



Fondazione M. Tettamanti  
M. De Marchi ONLUS  
Eretta in Ente morale  
con D.P.R. 24/02/87  
Prefettura di Milano n. 196/325/1

**To:**

Associazione Italiana Sindrome di Shwachman-Diamond (AISS)  
Via Pioveghetto 15, - 35136 Padova  
Tel - FAX +39 049 8736130  
E-mail: aiss@shwachman.it

**Associazione italiana Sindrome di Shwachman-Diamond Research Grant: Report del primo anno e richiesta di supporto per il secondo anno.**

**Titolo: ROLE OF THE HUMAN NICHE IN INDUCING AND SUPPORTING MYELODYSPLASTIC SYNDROME AND/OR LEUKAEMIA EVOLUTION IN SHWACHMAN-DIAMOND SYNDROME PATIENTS**

La SDS è una malattia ereditaria caratterizzata da insufficienza del pancreas esocrino e da alterazioni ematologiche legate a disfunzione midollare, caratterizzata principalmente da una neutropenia costante o intermittente, meno frequentemente da una piastrinopenia e un'anemia; più raramente sono presenti mielodisplasia e leucemia. A queste anomalie si possono associare, con frequenza variabile, una bassa statura, alterazioni scheletriche e infezioni ricorrenti. E' stato dimostrato che il midollo osseo dei pazienti SDS non è in grado di supportare e mantenere il processo di ematopoiesi. La neutropenia e i difetti funzionali dei neutrofili giocano, nei pazienti SDS, un ruolo cruciale nelle complicanze dovute alle gravi infezioni ricorrenti e rappresentano una delle cause principali di morte nei primi 12 mesi di vita. Inoltre, in modelli murini, è stato dimostrato come alterazioni a livello delle MSC midollari che presentano l'alterazione del gene SBDS implicato nella SDS, possano indurre trasformazione maligna a livello delle cellule ematopoietiche. Al fine di comprendere potenziali meccanismi alla base di questi fenomeni patogenetici, stiamo studiando *in vivo*, mediante un approccio senza *scaffold* (**Fig. 2A**), il ruolo delle SDS-MSC nell'insufficienza midollare e predisposizione all'insorgenza di tumori ematologici caratteristica nei pazienti SDS. Infatti, la comprensione dei meccanismi molecolari alla base della nicchia ematopoietica può identificare potenziali bersagli terapeutici per prevenire o trattare l'evoluzione della leucemia nei pazienti SDS.

***Generazione in vivo della nicchia ematopoietica mediante pellets semi-cartilaginei di MSC.***

Abbiamo messo a punto la metodica di generazione di una nicchia umanizzata, utilizzando animali immunocompromessi. Le MSC, isolate da midollo di donatori sani, al passaggio 3, una volta raggiunto l'80% di confluenza, sono state tripsinizzate, centrifugate, e risospese in terreno per il differenziamento condrogenico (DMEM-high glucose, 1% di Penicillina-Streptomycin, 1% di L-glutamina, 1% di ITS+premix (6.25 µg/ml insulina, 6.25 µg/ml transferrina, 6.25 ng/ml acido

**SEDE**

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,  
Azienda Ospedaliera San Gerardo  
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia  
C.F. 95587550153  
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646  
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatrionza.it

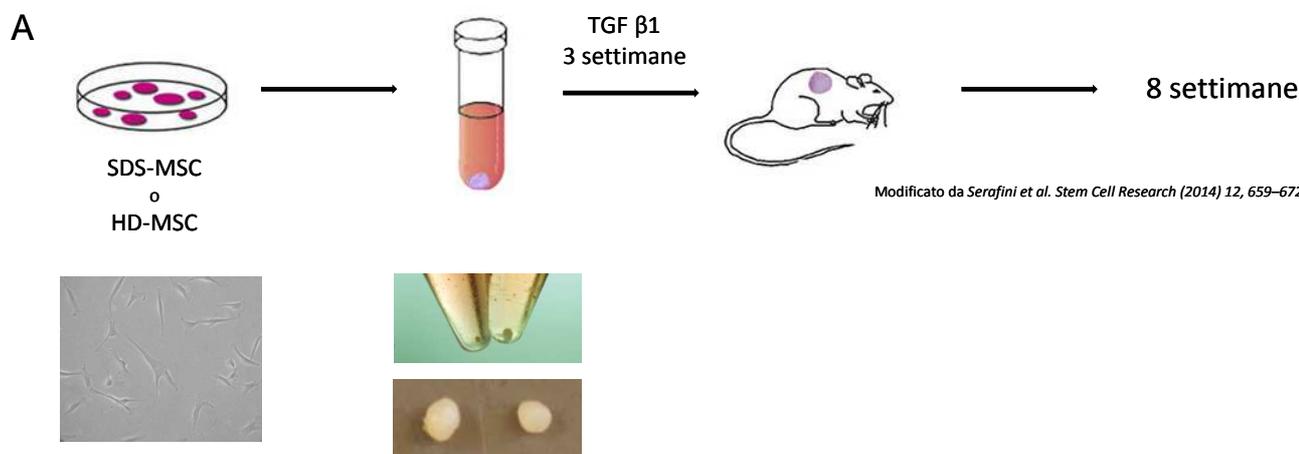
**CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI**

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,  
Azienda Ospedaliera San Gerardo  
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia  
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167  
Tel. Amm.: +39 039 233 2530  
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatrionza.it

selenioso, 1.25 mg/ml albumina di siero bovino e 5.35 mg/ml acido linoleico), 1 mM di Sodio-Piruvato, 50 µg/mL di Acido ascorbico-2 fosfato, 100 nM di Desametasone, 0.1 mM di amminoacidi non essenziali, Transforming-Growth-Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 10 ng/ml). Le sospensioni cellulari sono state nuovamente centrifugate e i pellet così ottenuti sono stati incubati a 37° C al 5% di CO<sub>2</sub> per 21 giorni, sostituendo il terreno di coltura due volte a settimana. Al termine delle 3 settimane di coltura, alcuni pellet rappresentativi sono stati sottoposti ad analisi istologica, per verificare l'avvenuto differenziamento condrogenico, come mostrato in **Fig 2B** l'analisi con ematossilina-eosina e safranina ha mostrato che i tessuti cartilaginei si sono formati correttamente.

I pellet cartilaginei così ottenuti, derivati da MSC di donatori sani, sono stati impiantati nel sottocute del dorso di topi immunodeficienti SCID/BEIGE per riprodurre un modello di nicchia ematopoietica *in vivo* in sede eterotopica (**Fig. 2A**). La procedura di trapianto prevede una prima fase di sedazione dell'animale. I pellet vengono posizionati all'interno di ogni tasca (massimo 4 per tasca) in prossimità dei vasi sanguinei, per favorirne l'irrorazione.

## Figura 2



I pellet sono stati lasciati in sede per 8 settimane e successivamente recuperati per analizzare lo sviluppo della nicchia eterotopica. Gli ossicoli che si ottengono vengono immediatamente fissati ed analizzati. Una colorazione ematossilina-eosina standard viene utilizzata per caratterizzare la loro struttura ed organizzazione. L'immagine **Fig. 2C** raffigura un'ossicolo eterotopico caratterizzato da una corticale ossea esterna ed una tipica cavità midollare interna. In quest'ultima è possibile notare le trabecole ossee, i vasi sinusoidali, il tessuto adiposo e l'abbondante componente midollare costituita da cellule ematopoietiche e stromali (non distinguibili le une dalle altre con questo tipo di

### SEDE

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,  
Azienda Ospedaliera San Gerardo  
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia  
C.F. 95587550153  
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646  
E-mail: [fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it](mailto:fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it)

### CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,  
Azienda Ospedaliera San Gerardo  
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia  
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167  
Tel. Amm.: +39 039 233 2530  
E-mail: [fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it](mailto:fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it)

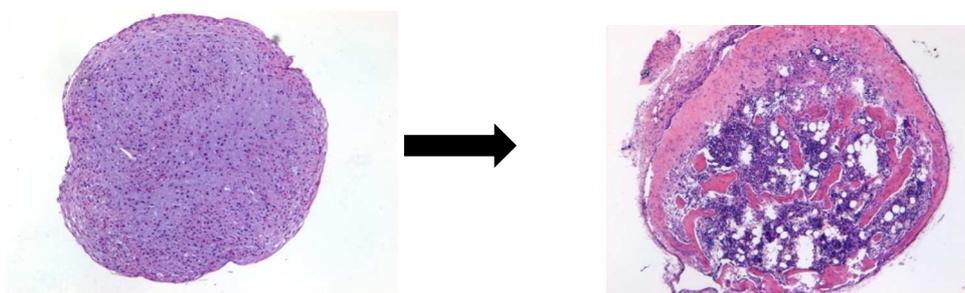
colorazione istologica). Alcuni siti, soprattutto in periferia, presentano residua cartilagine (in blu) (gran parte è stata riassorbita dagli osteoclasti). Interessante, notare i numerosi megacariociti, con i nuclei in blu ed il grosso citoplasma in viola.

## Figura 2

**B**

**C**

Donatore sano  
(HD)



Inoltre, abbiamo ottenuto i pellet semi-cartilaginei (SCP) da 20 SDS-MSC, anche in questo caso l'analisi con H&E ha mostrato che i tessuti cartilaginei si sono formati correttamente, in **Fig 3** sono mostrati 3 pazienti rappresentativi.

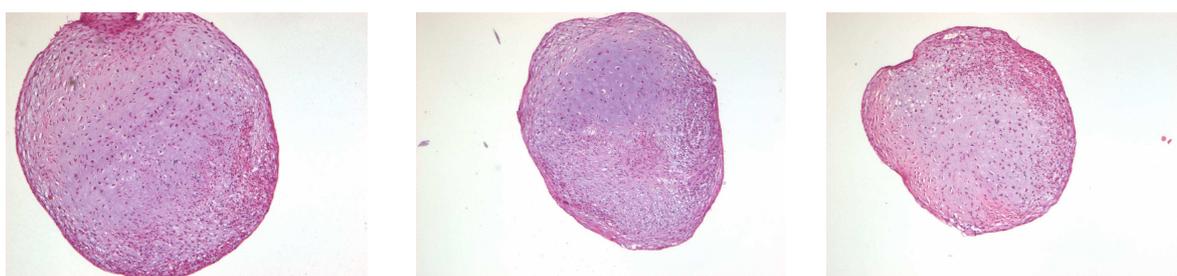
## Figura 3

**FC**

**PG**

**FM**

**Pazienti**



### SEDE

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,  
Azienda Ospedaliera San Gerardo  
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia  
C.F. 95587550153  
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646  
E-mail: [fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it](mailto:fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it)

### CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI

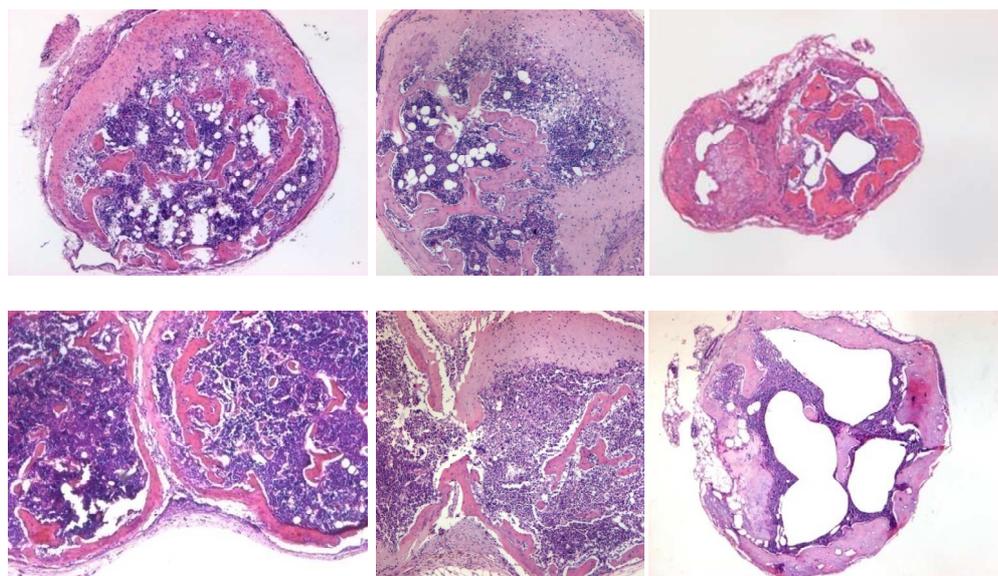
Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,  
Azienda Ospedaliera San Gerardo  
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia  
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167  
Tel. Amm.: +39 039 233 2530  
E-mail: [fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it](mailto:fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it)

## Studio della generazione della nicchia midollare di pazienti SDS in un modello murino

119 Pellet cartilaginei sono stati ottenuti da 16 pazienti SDS, utilizzando la metodica precedentemente descritta, ed impiantati in topi immunodeficienti SCID/BEIGE. Dopo 8 settimane, l'animale è stato sacrificato ed è stata valutata la presenza di ossicoli eterotopici.

Come già dimostrato i pellet cartilaginei ottenuti da donatori sani sono in grado di generare *in vivo* un ossicolo funzionale contenente le trabecole ossee, i vasi sinusoidali, il tessuto adiposo e l'abbondante componente midollare costituita da cellule ematopoietiche e stromali (Fig.4A). Per quanto riguarda lo studio *in vivo* dei pellet ottenuti dai pazienti SDS, sorprendentemente, alla fine della procedura sperimentale in vivo, abbiamo raccolto solo 17 pellet (14%) e nessuno di loro presentava vascolarizzazione o formazione di nicchia del midollo osseo (Fig. 4B)

**Figura 4A**



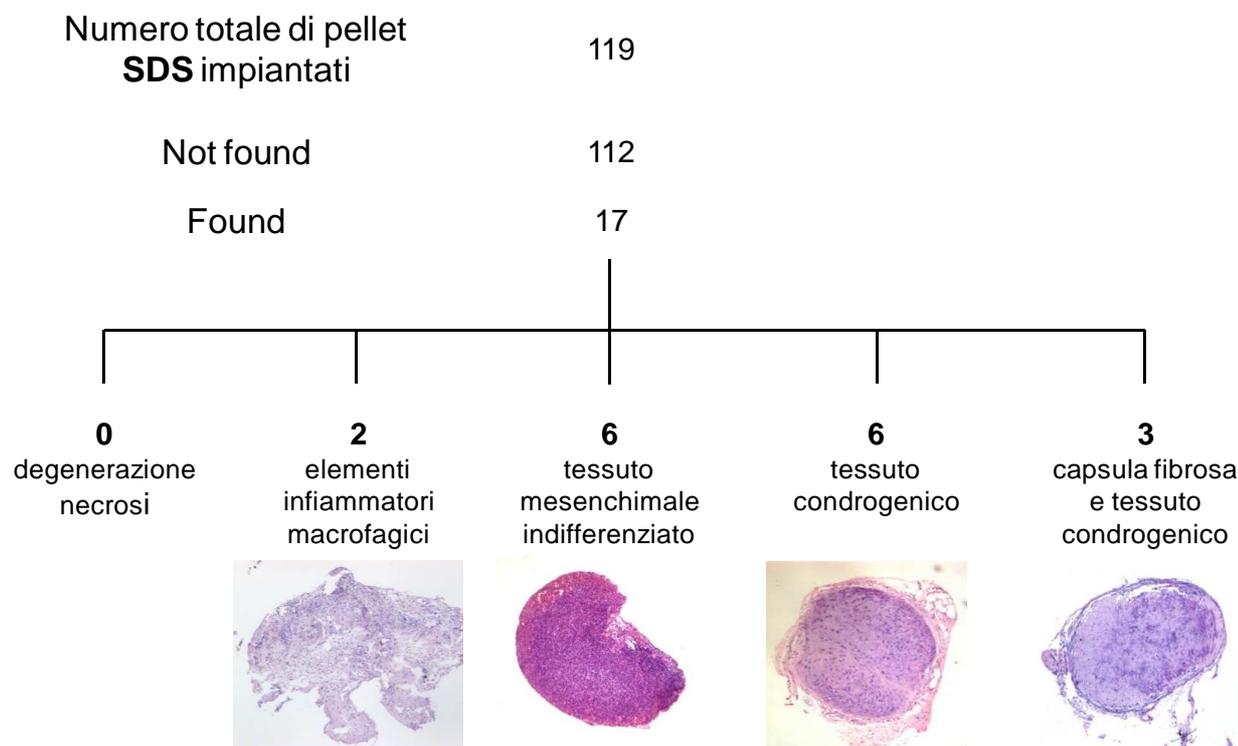
### SEDE

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,  
Azienda Ospedaliera San Gerardo  
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia  
C.F. 95587550153  
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646  
E-mail: [fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it](mailto:fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it)

### CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,  
Azienda Ospedaliera San Gerardo  
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia  
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167  
Tel. Amm.: +39 039 233 2530  
E-mail: [fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it](mailto:fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it)

**Figura 4B**



Per approfondire i meccanismi alla base della mancata capacità dei pellets derivanti da SDS di formare organoidi *in vivo*, abbiamo raccolto i pellet a diversi punti temporali (2 e 4 settimane) ed abbiamo eseguito le analisi istologiche in pellet ottenuti da 3 pazienti SDS. Abbiamo scoperto che dopo 2 settimane, i pellet SDS raccolti non mostrano differenze rilevanti rispetto ai quelli ottenuti dagli HD (Fig 5). In entrambi i casi sono stati trovati pellet condrogenici caratterizzati dalla presenza della matrice cartilaginea endocondrale. A 4 settimane il riassorbimento della cartilagine inizia nei campioni HD, con una deposizione iniziale di matrice osteogenica, mentre nei pellet SDS il processo sembra meno evidente e più lento. All'ultimo punto temporale, abbiamo ottenuto la formazione della nicchia del midollo osseo solo negli HD. Uno dei tre campioni di SDS non è stato trovato, mentre negli altri due casi i pellet raccolti non mostrano vascolarizzazione né formazione di nicchia del midollo osseo. In accordo con i risultati precedentemente descritti, abbiamo trovato tessuto condrogenico e osteogenico senza alcuna evidenza di progressione nella formazione di organoidi (Fig 5).

#### SEDE

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,  
Azienda Ospedaliera San Gerardo  
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia  
C.F. 95587550153  
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646  
E-mail: [fondazione.tettamanti@pediatrionza.it](mailto:fondazione.tettamanti@pediatrionza.it)

#### CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,  
Azienda Ospedaliera San Gerardo  
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia  
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167  
Tel. Amm.: +39 039 233 2530  
E-mail: [fondazione.tettamanti@pediatrionza.it](mailto:fondazione.tettamanti@pediatrionza.it)

**Figura 5**

	chondrogenic	2 weeks	4 weeks	8 weeks
HD				
UPN 89				chondrogenic and bone tissue
UPN 37				not found
UPN 88				chondrogenic and bone tissue

**Piano sperimentale per il prossimo anno:**

Al fine di comprendere le nostre osservazioni:

- Verrà aumentato il numero di pazienti analizzati
- Verranno eseguite ulteriori analisi istologiche e molecolari sugli organoidi ottenuti a diversi punti temporali
- In particolare verrà indagata la mancanza di vascolarizzazione dei pellet, mediante analisi molecolari
- verranno analizzate nel dettaglio le capacità delle MSC di pazienti SDS di formare vasi *in vitro*

Monza, 20/6/2017

Firma

**SEDE**

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,  
Azienda Ospedaliera San Gerardo  
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia  
C.F. 95587550153  
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646  
E-mail: [fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it](mailto:fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it)

**CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI**

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,  
Azienda Ospedaliera San Gerardo  
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia  
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167  
Tel. Amm.: +39 039 233 2530  
E-mail: [fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it](mailto:fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it)