonale di incerto significato.

2) *RUOLO DELLE CITOCHINE*. Clinicamente le lesioni litiche ossee, osteopenia, ipercalcemia e le fratture patologiche differenziano il mieloma multiplo da gammopatia monoclonale di incerto significato. L'attivazione degli osteoclasti e l'inibizione degli osteoblasti sono responsabili delle lesioni ossee che fanno progredire MGUS a mieloma multiplo. L'attivazione degli osteoclasti è causata dall'iperpressione di varie citochine come il recettore dell'attivatore del fattore nucleare $K\beta$ ligando

(RANKL), che agisce sulla espressione di molecole di adesione che legano le plasmacellule allo stroma midollare (protezione dall'apoptosi) e la proteina infiammatoria dei macrofagi 1- α (MIP1- α) (Roodman G.D., 2002). Un importante ruolo viene giocato anche dal tumor necrosis factor α (TNF- α) e dall'interleuchina 6.

3) *ANGIOGENESI*: L'angiogenesi del midollo osseo aumenta progressivamente da MGUS benigno allo stadio avanzato del mieloma multiplo (Vacca et al, 1994, Rajkumar et al, 2000). L'aumentata angiogenesi sembra essere conseguente ad un alterato equilibrio fra i livelli di fattori angiogenetici e fattori anti-angiogenetici. Forse vi è una perdita di un inibitore dell'angiogenesi da cui potrebbe derivare l'aumento della stessa, che interviene nella progressione della patologia (Kumar et al, 2004).

4) *HELICOBACTER PYLORI*: Anche l'infezione da parte di *Helicobacter pylori* è stata presa in considerazione nell'eziopatogenesi della MGUS e della sua evoluzione in mieloma multiplo.

1.2 MIELOMA MULTIPLIO

Il Mieloma Multiplo (MM), anche detto Mieloma plasmacellulare o Plasmocitoma, è una patologia tumorale maligna

caratterizzata dalla proliferazione e dall'accumulo di un singolo clone di plasmacellule nel midollo osseo. La definizione "multiplo" associata al mieloma deriva dalla localizzazione dei plasmociti neoplastici in attiva proliferazione, che interessano zone multiple del midollo osseo (plasmociti midollari) ma che possono interessare anche i tessuti molli (plasmocitoma extramidollari) (Kyle et al.,1994).

Il mieloma multiplo è una patologia relativamente rara, rappresenta circa l'1% di tutte le malattie maligne ed in particolare il 10% tra le neoplasie ematologiche (Saunders et al., 2005).

A livello mondiale l'incidenza annua del mieloma multiplo è di circa 3 nuovi casi ogni 100.000 individui (superiore negli anziani) ed è maggiore nei maschi, mentre l'età media alla diagnosi si attesta intorno ai 68 anni. In Italia, l'incidenza registrata è di circa 2-4 nuovi casi ogni 100.000 abitanti all'anno, con un'età media di insorgenza che va oltre i 50 anni (Sirohi B, et al., 2004).

Nel midollo osseo normale le plasmacellule non superano il 3% della popolazione nucleata totale. In corso di MM l'infiltrazione plasmacellulare midollare è quantitativamente superiore al 10% della popolazione nucleata totale e può giungere alla totale sostituzione del normale parenchima midollare. All'esame morfologico le plasmacellule neoplastiche appaiono indistinguibili da quelle normali o, più spesso, presentano

numerose atipie citologiche, sino all'acquisizione di caratteri francamente anaplastici.

Le caratteristiche del tumore corrispondono a quelle della plasmacellula mielomatosa, che è interessata da alterazioni genetiche, biochimiche e metaboliche che ne alterano la corretta funzionalità, conferendole carattere neoplastico. Le plasmacellule superiori al 20% della cellularità globale, possono arrivare a localizzarsi in sedi specifiche, con un'infiltrazione massiva dello stesso spazio midollare e conseguente alterazione della crasi ematica.

Dal punto di vista funzionale, le cellule mielomatose vanno incontro ad un forte aumento dell'attività cellulare, in particolare con una produzione di elevate quantità di un immunoglobulina monoclonale (detta proteina M), solitamente di tipo IgG o IgA, oppure di un suo componente/frammento, caratteristica della patologia. Infatti, il mieloma multiplo ha origine della trasformazione neoplastica di una cellula della fase differenziata antigene dipendente, quali in particolare il plasmoblasto o la cellula B memoria, ovvero elementi cellulari che sono appena passati per la fase di selezione antigenica a livello del centro germinativo del midollo osseo.

Nella fase del ciclo in cui le cellule B immature diventano plasmacellule mature, avviene un processo fisiologico denominato

“ricombinazione sito-specifica” dei geni delle immunoglobuline (V, D e J), che consiste nell’associazione combinatoria di differenti segmenti genici, con la conseguente generazione dell’ampio spettro di anticorpi caratteristico di ciascun individuo. In altre parole, segmenti diversi di geni diversi vengono riarrangiati da un complesso apparato biochimico cellulare, noto come recombinasi VDJ, a formare un gene che codificherà le componenti necessarie a formare l’immunoglobulina specifica di ciascun linfocita B. A causa di questo delicato passaggio di ricombinazioni, le cellule B sono caratterizzate da una instabilità genetica intrinseca che è alla base, a sua volta, della maggior parte degli eventi oncogenici che contribuiscono alla patogenesi del mieloma multiplo.

Infatti, nel cariotipo delle plasmacellule mielomatose si osservano numerose alterazioni come delezioni o traslocazioni, localizzate nelle regioni cromosomiche contenenti i geni per le immunoglobuline. L’eziologia del mieloma multiplo è sconosciuta. Numerose osservazioni epidemiologiche hanno identificato, quale principale fattore di rischio, l’esposizione occupazionale a pesticidi, derivati del petrolio e radiazioni ionizzanti.

E’ stato, infine, ipotizzato che la stimolazione cronica del sistema monocito-macrofagico, quale si realizza in corso di

processi infettivi o flogistici cronici o di natura autoimmune, possa rivestire un ruolo di primaria importanza nell'eziologia della malattia (Kyle et al.,1994).

1.2.1 BIOLOGIA DEL MIELOMA MULTIPLO

Inizialmente si pensava che il MM fosse una neoplasia delle sole plasmacellule, attualmente, è considerata una neoplasia dell'intero sistema linfoide B. Si ipotizza che l'evento neoplastico possa realizzarsi ad uno stadio della linfocitopoiesi B antecedente la maturazione a plasmacellula. Numerose osservazioni hanno portato alla conclusione che i precursori delle plasmacellule mielomatose midollari sono cellule della linfocitopoiesi B, identificabili quali linfociti B memoria o plasmablasti, che hanno già superato la fase di maturazione antigene-dipendente (risposta immune secondaria) che si realizza a livello dei centri germinativi dei follicoli linfatici secondari degli organi linfoidi periferici, identificati, quindi, come sede di cruciale importanza nella patogenesi del MM.

In seguito si ha la migrazione dei plasmablasti verso il midollo osseo, ove differenziano a plasmacellule mature e trovano il microambiente adatto per la crescita, sia per l'ancoraggio offerto dalle cellule midollari, che per la produzione di numerose citochine, prima fra tutte l'interleuchina 6 (IL-6).

L'IL-6 stimola, infatti, la proliferazione delle plasmacellule mielomatose ed ha un ruolo protettivo contro l'apoptosi, sia spontanea che indotta da desametasone. Anche altre citochine giocano un ruolo importante nella proliferazione delle plasmacellule neoplastiche e nella patogenesi del mieloma multiplo. Fra queste IL-10, TGF- β 1, IL-15, IL-11, Leukemia Inhibitory Factor (LIF) e soprattutto l'Insulin like Growth Factor (IGF). Un ruolo molto importante è svolto da citochine che hanno anche un'attività angiogenica (HGF, FGF e VEGF).

L'angiogenesi è fondamentale per la progressione tumorale e pertanto è correlata con la prognosi. Infatti, i neovasi stimolano la proliferazione delle cellule tumorali ed incrementano l'attività invasiva e la capacità metastatica delle cellule tumorali. Oltre alla proliferazione plasmacellulare, il MM è caratterizzato dalla presenza di aree osteolitiche. Studi condotti su topi transgenici hanno mostrato che l'esaltata attività osteoclastica è provocata da un'alterazione dell'equilibrio fra la produzione di RANK-L e osteoprotegerina (OPG).

Il RANK (Receptor Activator of Nuclear factor KB) è un recettore espresso sui precursori degli osteoclasti e sugli osteoclasti maturi. Il suo ligando (RANK-L) è prodotto dalle cellule del microambiente midollare e da cellule linfoidi. Il legame RANK-RANK-L promuove il differenziamento degli

osteoclasti, la loro maturazione, proliferazione e attivazione. L'attività del RANK è inibita dall' OPG, che funge da recettore "esca" per RANK, prevenendone l'attivazione da parte di RANK-L.

Molte citochine, fattori di crescita e ormoni, fra cui il paratormone, agiscono fisiologicamente a livello di RANK-L e OPG per regolare l'attività ed il differenziamento degli osteoclasti. Nel MM il bilancio tra RANK-L e OPG è alterato da numerose citochine, fra cui IL-1 β , IL-6, IL-11, TNF- α , TGF- β , HGF e MIP1 α , che aumentano la produzione di RANK-L e riducono quella di OPG, inducendo l'osteoclastogenesi (Barlogie B, et al., 1989; Tura 2003).

1.3 DIAGNOSI DIFFERENZIALE (MM-MGUS)

Per differenziare la MGUS dal MM esistono diversi sistemi di classificazione basati sulla combinazione di criteri clinici quali la plasmacitosi midollare, la concentrazione di componente monoclonale, e la presenza di osteolisi, ma specialmente nelle fasi iniziali del MM la diagnosi rimane legata a un certo grado di incertezza.

L'impiego della citometria a flusso multiparametrica per l'analisi di sospensioni cellulari ottenute da midollo osseo umano ha consentito un dettagliato studio delle fasi terminali della

differenziazione B linfocitaria consentendo l'analisi immunofenotipica delle plasmacellule (PC) normale nonché della componente plasmacellulare nel MM e nelle MGUS con importanti risvolti sul piano clinico.

1.3.1 INDIVIDUAZIONE DELLA POPOLAZIONE PLASMACELLULARE

La maggiore difficoltà nell'individuazione nel midollo osseo normale della popolazione plasmacellulare, rispetto al linfociti B, nasce dalla bassa frequenza delle plasmacellule in tale sede, e dalla mancata espressione dei tipici antigeni di superficie B linfocitari (Terstappen et al., 1990).

Le espressioni fenotipiche meglio definite in letteratura per l'identificazione della popolazione plasmacellulare con l'impiego della citometria a flusso multiparametrica sono costituite dall'espressione *bright* del CD38 (Terstappen et al., 1990), dall'espressione *dim* o negativa del CD45 (Hata H. et al., Witzig T., et al., 1996) e dalla positività per l'antigene CD138 (Van Zaanen et al., 1995). Terstappen et al. per primi hanno identificato e caratterizzato le plasmacellule nel midollo osseo umano normale di 7 donatori con tale metodologia, dimostrando che l'espressione *bright* del CD38, un antigene non specifico delle plasmacellule ed espresso da più linee cellulari, è il parametro fondamentale per

“sortare” una popolazione altamente purificata di tali cellule e che nelle frazioni cellulari con espressione *dim* o negativa del CD38 non sono rinvenibili plasmacellule. (Terstappen L.W.M.M., et al., 1990).

1.3.2 CITOMETRIA A FLUSSO COME STRUMENTO DIAGNOSTICO

L’immunofenotipizzazione in citometria a flusso è considerato uno strumento indispensabile per la diagnosi, la classificazione e il monitoraggio della malattia, nelle gammopatie monoclonali. L’applicazione clinica della citometria a flusso nelle gammopatie monoclonali risulta utile per effettuare una diagnosi differenziale delle plasmacellule maligne, per individuare il rischio di progressione dell’(MGUS) asintomatico in mieloma multiplo (MM) ed infine per valutare la malattia minima residua.

Le espressioni fenotipiche meglio definite in letteratura per l’identificazione della popolazione plasmacellulare con l’impiego della citometria a flusso multiparametrica sono costituite dall’espressione degli antigeni: CD19, CD20 CD38, CD138, CD27, CD28, CD45, CD56 e CD117, marcatori prognostici per il mieloma (Olteanu et al., al., 2008), e sulla contemporanea valutazione della restrizione monotipica delle catene leggere delle cIg con anticorpi anti-catene leggere κ o λ (Morice et al., 2007).

Tali antigeni giocano un ruolo significativo nella caratterizzazione delle plasmacellule normali e maligne (Olteanu et al., 2008 e Ocqueteau et al., 1998). La citometria a flusso multiparametrica è un utile strumento per la diagnosi ed il follow-up dei pazienti con MM, per l'espressione dei diversi antigeni nelle plasmacellule maligne e il suo valore prognostico, per l'enumerazione delle plasmacellule normali e maligne che ci consente di effettuare una diagnosi differenziale tra MGUS e MM.

1.3.3 SIGNIFICATO BIOLOGICO E CLINICO DELLE ESPRESSIONI FENOTIPICHE UTILIZZATE PER IDENTIFICARE LA POPOLAZIONE PLASMACELLULARE (MGUS E MM)

CD19, è una molecola coinvolta nella regolazione dello sviluppo, attivazione e differenziazione del linfociti B; è presente sulle plasmacellule normali ma non in quelle maligne; le plasmacellule mielomatose possono essere infatti identificate immunofenotipicamente come cellule CD38+++ /CD56+ /CD19- distinguibili da quelle con fenotipo normale CD38++ /CD56- /CD19+ (Hata H. et al., 1993; Ocqueteau M. et al., 1998).

CD27, gioca un ruolo nella differenziazione delle cellule B memoria in plasmacellule mature (Hintzen et al., 1994; Agematsu

et al., 1998). La perdita del CD27 nell' MGUS è stata collegata alla progressione verso il MM.

CD138, (Syndecan 1), antigene plasmacellulare specifico, ligando della trombospondina e di altri componenti della matrice extracellulare midollare (Mali M., et al., 1990) e può quindi mediare l'adesione delle plasmacellule al microambiente midollare. L'anticorpo CD138 riconosce sulle cellule emopoietiche le molecole di sindacani-1 espresse dalle plasmacellule, non reagisce invece con i linfociti B. Tutte le cellule CD138+++ si ritrovano nella frazione CD38 bright, e viceversa.

CD56 (N-CAM molecola di adesione delle cellule neurali); viene espressa da cellule stromali che supportano la linfopoiesi, osteoblasti e osteoclasti con livelli più elevati nel MM rispetto ai soggetti normali. Sembra che possa essere coinvolto nell'interazione con le cellule stromali midollari, con funzione di molecola di adesione.

Le plasmacellule mielomatose circolanti sono caratterizzate da una intensità di espressione del CD138 e del CD56 significativamente più bassa rispetto alla controparte midollare. (Rawstron et al., 2008).

CD45 definito pan leucocitario, questo antigene per la differente espressione di superficie nelle diverse linee cellulari

leucocitarie e la modulazione nell'ambito di ogni singola linea, viene largamente utilizzato in strategie di gating basate sull'analisi biparametrica CD45/SSC che consentono la discriminazione di vari clusters cellulari midollari e anche l'individuazione delle plasmacellule.

CAPITOLO 2 – INVECCHIAMENTO E IMMUNOSENESCENZA

2.1 INVECCHIAMENTO E IMMUNOSENESCENZA

Un aspetto interessante di un sistema biologico complesso, nel significato più fisico della parola, è sicuramente lo studio delle configurazioni che esso assume quando il suo stato evolutivo è lontano da quello iniziale da cui ha cominciato ad evolvere. Recentemente sono stati compiuti passi in avanti nella comprensione dei fenomeni correlati all'invecchiamento dei sistemi biologici anche in ragione del notevole interesse suscitato dalle problematiche legate all'aumento della vita media della popolazione umana dei paesi sviluppati. Un tenore di vita più agiato, condizioni igieniche migliori e un maggiore controllo sanitario hanno contribuito all'allungamento della vita soprattutto nei paesi economicamente più sviluppati.

L'invecchiamento è un processo che caratterizza tutti i viventi, con maggiore o minore velocità, e si manifesta con una progressiva diminuzione della capacità di adattamento agli stimoli e agli insulti dell'ambiente. Tale evento conduce inesorabilmente l'organismo ad una condizione di maggiore suscettibilità e vulnerabilità nei confronti delle malattie, con conseguente aumento della mortalità in maniera età-dipendente (Franceschi et al. 2007). Durante l'invecchiamento, il sistema immunitario perde

progressivamente la capacità di combattere le infezioni e di rispondere in modo rapido ed efficace ai diversi stimoli. D'altra parte, l'invecchiamento in buone condizioni sembra direttamente correlato con un buon funzionamento del sistema immunitario.

Il sistema immunitario è soggetto, durante tutto il corso della vita, a continui riassetti causati dalla risposta immunitaria che ha lo scopo di riportare nella norma gli equilibri alterati durante l'attacco antigenico. Fin dalla nascita, quotidianamente noi veniamo a contatto con virus, batteri e sostanze esterne all'organismo che devono essere riconosciuti dal sistema immunitario ed eventualmente distrutti nel caso questi risultino patogeni, e che soprattutto devono essere "memorizzati" al fine di proteggere l'organismo da eventuali attacchi successivi di patogeni dello stesso tipo. Sotto una prospettiva evolutiva quindi il sistema immunitario può essere interpretato come un complesso sistema di difesa che attua quotidianamente una risposta ai continui insulti antigenici a cui l'organismo è soggetto durante tutta la vita attraverso l'interazione con l'ambiente. La continua attività immunitaria a cui noi siamo sottoposti, induce l'organismo sia da un punto di vista genetico che da un punto di vista cellulare a modificare alcuni meccanismi interni in maniera irreversibile riducendo gradualmente le risorse del sistema e limitando

inevitabilmente le potenziali linee di difesa nei confronti di ulteriori insulti antigenici.

Questo fenomeno chiamato 'immunosenescenza' è influenzato da fattori ambientali e genetici, ma anche dal carico antigenico a cui gli individui sono esposti per tutta la vita, e questo ha un impatto sulle prestazioni del sistema immunitario negli anziani (Pawelec e Larbi, 2008; van Baarle et al., 2005). Esiste quindi un'associazione tra le alterazioni della funzione immunitaria e la longevità, e indicano che il deterioramento della funzione immunitaria (immunosenescenza) potrebbe essere la causa della maggiore suscettibilità al cancro, alle malattie autoimmuni, alla risposta alle vaccinazioni ed alle malattie infettive con l'invecchiamento (Gardner et al., 2006; Genton et al., 2006). Nei soggetti anziani, si assiste quindi ad una alterata capacità di rispondere ai vaccini e a nuovi agenti infettivi, soprattutto a causa dei cambiamenti nell'immunità adattiva mediata dalle cellule T e B.

Anche se la maggior parte degli studi sull'immunosenescenza sono concentrati sulla compromissione delle cellule T, negli anziani si osserva un'alterazione che riguarda il compartimento delle cellule B. Infatti nell'anziano la risposta immunitaria umorale subisce dei cambiamenti, che riguardano sia la qualità che la quantità di anticorpi prodotti, si assiste inoltre ad una riduzione del

numero delle cellule B circolanti. (Cancro et al., 2009; Frasca et al., 2010b).

Le cellule B, oltre alla produzione di anticorpi, svolgono funzioni effettrici e di regolazione (Sanz et al., 2007; Martin e Chan, 2006; Harris et al., 2000), le cellule B memoria e naive possono produrre diverse citochine e chemochine; in particolare le cellule B memoria producono alti livelli di citochine proinfiammatorie IL1- α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α suggerendo così che le cellule B potrebbero prendere parte alla generazione o al mantenimento dell'ambiente infiammatorio tipico degli anziani (Agrawal e Gupta, 2010).

Infatti una caratteristica tipica dell'invecchiamento è lo stato pro-infiammatorio osservato negli anziani, legate alle malattie infiammatorie croniche che aumentano con l'età.

Alcune teorie suppongono, che il rischio dell'aumento di malattie in tarda età, sono il risultato di fattori di stress ambientali che si accumulano nel tempo. Questi fattori di stress, potenzialmente, possono disturbare la regolazione dei sistemi biologici, tuttavia, non tutti gli individui o gruppi di popolazioni sembrano essere ugualmente suscettibili agli effetti dello stress. Si ritiene che al fine di raggiungere un'età avanzata, i centenari dovrebbero possedere efficienti meccanismi di difesa, combinazione ottimale di un adeguato background genetico e stile

di vita (Franceschi et al., 1995). In questi soggetti, una maggiore frequenza di polimorfismi genetici associato ad una ridotta capacità pro-infiammatoria sembra intervenire contro l'insorgenza dei principali disturbi legati all'età (cancro, demenza, diabete e malattie cardiovascolari) (Franceschi et al., 2007).

Su questa base, potrebbe essere un vantaggio avere dei genitori centenari; infatti è stato dimostrato che la prole di centenari, di età compresa tra i 70 e gli 80 anni, hanno un vantaggio di sopravvivenza in più, rispetto ai controlli di pari età che non hanno genitori centenari. Questi risultati sostengono l'ipotesi che i figli di genitori centenari, sono inclini ad un invecchiamento in condizioni sane e ad una sopravvivenza prolungata. In un recente studio (Derhovanessian et al., 2010) è stato dimostrato che le caratteristiche tipiche dell'immunosenescenza non sono presenti nei soggetti con familiarità di longevità.

2.2 SISTEMA IMMUNITARIO ED INVECCHIAMENTO

2.2.1 INFIAMMAZIONE, INVECCHIAMENTO E LINFOCITI T

L'invecchiamento è tipicamente caratterizzato da un generale aumento della produzione di citochine pro-infiammatorie e markers infiammatori (Cevenini et al., 2010). Infatti, elevate

concentrazioni plasmatiche di IL-6, IL-1 β e TNF- α sono state descritte nelle popolazioni anziane e sono stati considerati markers predittivi di inabilità funzionale, fragilità e mortalità (Bruunsgaard et al., 2003; Ershler e Keller, 2000; O ' Mahony et al., 1998). E' stato suggerito che l'infiammazione cronica determina lo sviluppo e la progressione delle malattie età-correlate, quali l'osteoporosi, la neurodegenerazione e l'aterosclerosi (Gao e Hong, 2008; Ginaldi et al., 2005; Libby, 2002). L'infiammazione subclinica può essere causata dalla stimolazione cronica del sistema immunitario innato e/o dalla parziale incapacità del sistema immunitario invecchiato di eliminare determinati agenti patogeni (Weinberger et al., 2009), questo stato infiammatorio può danneggiare lentamente uno o diversi organi, soprattutto quando i polimorfismi genetici sfavorevoli e le alterazioni epigenetiche sono concomitanti, portando così ad un aumentato rischio di fragilità insieme all'insorgenza di malattie croniche legate all'età (Cevenini et al.2010 e Vasto et al., 2007). L'up-regolazione della risposta infiammatoria età-dipendente è stata definita "inflamm-aging" (Franceschi et al., 2000b, 2000c), dovuta sia alla stimolazione antigenica cronica che al background genetico che rendono gli anziani inclini alla fragilità (Balistreri et al., 2008, 2007; Franceschi et al., 2005; Lio et al., 2004; Pes et al., 2004).

I più evidenti cambiamenti che il SI subisce con l'invecchiamento sono:

- l'involuzione del timo, che si manifesta a partire dalla pubertà, e che determina la riduzione della produzione di linfociti T;
- il remodelling linfocitario, che interessa in particolare il compartimento delle cellule T;
- l'alterazione del pattern di produzione delle citochine, che concerne l'alterazione della secrezione di citochine pro- ed anti-infiammatorie.

Nell'immunosenescenza si riscontra una riduzione globale dello spazio immunologico disponibile, conseguenza indiretta dei benefici effetti che il sistema immunitario, durante l'arco della vita, ha fornito all'organismo nella sua normale attività di neutralizzazione degli agenti patogeni, e che, in fase senescente determinano quasi paradossalmente i limiti di sopravvivenza umana. In base a numerosi risultati sperimentali, molti dei quali emersi dagli studi sul sistema immunitario di individui centenari, fu formulata la Teoria del Rimodellamento nell'Invecchiamento (Franceschi et. al., 200b), in cui si sostiene che l'invecchiamento non è semplicemente un deterioramento generale del sistema, ma piuttosto un processo dinamico di riassetto globale che coinvolge ogni suo sottosistema e che avviene durante l'intero arco della vita.

In questo rimodellamento dell'organismo alcuni meccanismi si deteriorano nel tempo, altri migliorano le loro prestazioni e altri ancora possono rimanere essenzialmente invariati. Alcuni cloni cellulari si espandono enormemente mentre altri diminuiscono di dimensione, caratterizzando così il repertorio cellulare di ciascun individuo. Le alterazioni che si verificano con l'avanzare dell'età a carico dei linfociti sono complesse e pleiotropiche e riguardano sia un rimodellamento che un'alterazione della funzionalità cellulare. I cambiamenti più drammatici si verificano nel compartimento delle cellule T e sono compatibili con l'aumento dell'incidenza e della gravità delle infezioni e del cancro nei soggetti anziani (Effros, 2001). Nei centenari e negli individui anziani si riscontra una progressiva diminuzione del repertorio dei linfociti vergini, ed un progressivo aumento delle cellule effettrici e/o di memoria, soprattutto nel repertorio dei linfociti T citotossici, si assiste quindi ad un graduale passaggio dalle cellule Naive CD45RA+, verso cellule memoria CD45RO+ (Pawelec e Larbi, 2008; Pawelec et al., 2002).

Si ritiene che il calo del numero delle cellule T naive con l'età è il risultato dell'involuzione timica in combinazione con la differenziazione in corso delle cellule T naive in cellule memoria o effettrici antigene-specifiche (Appay et al., 2010).

Uno dei più notevoli cambiamenti qualitativi nella popolazione delle cellule T memoria durante l'invecchiamento è l'espansione clonale delle cellule T CD8+CD28-. L'analisi clonotipica del recettore delle cellule T, la perdita dell'espressione del CD28, l'accorciamento dei telomeri e la ridotta capacità proliferativa hanno suggerito che queste cellule T citotossiche hanno raggiunto la senescenza replicativa (Pawelec e Larbi, 2008; Globerson ed Effros, 2000). Queste caratteristiche sono causate da stress antigenico persistente che porta al marcato restringimento della diversità del repertorio delle cellule T con l'età (Pawelec e Larbi, 2008; Pawelec et al., 2002; Wack et al., 1998). I cloni dei linfociti memoria occupano nel tempo una porzione sempre più vasta dello "spazio immunologico" disponibile, a scapito delle cellule vergini che diminuiscono gradualmente nel tempo. La riduzione dello spazio immunologico e la diminuzione del numero dei linfociti T vergini nella fase senescente possono essere considerate tra le caratteristiche principali dell'immunosenesenza e quest'ultimo costituisce senz'altro un marcatore biologico di mortalità.

2.2.2 LINFOCITI B

Alterazioni nelle cellule B si verificano sia negli esseri umani che nei topi, l'avanzare dell'età è accompagnata da notevoli cambiamenti in tutti i compartimenti delle cellule B e, di

conseguenza, nella funzione immunitaria umorale. Questi cambiamenti includono la distribuzione di alcune sottopopolazioni di cellule B, il repertorio recettoriale e la riduzione complessiva delle risposte umorali (Miller e Cancro, 2007).

Con l'invecchiamento, nell'uomo si assiste ad una diminuzione in percentuale e in numero assoluto dei linfociti B CD19+ totali (Veneri et al., 2009; Faria et al., 2008; Frasca et al., 2008; VShi et al., 2005; Chong et al., 2005; Colonna Romano et al., 2003, 2002; Breitbart et al., 2002; Huppert et al., 1998; Wikby et al., 1994; Paganelli et al., 1992).

E' stato dimostrato che il numero assoluto di precursori delle cellule B nel midollo osseo diminuisce con l'età e particolarmente durante l'adolescenza (McKenna et al., 2001), tuttavia, la linfopoiesi B persiste per tutta la vita adulta (Rossi et al., 2003).

Sembra che gli anticorpi generati negli anziani siano meno protettivi rispetto agli anticorpi generati nei soggetti giovani, come dimostrato dalla loro ridotta capacità di opsonizzare in vitro dopo vaccinazione con polisaccaridi di derivazione batterica (Schenkein et al., 2008). Inoltre la risposta anti-influenzale è ridotta negli anziani dopo la vaccinazione (Weinberger et al., 2008; Murasko et al., 2002) e si assiste ad una ridotta circolazione delle plasmacellule anticorpo-secerenti nel midollo osseo (Zheng et al., 1997; Manz et al., 1997).

Anche se le cellule B sono numericamente ridotte negli anziani (Globerson & Effros, 2000; Colonna-Romano et al., 2002), i livelli di immunoglobuline totali nel siero rimangono invariate (Le Maoult et al., 1997; Weksler & Szabo, 2000). E' stato osservato un incremento età-correlato, delle immunoglobuline "memoria" (IgG e IgA), e una concomitante riduzione dei livelli sierici di IgM e IgD (Listì et al., 2006).

2.3 MARCATORI DEI LINFOCITI B MEMORIA

I linfociti memoria sono cellule cruciali del sistema immunitario: facilitano una risposta immediata nei confronti degli antigeni precedentemente incontrati. Le cellule B memoria possono essere discriminate dalle cellule vergini per la presenza di ipermutazioni somatiche dei geni per le Ig (Klein et al., 1998).

Inoltre, per discriminare facilmente le cellule B naive dalle memoria, sono attualmente utilizzati marcatori fenotipici come immunoglobuline di superficie (IgD, IgM, IgG, IgA) e CD27.

Linfociti B CD27 + sono stati definiti cellule B memoria, perché la sua espressione è correlata con la presenza di ipermutazioni somatiche nei geni per le Ig, inoltre le Ig hanno subito uno switch isotipico (Agematsu et al., 2000). Tuttavia, molti autori hanno recentemente dimostrato la presenza nel sangue di cellule B memoria che difettano di CD27 (Colonna Romano et

al., 2009; Frasca et al., 2008; Wei et al., 2007; Fontana et al., 2006; Anolik et al., 2004).

Shi et al (2003) hanno dimostrato che le cellule B circolanti possono essere suddivisi sulla base dell'espressione dell' IgD e CD27, in quattro differenti sottopopolazioni funzionali:

- IgD + CD27- B naive
- IgD + CD27+ B memoria unswitched (producono IgM)
- IgD - CD27+ B memoria switched (producono IgG, IgM e IgA)
- IgD- CD27- B memoria doppio negative (DN)

Le cellule B naive sono identificate come IgG-IgA-IgD+CD27-, mentre la popolazione delle cellule B memoria sembra essere molto eterogeneo, e comprende tre differenti subset funzionali: cellule "IgM memoria" che sono IgM+IgD+CD27+ (Klein et al., 1998), identificate anche come IgD+CD27+ memoria "unswitched" da Shi et al (2005), cellule B memoria "classica" switched IgG+IgA+CD27+ e le IgG+IgA+IgD-CD27- (Fecteau et al., 2006), chiamate anche cellule B doppio negative (DN) a causa della mancanza di IgD e CD27 (Colonna Romano et al., 2009). Le cellule B naive, in seguito al riconoscimento degli antigeni possono differenziarsi in cellule secernenti Ig a bassa affinità o maturare all'interno del

centro germinativo in cellule memoria ad alta affinità che esprimono diversi isotipi di Ig (Wolniak et al., 2004).

L'espressione del CD27 sulle cellule B memoria classica non è stata mai stabilita saldamente nell'uomo (Tangye e Hodgkin, 2004), la molecola CD27 nei topi, piuttosto che il marcatore amemory, sembra essere espresso nelle cellule B di recente attivazione e non è assolutamente necessaria per le risposte secondarie (Xiao et al., 2004). Questi risultati suggeriscono che CD27 non è il marcatore delle cellule B memoria e che l'identificazione delle cellule B naive e memoria non sono strettamente correlati a questo indicatore.

È stato segnalato (Anolik et al., 2004), che i pazienti con lupus eritematoso sistemico (SLE) mostrano un aumento delle cellule B DN, e che la quantità di tali cellule nel sangue circolante è correlata con l'attività della malattia (Wei et al., 2007).

Alcuni autori suggeriscono che queste cellule B memoria CD27- potrebbero rappresentare dei progenitori, o la progenie, di cellule memoria CD27+ che non riescono a passare attraverso una reazione del centro germinativo. Si ipotizza quindi che le cellule B memoria CD27- potrebbero svilupparsi al di fuori del centro germinativo, forse nelle reazioni extrafollicolari ed essere in grado di supportare ipermutazioni come è stato dimostrato nel topo (William et al., 2002).

Le CD27⁻ potrebbero rappresentare cellule follicolari attivate, che avviano la reazione nel centro germinativo, ma non riescono a progredire attraverso questa via, spiegando così la loro incapacità di acquisire CD27 ed il più basso tasso di ipermutazione somatica rispetto alle cellule B memoria classica CD27⁺.

Molti autori si sono confrontati, per quanto riguarda l'origine e il significato biologico delle cellule B DN e hanno ipotizzato che queste cellule potrebbero rappresentare un lineage distinto delle cellule B memoria o progenitori delle cellule memoria CD27⁺. Si suppone invece che queste cellule sono cellule B memoria senescenti che hanno down modulato l'espressione del CD27 (Appay et al., 2002) come le cellule T CD8 specifiche contro stimoli antigenici (e.g., herpetic viruses); (Pawelec et al., 2004, 2005). Un'altra ipotesi avanzata è che tali cellule siano linfociti B “memoria tardivi” che hanno perso la capacità funzionale, che hanno down modulato l'espressione del CD27 e che occupano lo spazio immunologico nei soggetti anziani. Si suppone che la popolazione B doppio negativa, così espansa negli anziani, potrebbe essere il risultato di una stimolazione prolungata nel tempo, o alternativamente, dovuta ad una disregolazione del sistema immune negli anziani.

CAPITOLO 3 - SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della tesi è stato quello di discutere recenti dati di letteratura sulle cellule B immunosenescenti e delle cellule B memoria, concentrando la nostra attenzione su una sottopopolazione di cellule B memoria doppio negative (IgG+IgD-CD27-), che è stato dimostrato essere aumentato negli anziani sani (Colonna Romano et al., 2009). Inoltre, è stata effettuata una caratterizzazione fenotipica e funzionale delle cellule B (CD19+), e delle plasmacellule (CD38+++), doppio negative (IgD-CD27-), su sangue midollare nei pazienti con MGUS e MM, considerato che tali patologie si evidenziano principalmente nei soggetti di età compresa tra i 65-80 anni.

CAPITOLO 4 - MATERIALI E METODI

Presso l'U.O. di Ematologia dell'Azienda di Rilievo Nazionale e di alta Specializzazione Civico-Benfratelli, G. Di Cristina e M. Ascoli, è stato valutato il ruolo diagnostico dell'analisi multiparametrica nell'identificazione delle diverse sottopopolazioni dei linfociti B, dell'aspirato midollare, ottenuto da 50 pazienti con MM (mieloma multiplo), 35 pazienti con MGUS (gammopatia monoclonale di significato indeterminato) e 20 soggetti controllo (soggetti con: piastrinopenia, linfoma non Hodgkin e con sospetto di malattie oncoematologiche non riscontrate).

4.1 ANALISI IN CITOMETRIA A FLUSSO

L'analisi immunofenotipica è stata condotta su campioni di sangue midollare anti coagulato con K3-EDTA e allestiti con metodica lyse no wash, che permette di studiare la stragrande maggioranza delle popolazioni midollari, valutando la reattività degli anticorpi monoclonali in immunofluorescenza diretta in citometria a flusso multiparametrica, utilizzando per l'acquisizione i citofluorimetri Cyan ADP™ e NAVIOS™ (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) a tre laser: 405nm, 488 nm, e 633 nm. Per

l'analisi è stato utilizzato il Software: Kaluza 1.2 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA).

Le metodologie di taratura del citometro a flusso, di acquisizione dei campioni, e le strategie di gating utilizzate, con le differenze condizionate dall'impiego dei software dedicati, sono state quelle riassunte dall'European Working Group on Clinical Cell Analysis and European School of Flow Cytometry (1999) opportunamente modificate per l'utilizzo dei 6-7-8 colori.

Nella prima fase sono stati acquisiti 500.000 eventi corrispondenti al totale delle cellule mononucleate midollari, con l'esclusione dei debris sulla dot plot FSC vs SSC. In un secondo momento sono stati acquisiti e studiati, per l'espressione del CD19+ e CD38+++, 1000 eventi nel "live gate", costruito su SSC/CD19 e SSC/CD38 bright, dove vanno a localizzarsi rispettivamente i linfociti B e le plasmacellule. Il gate ci permette di determinare uno spazio multidimensionale che consente l'analisi contemporanea di 9-10 parametri, due fisici Forward Scatter e Side Scatter e fino ad otto immunologici in relazione all'espressione della fluorescenza.

L'analisi e la quantificazione delle diverse popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie, nonché le Ig di superficie e intracitoplasmatiche, sono state effettuate impiegando una strategia di gating (il gate è una finestra disegnata dall'operatore che

permette di analizzare selettivamente una popolazione cellulare in base alle caratteristiche morfologiche e/o immunologiche).

La costruzione di un “gate” deve mirare alla migliore definizione della popolazione da studiare per l’ottenimento di informazioni che non siano viziate dalla presenza di contaminanti.

Il pannello è stato costituito secondo i criteri e le strategie esposte, ciascun tubo deve rispondere a precisi quesiti clinici ed inoltre deve riservare obiettivi ben definiti. Lo studio immunofenotipico delle sottopopolazioni dei linfociti B e delle Ig di membrana e intracitoplasmatiche, è stato effettuato mediante marcatura con anticorpi monoclonali specifici.

Per lo studio è stato impiegato il seguente pannello: IgG-Fitc, IgD-Pe, CD19-Pe-Cy5, CD38-Pe-Cy7, CD45-Violet, CD27-AF750.

Tabella 1

		TUBO 1- BIANCO	TUBO 2
FITC	Antigene		IgG
	Clone		H2
	Ditta		Beckman Coulter
PE	Antigene		IgD
	Clone		IADB6
	Ditta		Beckman Coulter
Pe-Cy5	Antigene		CD19
	Clone		J3-119
	Ditta		Beckman Coulter
Pe-Cy7	Antigene		CD38
	Clone		T16
	Ditta		Beckman Coulter
PB	Antigene		CD45
	Clone		J.33
	Ditta		Beckman Coulter
Apc-AF 750	Antigene		CD27
	Clone		1A4CD27
	Ditta		Beckman Coulter

4.2 REAGENTI

Lo studio fenotipico di alcuni antigeni di membrana è stato effettuato mediante marcatura con:

1. Anticorpi monoclonali (MoAb) specifici, direttamente coniugati con:

- Fluorocromi (molecole fluorescenti): FITC (isotiocianato di fluoresceina), Pe (ficoeritrina), PB (Pacific Blue);
- Fluorocromi tandem (composti costruiti unendo fra loro molecole con proprietà foto-fisiche complementari che sfruttano il trasferimento dell'energia da un fluorocromo donatore ad un fluorocromo accettore): Pe-Cy5.5 (ficoeritrina+cianina 5), Pe-Cy7 (ficoeritrina+cianina7), APC (alloficocianina), APC-AF750 (alloficocianina + Alexa Fluor).

2. Soluzione lisante (cloruro di ammonio), per la lisi dei GR.

4.3 PROTOCOLLO ANALITICO PER ASPIRATO MIDOLLARE

1. Defrustolare il campione in ago con calibro prima g20, g21 fino a g22 per dirompere gli aggregati piastrinici e i frustoli;
2. Eseguire un conteggio del campione e aggiustarne la concentrazione a 10×10^6 cell/ml;

3. Eseguire le marcature utilizzando 100 μ l di campione e 10 μ l di ogni singolo monoclonale per tubo;
4. Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti al buio;
5. Lisare con 2 ml di cloruro di ammonio;
6. Incubare a temperatura ambiente per altri 15 minuti al buio (l'acquisizione al citofluorimetro va effettuata entro 1 ora dalla lisi).

4.4 **PROTOCOLLO PER LE IG INTRACITOPLASMATICHE**

1. 100 μ l di campione, vengono lavati con 2ml di PBS-BSA (0.2%) (1900 giri per 5 min.);
2. Dispensare gli anticorpi di superficie;
3. Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti al buio;
4. Fissare le cellule con 100 μ l di FIX A (ditta);
5. Incubate a temperatura ambiente per 15 minuti al buio
6. Effettuare un lavaggio con 2ml di PBS-BSA (0.2%) (1900 giri per 5 min.);
7. Aggiungere 100 μ l di Permeabilizzante B (ditta);
8. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti al buio;
9. Marcare le cellule con 10 μ l di Ig;
10. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti al buio;
11. lavare con 2ml di PBS-BSA (0.2%);

12. Aggiungere 1ml di soluzione fisiologica, il campione può essere così acquisito e analizzato. I risultati sono espressi come media MFI \pm SE.

4.5 ELENCO DEGLI ANTICORPI UTILIZZATI PER LO STUDIO

CD19: strettamente associato ai linfociti B, su cui compare fin dallo stadio di cellule pre-B, ancor prima della comparsa di CD10 fino allo stadio di plasmacellula.

CD27: rappresenta un indicatore chiave per le cellule B memoria, promuove la differenziazione delle cellule B memoria in plasmacellule.

CD38: espresso sui precursori dei B linfociti, sui linfociti B maturi stimolati con mitogeni, sulle plasmacellule.

CD45: è definito “pan leucocitario”, perché espresso su tutti i leucociti umani: linfociti, monociti, granulociti, eosinofili e basofili.

IgG: anticorpi maggiormente impiegati durante la risposta immunitaria secondaria, prodotte tardivamente e in maniera massiva dai linfociti B differenziatisi in plasmacellule.

IgD: si ritrovano soltanto sulla superficie dei linfociti B immaturi, assieme alle IgM, hanno come unica funzione quella di attivare i linfociti B e di promuovere la loro maturazione verso lo stadio di plasmacellule quando

vengono a contatto con l'antigene per il quale sono specifiche.

4.6 ANALISI CITOMETRICA

TUBO 1

Bianco: serve a valutare la negatività o l'autofluorescenza del campione.

TUBO2

IgG-Fitc, IgD-Pe, CD19-Pe-Cy5.5, CD38-Pe-Cy7, CD45-PB, CD27-Apc-AF750: ci permette di identificare 4 popolazioni differenti delle cellule B, le Ig di membrana e intracitoplasmatiche delle cellule B e plasmacellule.

1. discriminare le cellule dai detriti: creare un Side Scatter/Forward Scatter nella dot plot ottenere una Regione R1 che esclude i detriti, le cellule morte e i granulociti (Fig. 1.a, Fig. 1.b);
2. attivare la R1 sulla dot plot CD45 (pan leucocitario) vs CD19, (Fig. 2.a, Fig. 2.b) ci consente di individuare i linfociti B. Attivare la regione CD19 sulla dot plot IgD/CD27, si evidenziano così le 4 sottopopolazioni dei linfociti B (Fig. 3.a, Fig. 3.b). La popolazione DN evidenziata, viene attivata sulla dot/plot IgG/CD27 (Fig. 4.a, Fig. 4.b). Lo stesso tipo di analisi è stato effettuato sulla popolazione CD38+++.

Analisi citometrica MIELOMA MULTIPLO

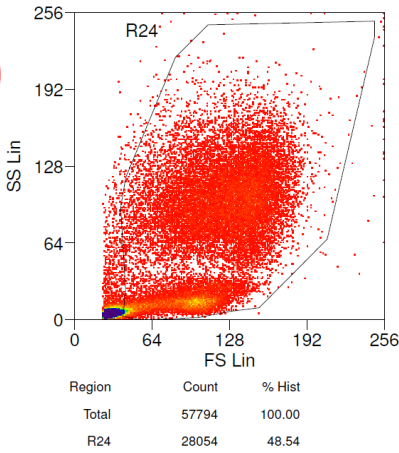


Fig. 1.a - Side Scatter/Forward Scatter

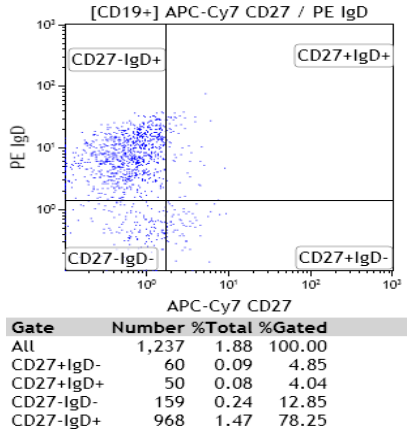


Fig. 3.a - CD19 vs IgD/CD27
(4 sottopopolazioni linfociti B)

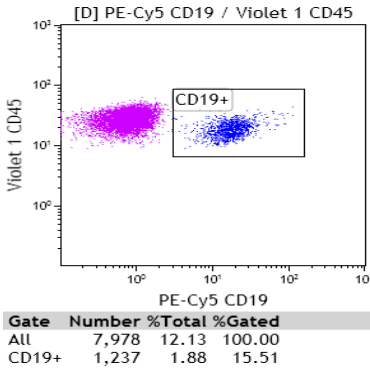


Fig. 2.a - dot plot CD45 vs CD19
(Linfociti B)

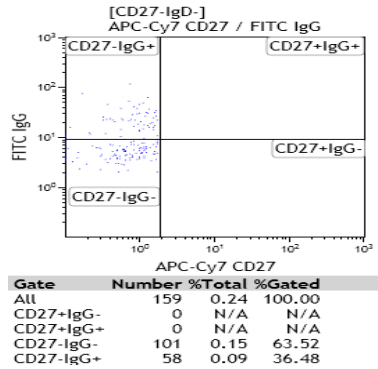


Fig.4.a - DN (IgD-CD27-) vs IgG/CD27

Analisi citometrica MGUS

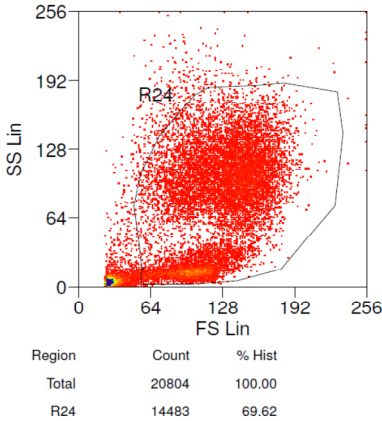


Fig. 1.b - Side Scatter/Forward Scatter

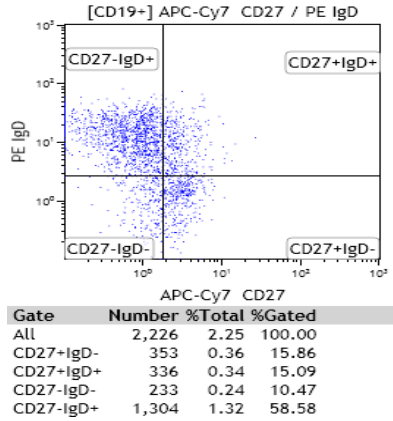


Fig. 3.b - CD19 vs IgD/CD27
(4 sottopopolazioni linfociti B)

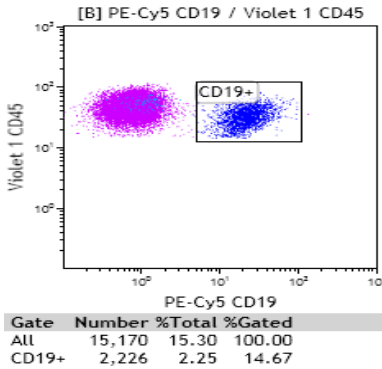


Fig. 2.b - dot plot CD45 vs CD19
(Linfociti B)

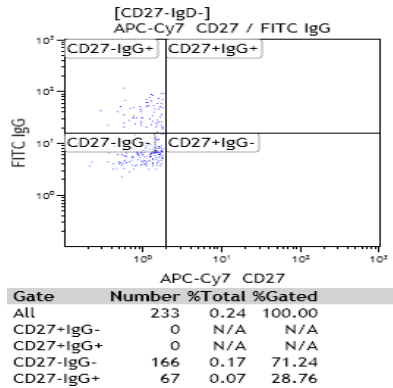


Fig. 4.b - DN (IgD-CD27-) vs IgG/CD27

CAPITOLO 5 – RISULTATI

Lo studio descritto in questa tesi è rivolto all'analisi ed alla caratterizzazione delle varie sottopopolazioni delle cellule B vergini/memoria, prestando particolare attenzione alla popolazione DN (IgD-CD27-), in quanto tali cellule sembrano essere incrementate nei soggetti anziani (Colonna Romano et al., 2009).

Lo scopo è stato quello di valutare la presenza delle cellule B DN, in pazienti con MM ed MGUS, considerato che tali patologie si evidenziano in soggetti con un'età superiore ai 65 anni.

Sulla base del pannello degli anticorpi monoclonali utilizzati (Tab.1), sono state distinte 4 sottopopolazioni delle cellule B memoria, nel sangue midollare:

- IgD+CD27- linfociti B vergini
- IgD+CD27+ linfociti B memoria unswitched
- IgD-CD27+ linfociti B memoria switched (IgG, IgA)
- IgD-CD27- linfociti B memoria tardivi (IgG, IgA)

L'analisi multiparametrica in citometria a flusso in campioni di sangue midollare in pazienti con MM e MGUS, ci ha permesso di studiare l'antigene di maturazione dei linfociti B CD19+, secondo l'espressione del CD27 e IgD. In entrambi i casi la popolazione B naïve (IgD+CD27-) è ben rappresentata (MM, Mean =42,4%; MGUS, Mean =45,3%). La popolazione B memoria tardiva, DN

(doppio negativa) CD27-IgD-, è più rappresentata nei campioni con MM rispetto a quelli con MGUS (MM Mean=23,3%; MGUS Mean=20%), figg. 5.a-5.b.

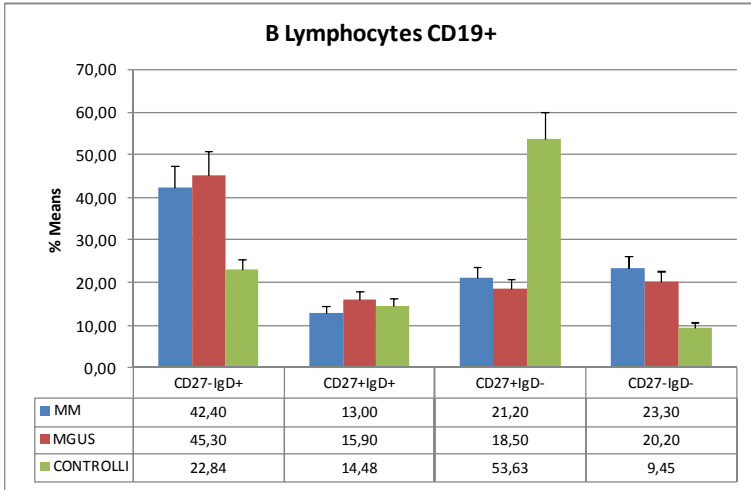


Fig. 5.a – Valori medi dell'espressione IgD/CD27 nella popolazione dei linfociti B (CD19+), in pazienti con MM, MGUS e controlli

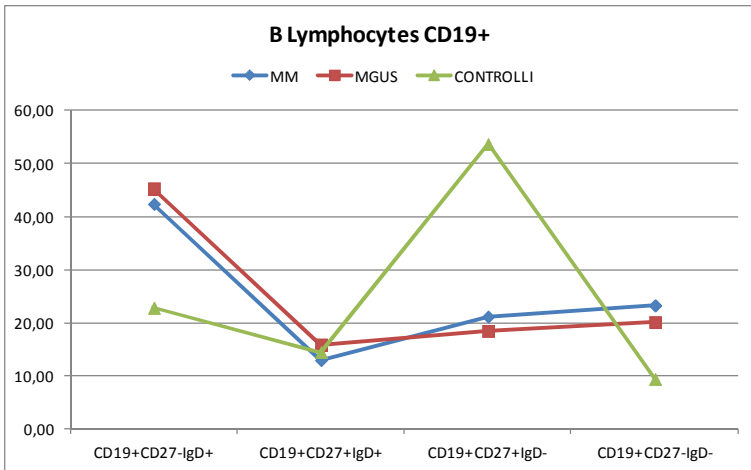


Fig. 5.b – Valori medi dell'espressione IgD/CD27 nella popolazione dei linfociti B (CD19+), in pazienti con MM, MGUS e controlli

Abbiamo notato inoltre che la popolazione DN è presente nelle plasmacellule CD38+++ in entrambi i campioni MM ed MGUS (Figg. 6.a – 6.b).

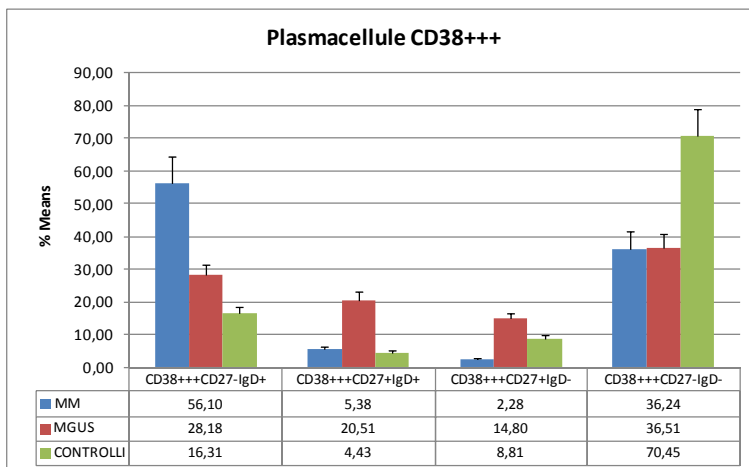


Fig. 6.a – Valori medi dell'espressione IgD/CD27 nella popolazione Plasmacellulare (CD38+++), in pazienti con MM, MGUS e controlli

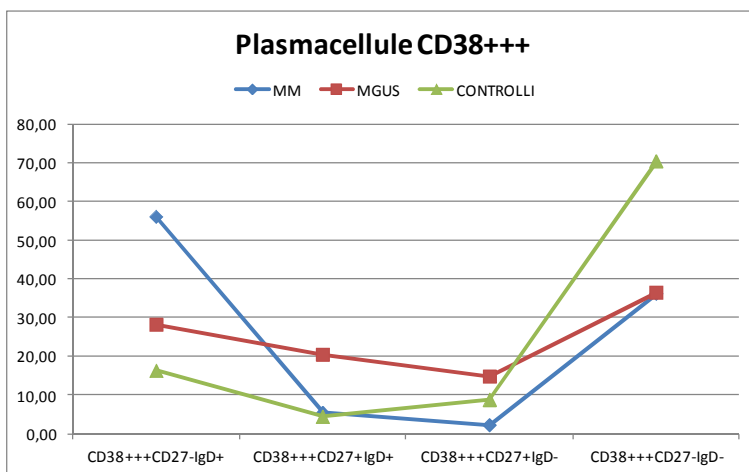


Fig. 6.b – Valori medi dell'espressione IgD/CD27 nella popolazione Plasmacellulare (CD38+++), in pazienti con MM, MGUS e controlli

L'espressione delle IgG intracitoplasmatiche è maggiormente rappresentata fra la popolazione DN delle plasmacellule dei pazienti con MM (Figg.7.a – 7.b).

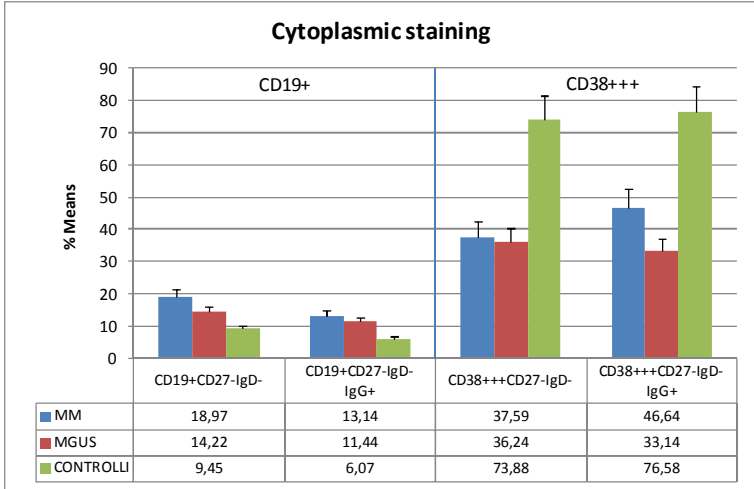


Fig. 7.a – Espressione IgG Intracitoplasmatiche nella popolazione DN (CD19+CD38+++)

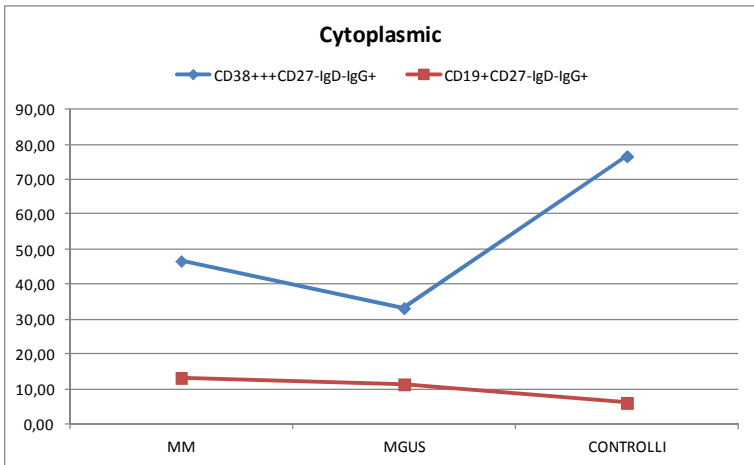


Fig. 7.b – Espressione IgG Intracitoplasmatiche nella popolazione DN (CD19+CD38+++)

Anche l'espressione delle IgG di Membrana è maggiormente rappresentata fra la popolazione DN delle plasmacellule dei pazienti con MM (Fig. 8).

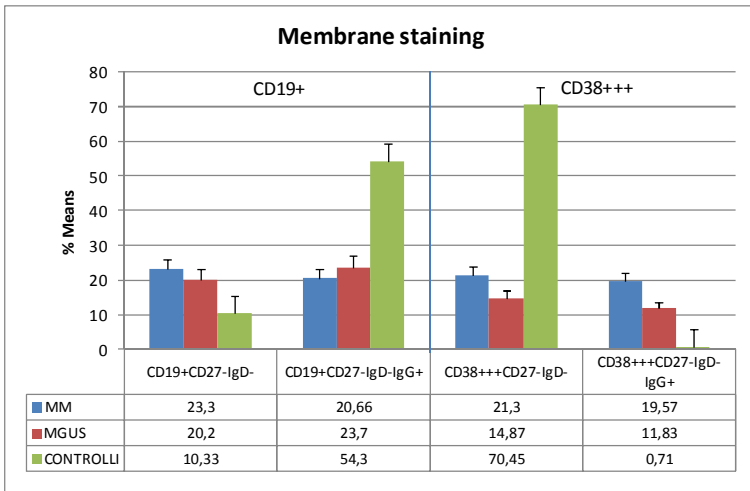


Fig. 8 – Espressione IgG di membrana nella popolazione DN (CD19+CD38+++)

Una parte della popolazione DN, mostra l'espressione delle IgG di membrana e intracitoplasmatica, segno di avvenuto switch isotipico.

L'espressione delle IgG in particolare è maggiormente aumentata fra la popolazione DN delle plasmacellule dei pazienti con MM, sia di membrana (Mean=19,57%), che intracitoplasmatica (Mean=46,64%), Fig. 9.

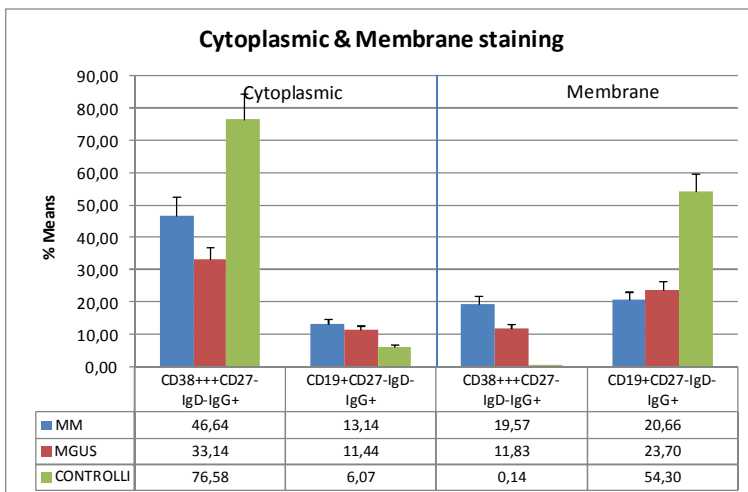
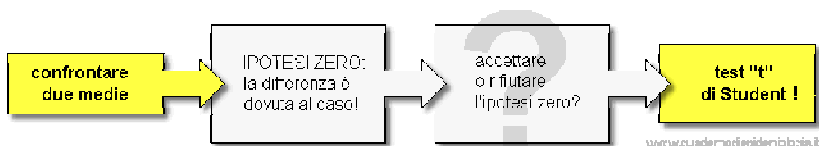


Fig. 9 – Espressione delle IgG intracitoplasmatiche e di membrana nella popolazione DN delle plasmacellule (CD38+++ e dei linfociti B (CD19+)

I dati in nostro possesso sono stati anche oggetto di una analisi condotta attraverso il test t-student (test di confronto tra due medie) al fine di verificare l’eventuale significatività dei parametri indagati.

In particolare è stato condotto il test t-student (con $\alpha=0,05$) mettendo a confronto per ogni immunofenotipo, le medie delle sottopopolazioni indagate nei gruppi di pazienti con MM, MGUS e nel gruppo di CONTROLLO al fine di comprendere se la differenza tra le medie rilevate è “significativa” o è “dovuta al caso”.

Il percorso logico seguito dal test t-student può essere rappresentato come segue:

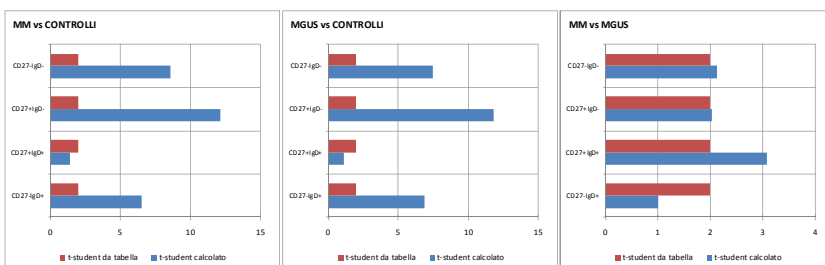


Il valore del t-student calcolato per ogni coppia di medie rilevate sui gruppi di pazienti è stato di volta in volta confrontato con il valore t-student indicato nelle relative tabelle di distribuzione statistica.

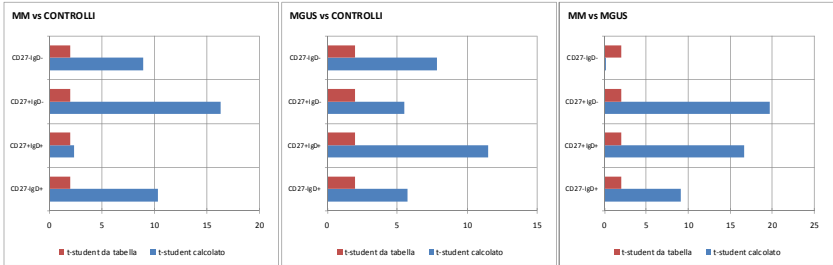
Quando il valore t-student calcolato, per le medie indagate, è maggiore di quello tabulato si deve rifiutare l'ipotesi nulla di eguaglianza e concludere che la differenza riscontrata tra i livelli del parametro esaminato è “significativa”; in caso contrario la differenza tra le medie indagate è “dovuta al caso”.

Di seguito si riportano graficamente i risultati ottenuti.

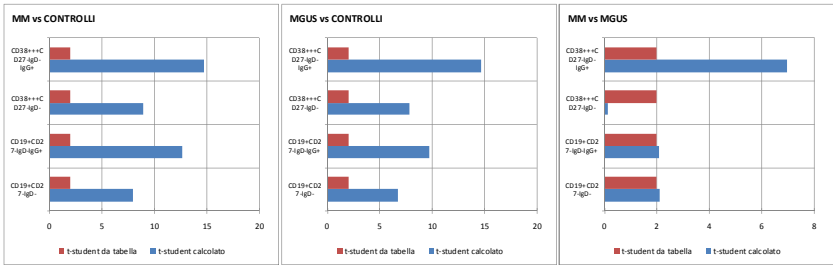
Test t-student per parametro Linfociti B CD19+



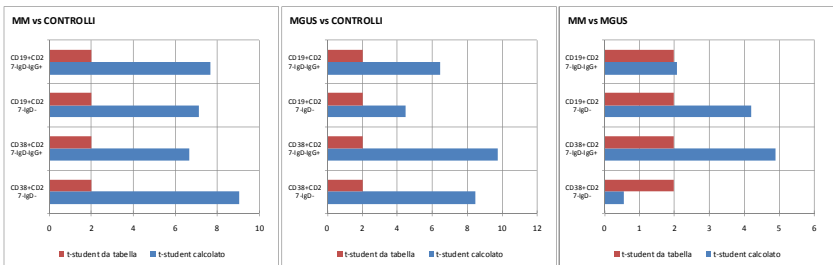
Test t-student per parametro Plasmacellule CD38+++



Test t-student per parametro Membrane staining



Test t-student per parametro Cytoplasmic staining



Nella seguente tabella (Tab. 2) sono riepilogati i risultati di tale analisi e distinte le differenze tra le medie delle sottopopolazioni in “S – Significativa” ed “NS – Non significativa”:

Sottopopolazione	MM vs CONTROLLO	MGUS vs CONTROLLO	MM vs MGUS
CD19+CD27-IgD+	S	S	NS
CD19+CD27+IgD+	NS	NS	S
CD19+CD27+IgD-	S	S	S
CD19+CD27-IgD-	S	S	S
CD38+++CD27-IgD+	S	S	S
CD38+++CD27+IgD+	S	S	S
CD38+++CD27+IgD-	S	S	S
CD38+++CD27-IgD-	S	S	NS
CD19+CD27-IgD- di membrana	S	S	S
CD19+CD27-IgD-IgG+ di membrana	S	S	S
CD38+++CD27-IgD- di membrana	S	S	NS
CD38+++CD27-IgD-IgG+ di membrana	S	S	S
CD38+++CD27-IgD- intracitoplasmatica	S	S	NS
CD38+++CD27-IgD-IgG+ intracitoplasmatica	S	S	S
CD19+++CD27-IgD- intracitoplasmatica	S	S	S
CD19+++CD27-IgD-IgG+ intracitoplasmatica	S	S	S

Tab. 2

CAPITOLO 6 – CONCLUSIONI

L'allungamento della vita media e il conseguente carico antigenico sono la causa principale del fenomeno dell'immunosenescenza, che condiziona l'aspettativa di vita nell'uomo. Anche i linfociti subiscono modificazioni con l'invecchiamento, come suggeriscono l'incrementata incidenza di autoanticorpi, le gammopatie monoclonali, e le leucemie linfatiche croniche (Weksler, 2000; Weksler and Szabo, 2000).

L'esaurimento del sistema immunitario negli anziani è stato ampiamente dimostrato per quel che riguarda la branca T cellulare [Akbar and Fletcher, 2005] e si è pensato che questo possa verificarsi anche per il compartimento B linfocitario. D'altro canto, è stato dimostrato che la stimolazione del sistema immunitario prolungata nel tempo, come avviene in pazienti con lupus eritematoso sistemico [Anolik et al., 2004], è correlata con l'espansione di queste cellule DN. Crediamo che lo studio approfondito del comportamento dei linfociti B nell'anziano sia uno degli obiettivi da perseguire per capire meglio il fenomeno dell'immunosenescenza, dato che la branca B cellulare contribuisce all'insorgenza delle patologie autoimmuni, che i tumori B cellulari costituiscono la gran parte dei tumori ematologici negli anziani [Chiorazzi et al., 2005] e, infine, i

linfociti B sono strettamente correlati alla risposta ai vaccini. Nella presente tesi si è focalizzata l'attenzione sullo studio delle sottopopolazioni delle cellule B, nei pazienti con MM e MGUS, concentrando la nostra attenzione su un subset di linfociti B negativi per entrambi i markers IgD e CD27.

Studiando la popolazione DN, abbiamo riscontrato caratteristiche sovrapponibili a quelle delle cellule B memoria classiche (IgD- CD27+), cioè la presenza di IgG di membrana e intracitoplasmatiche (indice di avvenuto switch isotipico). I dati più significati riguardano le plasmacellule DN (CD38+++CD27-IgD-) dei soggetti con MM ed MGUS, che sono significativamente ridotte rispetto ai controlli mentre le CD38+++CD27-IgD+ risultano essere aumentate nei pazienti con MM, per cui si può ipotizzare che, in entrambe le patologie MM ed MGUS, si ha un rimodellamento della popolazione a livello midollare. Sembra anche che le plasmacellule dei pazienti con MM ed MGUS, data la riduzione significativa di IgG intracitoplasmatiche, riducano gradualmente la capacità di produrre anticorpi. Per quanto riguarda i linfociti B midollari, nei pazienti con MM ed MGUS presentano elevati valori sia di cellule B naive (CD19+CD27-IgD+), che di cellule DN (CD19+CD27-IgD-). Questo ci suggerisce di studiare ulteriormente l'origine di tali cellule. Considerando che le cellule B DN, sono aumentate sia negli anziani che nei pazienti con LES,

due modelli di infiammazione cronica, il loro incremento anche nel midollo dei pazienti con MM ed MGUS, potrebbe diventare uno strumento ausiliare per la diagnosi precoce di tali patologie, a supporto dei normali strumenti diagnostici.

L'ipotesi è che tali cellule potrebbero essere “deregolate” e che subiscono la trasformazione tumorale. Ulteriori studi sono necessari per avvalorare tale ipotesi. I nostri risultati rafforzano recenti dati ottenuti in pazienti con lupus (Wei et.al. 2007), suggerendo che queste cellule DN sono cellule B memoria. Diversi autori si sono dibattuti per quanto riguarda l'origine e il significato biologico delle cellule B, DN, ed hanno ipotizzato che potrebbero rappresentare un lineage distinto delle cellule B memoria o progenitori delle cellule memoria CD27+.

L'ipotesi avanzata è che tali cellule siano linfociti B “memoria tardivi” che hanno perso la capacità funzionale, che hanno down modulato l'espressione del CD27 e che occupano lo spazio immunologico nei pazienti con MM e MGUS. Si è suggerito che la popolazione B e plasmacellulare doppio negativa, così espansa in tali pazienti, potrebbe essere il risultato di una stimolazione prolungata nel tempo o, alternativamente, dovuta a una deregolazione del sistema immune.

BIBLIOGRAFIA

- Agematsu, K., Nagumo, H., Oguchi, Y., Nakazawa, T., Fukushima, K., Yasui, K., Ito, S., Kobata, T., Morimoto, C. & Komiyama, A. (1998) Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells: synergistic effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interaction. *Blood*, 91, 173–180.
- Agematsu, K., Hokibara, S., Nagumo, H., Komiyama, A., 2000. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol. Today* 21, 204–206.
- Agrawal, S., Gupta, S., 2010. TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors. *J. Clin. Immunol.*, doi:10.1007/s10875-010-9456-8.
- Appay, V., Sauce, D., Prelog, M., 2010. The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals. *Ageing* 2, 78–81.
- Anolik, J.A., Barnard, J., Cappione, A., Pugh-Bernard, A.E., Felgar, R.A., Looney, R.J., Sanz, I., 2004. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 40, 3580–3590.
- Balistreri, C.R., Candore, G., Listì, F., Fazio, T., Gangi, S., Incalcaterra, E., Caruso, M., Vecchi, M.L., Lio, D., Caruso, C.,

2007. Role of TLR4 polymorphisms in inflammatory responses: implications for unsuccessful ageing. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1119, 203–207.

- Balistreri, C.R., Candore, G., Caruso, M., Incalcaterra, E., Franceschi, C., Caruso, C., 2008. Role of polymorphisms of CC-chemokine receptor-5 gene in acute myocardial infarction and biological implications for longevity. *Haematologica* 93, 637–638.
- Barlogie B, Epstein J, Selvanayagam P, Alexanian R – Plasma cell myeloma: new biological insights and advances in therapy – *Blood* 1989; 73: 865-879.
- Bergsagel PL, Kuehl WM. The molecular biology of multiple myeloma. In: Malpas JS, Bergsagel DE , Kyle RA, Anderson KC, eds *Myeloma biology and management*. 3rd ed Philadelphia . Saunders, 2004 :35-58.
- Breitbart, E., Wang, X., Leka, L.S., Dallal, G.E., Meydani, S.N., Stollar, B.D., 2002. Altered memory B-cell homeostasis in human ageing. *J. Gerontol. A: Biol. Sci. Med. Sci.* 57, B304–B311.
- Bruunsgaard, H., Andersen-Ranberg, K., Hjelmberg, J.B., Pedersen, B.K., Jeune, B., 2003. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *Am. J. Med.* 115, 278–283.

- Cancro, M.P., Hao, Y., Scholz, J.L., Riley, R.L., Frasca, D., Dunn-Walters, D.K., et al., 2009. B cells and ageing: molecules and mechanisms. *Trends Immunol.* 30, 313–318.
- Cevenini, E., Caruso, C., Candore, G., Capri, M., Nuzzo, D., Duro, G., Rizzo, C., Colonna- Romano, G., Lio, D., Di Carlo, D., Palmas, M.G., Scurti, M., Pini, E., Franceschi, C., Vasto, S., 2010. Age-related inflammation: the contribution of different organs, tissues and systems. how to face it for therapeutic approaches. *Curr. Pharm. Des.* 16, 609–618.
- Chong, Y., Ikematsu, H., Yamaji, K., Nishimura, M., Nabeshima, S., Kashiwagi, S., Hayashi, J., 2005. CD27+ (memory) B cells decrease and apoptosisresistant CD27– (naïve) B cells increase in aged humans: implication for age-related peripheral B cell developmental disturbances. *Int. Immunol.* 17, 383–390.
- Colonna Romano, G., Cossarizza, A., Aquino, A., Scialabba, G., Bulati, M., Lio, D., Candore, G., Di Lorenzo, G., Fradà, G., Caruso, C., 2002. Age- and gender-related values of lymphocyte subsets in subjects from northern and southern Italy. *Arch. Gerontol. Geriatr. (Suppl)* 8, 99–107.
- Colonna Romano, G., Bulati, M., Aquino, A., Scialabba, G., Candore, G., Lio, D., Motta, M., Malaguarnera, M., Caruso, C.,

2003. B cells in the aged: CD27, CD5 and CD40 expression. *Mech. Ageing Dev.* 124, 389–393.
- Colonna Romano, G., Bulati, M., Aquino, A., Pellicanò, M., Vitello, S., Lio, D., Candore, G., Caruso, C., 2009. A double-negative (IgD–CD27–) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mech. Ageing Dev.* 130, 81–690.
 - Derhovanessian, E., Maier, A.B., Beck, R., Jahn, G., Hähnel, K., Slagboom, P.E., de Craen, A.J., Westendorp, R.G., Pawelec, G., 2010. Hallmark features of immunosenescence are absent in familial longevity. *J. Immunol.* 185, 4618–4624.
 - Ershler, W.B., Keller, E.T., 2000. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Ann. Rev. Med.* 51, 245–270.
 - Faria, A.M., de Moraes, S.M., de Freitas, L.H., Speziali, E., Soares, T.F., Figueiredo-Neves, S.P., Vitelli-Avelar, D.M., Martins, M.A., Barbosa, K.V., Soares, E.B., Sathler-Avelar, R., Peruhype-Magalhaes, V., Cardoso, G.M., Comin, F., Teixeira, R., Eloi-Santos, S.M., Queiroz, D.M., Correa-Oliveira, R., Bauer, M.E., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., 2008. Variation rhythms of lymphocyte subsets during healthy ageing. *Neuroimmunomodulation* 15, 365–379.

- Fecteau, J.F., Coté, G., Néron, S., 2006. A new memory CD27–IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J. Immunol.* 177, 3728–3736.
- Franceschi, C., Monti, D., Sansoni, P., Cossarizza, A., 1995. The immunology of exceptional individuals: the lessons of centenarian. *Immunol. Today* 16, 12–16.
- Franceschi, C., Valensin, S., Bonafè, M., Paolisso, G., Yashin, A.I., Monti, D., De Benedictis, G., 2000b. The network and the remodeling theories of ageing: historical background and new perspectives. *Exp. Gerontol.* 35, 879–896.
- Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., De Benedictis, G., 2000c. Inflamm-ageing. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908, 244–254.
- Franceschi, C., Olivieri, F., Marchegiani, F., Cardelli, M., Cavallone, L., Capri, M., Salvioli, S., Valensin, S., De Benedictis, G., Di Iorio, A., Caruso, C., Paolisso, G., Monti, D., 2005. Genes involved in immune response/inflammation, IGF1/insulin pathway and response to oxidative stress play a major role in the genetics of human longevity: the lesson of centenarians. *Mech. Ageing Dev.* 126, 351–361.

- Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Oliveri, F., Sevini, F., Panourgia, M.P., et al., 2007. Inflammageing and anti-inflammageing: a systemic perspective of ageing and longevity emerged from studies in humans. *Mech. Ageing Dev.* 128, 92–105.
- Frasca, D., Landin, A.M., Lechner, S.C., Ryan, J.G., Schwartz, R., Riley, R.L., Blomberg, B.B., 2008. Ageing down-regulates the transcription factor E2A, activation-induced cytidine deaminase, and Ig class switch in human B cells. *J. Immunol.* 180, 5283–5290.
- Frasca, D., Diaz, A., Romero, M., Landin, A.M., Blomberg, B.B., 2010b. Age effects on B cells and humoral immunity in humans. *Ageing Res Rev*, doi:10.1016/j.arr.2010.08.004.
- Gao, H.M., Hong, J.S., 2008. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol.* 29, 357–365.
- Gardner, E.M., Gonzales, E.W., Nogusa, S., Murasko, D.M., 2006. Age-related changes in the immune response to influenza vaccination in a racially diverse, healthy elderly population. *Vaccine* 24, 1609–1614.
- Genton, B., D’Acremont, V., Furrer, H.J., Hatz, C., Louis, L., 2006. Hepatitis A vaccines and the elderly. *Travel. Med. Infect. Dis.* 4, 303–312.

- Ginaldi, L., Di Benedetto, M.C., De Martinis, M., 2005. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immun. Ageing* 2, 14.
- Globerson, A., Effros, R.B., 2000. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol. Today* 21, 515–521.
- Hata H., Xiao H., petrucci M. et al. Interleukin-6 gene expression in multiple myeloma: a characteristic of immature tumoe cells. *Blood*, 81 3357, 1993.
- Harris, D.P., Haynes, L., Sayles, P.C., Duso, D.K., Eaton, S.M., Lepak, N.M., et al., 2000. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cell. *Nat. Immunol.* 1, 475–482.
- Hintzen, R.Q., de Jong, R., Lens, S.M. & van Lier, R.A. (1994) CD27: marker and mediator of T-cell activation. *Immunology Today*, 15, 307–311.
- Huppert, F.A., Solomou, W., O'Connor, S., Morgan, K., Sussams, P., Brayne, C., 1998. Ageing and lymphocyte subpopulations: whole-blood analysis of immune markers in a large population sample of healthy elderly individuals. *Exp. Gerontol.* 33, 593–600.
- Klein, U., Rajewsky, K., Küppers, R., 1998. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for

somatically mutated (memory) B cells. *J. Exp. Med.* 188, 1679–1689.

- Kumar, S., Witzig, T.E., Timmin, M., et al. Bone marrow angiogenic ability and expression of angiogenic cytokines in myeloma: evidence favoring loss of marrow angiogenesis inhibitory activity with disease progression. *Blood*, 2004;104, 1159 – 1165.
- Kyle RA. Multiple myeloma: how did it begin? *Mayo Clin Proc.* 1994 Jul;69(7):680-3.
- Kyle, R.A., Therneau, T.M., Rajkumar, S.V., Offord, J.R., Larson, D.R., Plevak, M.F. & Melton, L.J. (2002) A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *New England Journal of Medicine*, 346, 564–569.
- Kyle, R.A., Therneau, T.M., Rajkumar, S.V., Remstein, E.D., Offord, J.R., Larson, D.R., Plevak, M.F. & Melton, III, L.J. (2003) Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 102, 3759–3764.
- Kyle, R.A. & Rajkumar, S.V. (2006) Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *British Journal of Haematology*, 134, 573–589.
- Landgren O, Kyle R.A, Pfeiffer R.M, e. Monoclonal gammopathy of undetermined significance preceding multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009; 113; 5412-5417.

- LeMaout, J., Delassus, S., Dyll, R., Nikolić-Zugić, J., Kourilsky, P., Weksler, M.E., 1997. Clonal expansions of B lymphocytes in old mice. *J. Immunol.* 159, 3866–3874.
- Libby, P., 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868–874.
- Lio, D., Candore, G., Crivello, A., Scola, L., Colonna Romano, G., Cavallone, L., Hoffmann, E., Caruso, M., Licastro, F., Caldarera, C.M., Branzi, A., Franceschi, C., Caruso, C., 2004. Opposite effects of interleukin 10 common gene polymorphisms in cardiovascular diseases and in successful ageing: genetic background of male centenarians is protective against coronary heart disease. *J. Med. Genet.* 41, 790–794.
- Listì, F., Candore, G., Modica, M.A., Russo, M.A., Di Lorenzo, G., Esposito-Pellitteri, M., Colonna Romano, G., Aquino, A., Bulati, M., Lio, D., Franceschi, C., Caruso, C., 2006. A study of serum immunoglobulin levels in elderly persons that provides new insights into B cell immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1089, 487–495.
- Mali M., Jaakkola P., Arvilommi A.M. et al. Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, 265: 6884, 1990.
- Manz, R.A., Thiel, A., Radbruch, A., 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388, 133–134.

- Martin, F., Chan, A.C., 2006. B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 467–496.
- McKenna, R.W., Washington, L.T., Aquino, D.B., Picker, L.J., Kroft, S.H., 2001. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood* 98, 2498–2507.
- Miller, J.P., Cancro, M.P., 2007. B cell and ageing: balancing the homeostatic equation. *Exp. Gerontol.* 42, 396–399.
- Morice, W.G., Hanson, C.A., Kumar, S., Frederick, L.A., Lesnick, C.E. & Greipp, P.R. (2007) Novel multi-parameter flow cytometry sensitively detects phenotypically distinct plasma cell subsets in plasma cell proliferative disorders. *Leukemia*, 21, 2043–2046
- Murasko, D.M., Bernstein, E.D., Gardner, E.M., Gross, P., Munk, G., Dran, S., et al., 2002. Role of humoral and cell-mediated immunity in protection from influenza disease after immunization of healthy elderly. *Exp. Gerontol.* 37, 427–439.
- Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, Garcia-Sanz R, et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis

between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol* 1998;152: 1655-65.

- Olteanu, H., Wang, H.Y., Chen, W., McKenna, R.W. & Karandikar, N.J. (2008) Immunophenotypic studies of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *BMC Clinical Pathology*, 8, 1–9.
- O’Mahony, L., Holland, J., Jackson, J., Feighery, C., Hennessy, T.P., Mealy, K., 1998. Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production. *Clin. Exp. Immunol.* 113, 213–219.
- Paganelli, R., Quinti, I., Fagiolo, U., Cossarizza, A., Ortolani, C., Guerra, E., Sansoni, P., Pucillo, L.P., Scala, E., Cozzi, E., Bertollo, L., Monti, D., Franceschi, C., 1992. Changes in circulating B cells and immunoglobulin classes and subclasses in a healthy aged population. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 351–354.
- Pawelec, G., Barnett, Y., Forsey, R., Frasca, D., Globerson, A., McLeod, J., et al., 2002. T cells and ageing. *Front. Biosci.* 7, d1056–d1183.
- Pawelec, G., Akbar, A.N., Caruso, C., Effros, R., Grubeck-Loebenstien, B., Wikby, A., 2004. Is immunosenescence infectious? *Trends Immunol.* 25, 406–410.

- Pawelec, G., Akbar, A.N., Caruso, C., Solana, R., Grubeck-Loebenstien, B., Wikby, A., 2005. Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol. Rev.* 20, 257–268.
- Pawelec, G., Larbi, A., 2008. Immunity and ageing in man: *Annual Review 2006/2007. Exp. Gerontol.* 43, 34–38.
- Pes, G.M., Lio, D., Carru, C., Deiana, L., Baggio, G., Franceschi, C., Ferrucci, L., Oliveri, F., Scola, L., Crivello, A., Candore, G., Colonna Romano, G., Caruso, C., 2004. Association between longevity and cytokine gene polymorphisms. A study in Sardinian centenarians. *Aging Clin. Exp. Res.* 16, 244–248.
- Rajkumar, S.V., Leong, T., Roche, P.C., et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research* 2000,6, 3111-3116.
- Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematol* 2008; 93(3):431-8.
- Roodman, G.D. (2002) Role of the bone marrow microenvironment in MM. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17, 1921–1925.
- Rossi, M.I., Yokota, T., Medina, K.L., Garrett, K.P., Comp, P.C., Schipul Jr., A.H., et al., 2003. B lymphopoiesis is active

throughout human life, but there are developmental age-related changes. *Blood* 101, 576–584.

- Sanz, I., Anolik, J.H., Looney, R.J., 2007. B cell depletion therapy in autoimmune disease. *Front. Biosci* 12, 2546–2567.
- Saunders G. Overview of drug therapy for multiple myeloma. *J Oncol Pharm Pract.* 2005 Sep; 11(3):83-100.
- Schenkein, J.G., Park, S., Nahm, M.H., 2008. Pneumococcal vaccination in older adults induces antibodies with low opsonic capacity and reduced antibody potency. *Vaccine* 26, 5521–5526.
- Shi, Y., Yamazaki, T., Okubo, Y., Uehara, Y., Sugane, K., Agematsu, K., 2005. Regulation of aged humoral immune defense against pneumococcal bacteria by IgM memory B cell. *J. Immunol.* 175, 3262–3267.
- Sirohi B, Powels R. Multiple myeloma. *Lancet.* 2004 Mar 13;363(9412):875-87. Review.
- Tangye, S.G., Hodgkin, P.D., 2004. Divide and conquer: the importance of cell division in regulating B cell responses. *Immunology* 112, 509–520.
- Terstappen, L.W., Johnsen, S., Segers-Nolter, I.M. & Loken, M.R. (1990) Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood*, 76, 1739–1747.

- Tura S.- Lezioni di ematologia- Società Editrice Esculapio 2003; 410-433.
- Vacca, A., Ribatti, D., Roncali, L., et al. Bone Marrow angiogenesis and progression in multiple mieloma. *British Journal of Haematology* 1994, 87, 503-508.
- Van Baarle, D., Tsegaye, A., Miedema, F., Akbar, A., 2005. Significance of senescence for virus-specific memory T cell responses: rapid ageing during chronic stimulation of the immune system. *Immunol. Lett.* 97, 19–29.
- Van Zaanen H.C., Vet R.J., de Jong C.M. et al. A simple and sensitive method for determining plasma cell isotype and monoclonality in bone marrow using flow Cytometry. *Br. J. Haematol.*, 91: 55, 1995.
- Vasto, S., Colonna-Romano, G., Larbi, A., Wikby, A., Caruso, C., Pawelec, G., 2007. Role of persistent CMV infection in configuring T cell immunity in the elderly. *Immun. Ageing* 4, 2.
- Veneri, D., Ortolani, R., Franchini, M., Tridente, G., Pizzolo, G., Vella, A., 2009. Expression of CD27 and CD23 on peripheral blood B lymphocytes in humans of different ages. *Blood Transfus.* 7, 29–34.
- Wack, A., Cossarizza, A., Heltai, S., Barbieri, D., D'Addato, S., Franceschi, C., Dellabona, P., Casorati, G., 1998. Age-related modifications of the human alphabeta T cell repertoire due to

different clonal expansions in the CD4+ and CD8+ subsets. *Int. Immunol.* 10, 1281–1288.

- Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., Zheng, B., Pugh-Bernard, A., Brooks, J., Lee, E.H., Milner, E.C.B., Sanz, I., 2007. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 178, 6624–6633.
- Weinberger, B., Herndler-Brandstetter, D., Schwanninger, A., Weiskopf, D., Grubeck-Loebenstien, B., 2008. Biology of immuneresponses to vaccine in elderly persons. *Clin. Infect. Dis.* 46, 1078–1084.
- Weinberger, B., Weiskopf, D., Grubeck-Loebenstien, B., 2009. Immunology and ageing. In: Halter, J.B., Ouslander, J.G., Tinetti, M.E., et al. (Eds.), *Hazzard's Geriatric Medicine and Gerontology*, 6th edn. McGraw-Hill, Columbus, pp. 23–36.
- Weiss, M.B., Verma, P., Abadie, J., Howard, R. & Kuehl, M. (2008) A pre-existing plasma cell disorder occurs in most patients with MM. *Blood*, 112, abstract no: 1693.
- Weksler, M.E., Szabo, P., 2000. The effect of age on the B-cell repertoire. *J. Clin. Immunol.* 20, 240–249.
- William, J., Euler, C., Christensen, S., Shlomchik, M.J., 2002. Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* 297, 2066–2070.

- Wikby, A., Johansson, B., Ferguson, F., Olsson, J., 1994. Age related changes in immune parameters in a very old population of Swedish people: a longitudinal study. *Exp. Gerontol.* 29, 531–541.
- Witzig T., Kimlinger T.K., Ahmann G.J. et al. Detection of myeloma cells in the peripheral blood by flow Cytometry. *Cytometry*, 26: 113,1996.
- Wolniak, K.L., Shinal, S.M., Waldschmidt, T.J., 2004. The germinal center response. *Crit. Rev. Immunol.* 24, 39–65.
- Xiao, Y., Hendriks, J., Langerak, P., Jacobs, H., Borst, J., 2004. CD27 is acquired by primed B cells at the centroblast stage and promotes germinal center formation. *J. Immunol.* 172, 7432–7441.
- Zheng, B., Han, S., Takahashi, Y., Kelsoe, G., 1997. Immunosenescence and germinal center reaction. *Immunol. Rev.* 160, 63–77.