

---

DOCTORAL THESIS SUMMARY

# FETAL MICROCHIMERISM – A NEW TOOL IN CANCER TREATMENT

---

PhD candidate: **CISMARU COSMIN ANDREI**

---

PhD coordinator: Prof.dr. **IOANA NEAGOE**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Stem cell hierarchy in the human organism</b>	17
<b>2. Feto-maternal microchimerism</b>	19
2.1. Introduction	19
2.2 Current understanding of cell trafficking during pregnancy	19
2.3 Fetal microchimerism and natural barriers of the organism	22
2.4 Clinical implications of FMC	24
2.4.1 FMC and tissue repair	25
2.4.2 FMC and autoimmunity	26
2.4.3 FMC and graft versus host disease	27
2.4.4 FMC and cancer	28
2.5. Clinical applications of FMC	29
2..5.1 FMC and prediction of therapeutic response in PBSC transplanted patients	30
2.5.2 FMC and stem cell therapy	31
2.5.3 FMC and allogeneic tolerance	32
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Work hypothesis</b>	35
<b>2. General methodology</b>	36
<b>3. Study 1 - Evaluation of fetal-maternal microchimerism in human hair follicles obtained by eyebrow plucking</b>	38
3.1. Introduction	38
3.2. Objective	38
3.3. Materials and methods	39
3.4. Results	40
3.5. Discussions	44
3.6. Conclusions	46
<b>4. Study 2 - Isolation and molecular characterization of a fetal-</b>	49

---

<b>maternal microchimeric stem cell population in maternal hair follicles long after parturition.</b>	
4.1. Introduction	49
4.2. Objective	50
4.3. Material and methods	51
4.4. Results	54
4.5. Discussions	62
4.6. Conclusions	66
<b>5. Study 3 - Evaluation of the effect of human chorionic gonadotropin on bone marrow mesenchymal stem cells and fetal microchimeric stem cells</b>	68
5.1. Introduction	68
5.2. Objective	69
5.3. Materials and methods	69
5.4. Results	75
5.5. Discussions	98
5.6. Conclusions	103
<b>6. General discussions</b>	104
<b>7. General conclusions</b>	107
<b>8. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	109
<b>REFERENCES</b>	111
<b>SUPPLEMENTARY MATERIAL</b>	

**Keywords:** microchimerism; immunomodulation; transplantation;

## INTRODUCTION

Fetal-maternal microchimerism (FMM) is a form of acquired allogeneic stem cell transfer between the immunocompetent mother and it's fetus during the course of normal pregnancy. Much of this transfer of mononuclear cells is attributed to the immunomodulatory effect of the placenta and its haemochorial implantation which ensures a regulation of the immune responses towards acceptance and tolerance of the fetal structures.

The biological implication of such long-term tolerance towards allogeneic fetal stem cells remains mainly elusive, as FMM is associated with both beneficial and detrimental outcomes for the mother. Their association with tissue repair and protection from

certain cancers of the mother as well as improving the response rate and survival of HSC transplantation patients are positive benefits, but on the other hand the association with a variety of autoimmune disorders is not a rare occurrence. Whether they are directly involved in repair processes in these lesions, act as immune effectors, carry alloantigens to prime maternal immune cells or are simple relics of pregnancy are questions to be further elucidated.

Given the ever-increasing number of required hematopoietic stem cell (HSC) transplantations for patients without HLA-matched donors, graft rejection or graft versus host disease (GVHD) remain important complications that compromise post-transplant survival even in patients receiving thorough immunosuppressive treatments. Enhancing compatibility between the donor and the recipient without intensive long-term pharmacologic immunosuppression has been one of the holy grails in allogeneic HSC transplantation.

The first part of the thesis entitled “the current state of knowledge” discusses the promises and challenges of fetal -maternal microchimerism in the light of future directions to take more advantage of microchimerism-associated benefits in tissue repair and immunomodulation. The second part of the thesis entitled “personal contribution” employs assays to evaluate and means to enhance the robustness of these versatile and tolerogenic allogeneic cells in analogy with the maternal MSCs, and discuss how this association can provide a beneficial synergy for the patient with regards to stem-cell transplantation.

## **THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE**

The current state of knowledge is based on highlighting the research results in recent years regarding fetal-maternal microchimerism and its implications in human health. The first chapter entitled “stem cell hierarchy in the human organism” summarizes the developmental hierarchy in the stem cell compartment describing the characteristics of the stem cells from the more primitive to the more differentiated ones and the recent advances in stem cell research for their clinical implications in pathology and treatment. The second chapter entitled “feto-maternal microchimerism” presents the current understanding of stem cell trafficking through the placental barrier, with regards to the immunological processes that ensure the acceptance of the fetal structures during pregnancy. The most important cellular and molecular interactions of the fetal-maternal interface are presented here and how such interactions are relevant for the passage of fetal stem cells in maternal circulation accompanied by acceptance signals towards the immune system. The ubiquitous access of the fetal microchimeric stem cells through the natural barriers of the organism is described and also the beneficial and detrimental consequences of this phenomena for the mother with regards to tissue repair, autoimmune disease and cancer, focusing on the potential beneficial effects of this process for the treatments based on allogeneic stem cell transplantation.

## PERSONAL CONTRIBUTION

The doctoral thesis is structured in 3 main studies focused on the identification of fetal microchimeric stem cells from accessible niche of maternal structures and on methods of isolation and characterization of these primitive cells in maternal niche in order to assess methods of enhancing their immunomodulatory and regenerative effects.

### **Study 1 - Evaluation of fetal-maternal microchimerism in human hair follicles obtained by eyebrow plucking.**

In this study, the hypothesis of the presence of fetal microchimeric stem cells in the maternal hair follicles was tested as such niche was previously described to contain tissue committed stem cells and also populations of more primitive stem cells. Since microchimerism was previously reported in maternal lesions in parous women, the selection of donors accustomed to regular eyebrow plucking was considered to be the best approach for the identification of fetal microchimeric stem cells in the micro - lesions induced at the follicular unit level. The usage of the Y chromosome as a surrogate marker for male cell chimerism from previous pregnancies with sons was used in this study as the identification of a sex mismatch represents one of the most preferred approaches in fetal microchimerism research as it only requires a tissue sample from the mother.

The samples obtained by eyebrow plucking were tested for Y chromosome specific genes using sensitive methods such as real-time-qPCR and next generation sequencing for Y haplogroups transmitted exclusively on paternal line. In the present study, the eyebrow plucking did not allow the identification of microchimeric stem cells or fetal DNA, most probably due to the fact that the stem-cell niche is left behind in the hair follicle's sheath after plucking. This was also confirmed by the stem cell culture that didn't isolate any adherent cells from the hair follicles obtained by this technique in specialized stem cell medium.

This study brings important contributions to the literature highlighting the importance of the way samples are obtained as it can be of crucial importance when assessing allogeneic stem cells in hair structures. This is because the most important compartments of hair stem cells are located in the hair bulge and dermal papillae, structures of the follicular unit of the dermis - the hair shaft, and not of the hair follicle itself, therefore assessing the stem cells of the hair follicle should take into account and comprise the entire follicular unit when samples are obtained.

### **Study 2 - Isolation and molecular characterization of a fetal-maternal microchimeric stem cell population in maternal hair follicles long after parturition.**

In this study the objective was to test the hypothesis that fetal microchimeric stem cells may home to the stem cell niche of the hair follicle, and techniques capable of sampling the entire follicular unit such as FUE (follicular unit extraction) based on punch devices may prove successful in isolating the stem cell niche of the hair follicle in specialized stem cell culture medium. The samples obtained by this technique from parous women, mothers of male sons were placed in stem cell culture medium and then an adherent population of stem cells was obtained and cultivated for several passages. This led to the possibility of characterizing their immunophenotypic and genetic profile as well as their differentiation potential towards multiple cell lineages.

Using FUE technique, amniochrome II stem cell culture medium and FISH technique for the Y chromosome, microchimeric fetal stem cells were identified for the first time within the primitive population of maternal stem cells isolated from an easily accessible niche - the hair follicles. They presented a typical MSC phenotype, an expression profile of pluripotent stem cell genes and differentiation capabilities towards chondrogenic, adipogenic and osteogenic cell lineages.

Gene expression analysis evaluated by real-time PCR showed superior pluripotency capabilities of this mixed population of maternal and fetal stem cells of the hair follicle niche as compared to controls - placental derived fetal stem cells. These results show for the first time that the hair follicle niche harbors fetal stem cells originating from fetal-maternal microchimerism, long after parturition, and this easily accessible source contains cells with superior capabilities as compared to placental derived stem cells. These characteristics make them suitable candidates for ex-vivo manipulation and allogeneic transplantation in regenerative therapies, with regards to the other currently available sources of stem cells.

### **Study 3 - Evaluation of the effect of human chorionic gonadotropin on bone marrow mesenchymal stem cells and fetal microchimeric stem cells**

This study focused on the isolation in culture of bone marrow adherent stem cells in order to assess the presence of fetal microchimeric stem cells from a parous donor, mother of male sons using FISH technique for the Y chromosome and to assess the effect of recombinant  $\beta$ HCG treatment on the proliferation of bone marrow stem cells in culture through evaluation of gene expression using RT-PCR, evaluation of gene regulation using microarray platform and evaluation of plasticity using differentiation culture medium for osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages.

The evaluation of the differentiation potential of the bone marrow adherent stem cells in induction medium showed a better differentiation capability towards chondrocytes and adipocytes of the recombinant  $\beta$ HCG treated cells versus the untreated cells, with a similar osteogenic differentiation potential between the two cultures. These results are in accordance with the results of the evaluation of plasticity by RT-qPCR over stemness gene expression by cells in the 6th passage. The upregulation of PROM1, SOX2, NANOG, POU5F (Oct4), and FGF2 genes in the recombinant  $\beta$ HCG treated cells with a significant difference in NANOG and FGF2, shows an important effect of recombinant  $\beta$ HCG on proliferation and pluripotency

genes over the untreated cells. The downregulation of NCAM1, and BMP2, genes of cellular adhesion and differentiation towards osteoblasts, with a significant difference in NCAM1, shows a tendency of maintenance of an undifferentiated state in the recombinant  $\beta$ HCG treated cell culture.

The dynamic analysis of gene expression in the cell culture shows the adaptation potential of the bone marrow adherent stem cell populations to culture microenvironment and growth factors by up- and down-regulation of gene expression, mostly upregulation of the genes involved in the maintenance of the undifferentiated state and pluripotency and downregulation of unessential genes in vitro.

In the present study, the treatment of bone marrow derived adherent stem cells with the commercially available form of recombinant  $\beta$ HCG, upregulated the expression of proliferation and stemness genes while downregulating the expression of cell adhesion and differentiation genes, when compared to untreated controls. Recombinant  $\beta$ HCG treatment seems to boost this proliferative potential of the treated cells by modulating the expression of stemness genes through the presence of LHCG receptors on the mesenchymal stem cells as previously reported by other authors, and a similar mechanism may apply to the fetal microchimeric stem cells present in the culture. This boost of proliferation potential could represent an important effect for regenerative medicine as it enhances the potency of bone marrow derived MSC by generating more primitive and potent exemplars, and that of fetal microchimeric stem cells by enhancing their tolerability through downregulation of genes of the Y chromosome which code alloreactive antigens, thus increasing the immunomodulatory effects and tolerability of the mixed population of feto-maternal mesenchymal stem cells in beneficial synergy for the transplantation outcomes as described by other authors.

## **GENERAL CONCLUSIONS AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS**

The hair follicle is a rich source of progenitor cells necessary for hair regrowth and regeneration but also contains the niche of a more primitive population of stem cells. The thesis tested the hypothesis that fetal microchimeric stem cells from previous pregnancies may reside in the hair follicle niche following regular microlesion production by cosmetic eyebrow plucking. While tissue sampling by simple hair plucking didn't allow the identification of fetal DNA in maternal hair follicles in study 1 of the thesis, probably due to leaving behind the stem cell structures in the hair sheath, the entire follicular unit extraction by FUE technique allowed the isolation and characterization of a microchimeric fetal-maternal stem cell population in maternal hair follicles long after parturition, in study 2. As fetal-maternal microchimeric stem cells have been previously identified in multiple maternal tissues that needed restoration processes, this was the first study in the literature to identify fetal-maternal microchimerism in the human hair follicle.

The bone marrow is the source of many hematopoietic and mesenchymal progenitors of the human body and fetal microchimeric stem cells have been previously described in its niche. Study 3 of the thesis allowed the isolation of bone marrow adherent stem cells in culture, confirming the presence of a small fraction of fetal stem cells within the cell culture, and tested the hypothesis that fetal microchimeric stem cells and primitive mesenchymal stem cells of the bone marrow could preserve some pregnancy related features and could be stimulated by pregnancy hormones. In study 3 of the thesis, the exposure to recombinant  $\beta$ HCG in consecutive cell passages showed the upregulation of stemness and pluripotency genes as compared to controls. These results were also confirmed by an improved differentiation potential of the treated cells towards chondrogenic and adipogenic lineages. As recombinant  $\beta$ HCG exposure didn't have any notable effects on the number of fetal microchimeric cells evaluated by FISH technique, it downregulated the expression of several Y chromosome genes. This was interpreted as a possible adaptation mechanism for the longterm persistence of these allogeneic male fetal cells in maternal tissues as genes of the Y chromosome have been previously reported to encode alloantigens in sex mismatched stem cell transplantation

Through the identification of fetal-maternal microchimeric stem cells in primitive sanctuaries from adult tissues such as hair follicle and bone marrow, sharing the same niche with primitive mesenchymal stem cells, the thesis brings new important insights into the migration of pluripotent/multipotent cells during embryogenesis and postnatal stage. These findings lend strong support to the theories of primitive stem cell sanctuaries in adult tissues deposited during embryogenesis and also support older hypothesis such as the "embryonic rest theory" of Virchow by identifying host primitive pluripotent stem cells sharing common niche with fetal microchimeric stem cells.

The results of the thesis highlight the effects of recombinant  $\beta$ HCG exposure over the gene regulation in bone marrow stem cells. Through the upregulation of pluripotency genes and downregulation of differentiation genes, the recombinant  $\beta$ HCG promotes the proliferation of more primitive mesenchymal stem cells. This in turn gets translated into an increased differentiation potential and creates the premises of validating these effects in future clinical trials.

Downregulation or even silencing of genes encoding alloreactive antigens such as the ones on the Y chromosome seems to have a cumulative effect on the immunomodulation and immune tolerance induced by MSC, with advantages for both fetal microchimeric stem cells and mesenchymal stem cells alike. This synergism could help improve the outcomes of stem cell transplantation contributing to tissue regeneration, induction of graft tolerance and enhancement of GVT effect, becoming fine tuning instruments in supporting the treatment of malignant pathologies.



## SELECTIVE REFERENCES

1. Thellin, O., Coumans, B., Zorzi, W., Igout, A., & Heinen, E. (2000). Tolerance to the foetoplacental graft: ten ways to support a child for nine months. *Current Opinion in Immunology*, 12(6), 731–737 Review.
2. Chan WFN, Gurnot C, Montine TJ, Sonnen JA, Guthrie KA, et al. (2012) Male Microchimerism in the Human Female Brain. *PLoS ONE* 7(9): e45592.doi:10.1371/journal.pone.0045592
3. Bianchi, D. W., Zickwolf, G. K., Weil, G. J., Sylvester, S., & DeMaria, M. A. (1996). Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(2), 705–708.
4. Magued, M., Hamdi, H., Welsh, J., Levicar, N., Marley, S., Nicholls, J., et al. (2008). High frequency of fetal cells within a primitive stem cell population in maternal blood. *Human Reproduction*, 23(4), 928–933.
5. Tsutsumi, Y., Tanaka, J., Miura, T., Saitoh, S., Yamada, M., Yamato, H., et al. (2004). Successful non-T-cell-depleted nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation (NST) from an HLA haploidentical 2-loci-mismatched sibling in a heavily transfused patient with severe aplastic anemia based on the fetomaternal microchimerism. *Bone Marrow Transplantation*, 34(3), 267–269.
6. Teshima, T., Matsuoka, K., & Ichinohe, T. (2006). Impact of fetalmaternal tolerance hematopoietic stem cell transplantation. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 54, 165–172.
7. Yu, J., Ren, X., Cao, S., Li, H., & Hao, X. (2008). Beneficial effects of fetal-maternal microchimerism on the activated haplo-identical peripheral blood stem cell treatment for cancer. *Cytotherapy*, 10(4), 331–339.
8. Yoshihara, T., Morimoto, A., Inukai, T., Kuroda, H., Ishida, H., Sugita, K., et al. Non-T-cell-depleted HLA haploidentical stem cell transplantation based on feto-maternal microchimerism in pediatric patients with advanced malignancies. *Bone Marrow Transplantation*, 34(4), 373–375.
9. Levy V, Lindon C, Harfe BD, Morgan BA. (2005). Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Dev Cell*. 2005;9:855–61. doi: 10.1016/j.devcel.2005.11.003.
10. Yu H, Fang D, Kumar SM, et al. (2006). Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* 2006;168:1879–88. 10.2353/ajpath.2006.051170
11. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003; 57: 11.

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# MICROCHIMERISMUL FETAL – UN NOU INSTRUMENT IN TRATAMENTUL ONCOLOGIC

---

Doctorand: **CISMARU COSMIN ANDREI**

---

Conducător de doctorat: Prof.dr. **IOANA NEAGOE**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Organizarea ierarhică a celulelor stem în organismul uman</b>	17
<b>2. Microchimerismul feto-matern</b>	19
2.1. Introducere	19
2.2 Mecanismele pasajului celular transplacentar din sarcină	19
2.3 Microchimerismul fetal și barierele naturale ale organismului	22
2.4 Implicațiile clinice ale MCF	24
2.4.1 MCF și reparația tisulară	25
2.4.2 MCF și afecțiunile autoimune	26
2.4.3 MCF și boala de grefă contra gazdă	27
2.4.4 MCF și cancerul	28
2.5. Aplicațiile clinice ale fenomenului de MCF	29
2.5.1 MCF și predicția răspunsului terapeutic la pacienții cu transplant de celule stem hematopoietice	30
2.5.2 MCF și tratamentul cu transplant de celule stem	31
2.5.3 MCF și toleranța imună	32
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru</b>	35
<b>2. Metodologia generală</b>	36
<b>3. Studiul 1 – Evaluarea microchimerismului fetal de la nivelul foliculului pilos unam obținut prin pensare</b>	38
3.1. Introducere	38
3.2. Obiective	38
3.3. Materiale și metode	39
3.4. Rezultate	40
3.5. Discuții	44
3.6. Concluzii	46
<b>4. Studiul 2 – izolarea și caracterizarea moleculară a unei populații de celule stem microchimerice feto-materne la nivelul foliculilor piloși materni la distanță de sarcină.</b>	49
4.1. Introducere	49
4.2. Obiective	50
4.3. Materiale și metodă	51

4.4. Rezultate	54
4.5. Discuții	62
4.6. Concluzii	66
<b>5. Studiul 3 – Evaluarea efectului gonadotrofinei corionice umane asupra celulelor stem mezenchimale și microchimerice fetale de la nivelul măduvei osoase hematogene</b>	68
5.1. Introducere	68
5.2. Obiective	69
5.3. Materiale și metode	69
5.4. Rezultate	75
5.5. Discuții	98
5.6. Concluzii	103
<b>6. Discuții generale</b>	104
<b>7. Concluzii generale</b>	107
<b>8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	109
<b>REFERINȚE</b>	111
<b>MATERIAL SUPLIMENTAR</b>	

**Cucinte cheie:** microchimerism; imunomodulare; transplant;

## INTRODUCERE

Microchimerismul feto-matern este o forma de transfer alogen dobândit de celule stem dintre organismul matern imunocompetent și făt, pe parcursul unei sarcini normale.

Acest transfer de celule mononucleare este atribuit în mare parte efectului imunomodulator al placentei de tip hemocorial care asigură o modulare a răspunsului imun, favorizând acceptarea și tolerarea structurilor fetale.

Implicațiile biologice pe termen lung ale unui astfel de răspuns față de celulele fetale alogene rămâne în mare parte nedeslușit, având atât efecte benefice cât și efecte detrimentale pentru mamă. Asocierea celulelor stem fetale microchimerice cu reparația tisulară și rolul protectiv față de anumite cancere precum și îmbunătățirea ratei de răspuns și a supraviețuirii în tratamentul prin transplant de celule stem hematopoietice sunt efecte benefice dar pe de altă parte asocierea lor cu leziunile unor boli autoimune este de asemenea frecventă. Fie că sunt direct implicate în reparația tisulară, funcționează ca efectori imuni, activează celulele immune prin aloantigene sau sunt simple relicve ale sarcinii rămân întrebări încă incomplete elucidate.

Ținând cont de necesarul tot mai mare de transplant de celule stem hematopoietice pentru pacienții fără donatori compatibili HLA, rejețul de greafă și boala de greafă contra gazdă rămân complicații importante care compromit supraviețuirea post-transplant chiar și la acei pacienți care primesc tratament imunosupresiv intens. Îmbunătățirea compatibilității între donatori și primitori fără o imunosupresie farmacologică pe termen lung rămâne un deziderat important al transplantului de celule stem hematopoietice.

În prima parte a tezei intitulată stadiul actual al cunoașterii sunt discutate premisele și provocările impuse de microchimerismul feto-matern în optica unor direcții de cercetare viitoare care să valorifice efectul imunomodulator și reparator atribuit acestor celule stem fetale microchimerice. A doua parte a tezei intitulată contribuția personală testează diferite metode de a identifica și a stimula versatilitatea acestor celule stem tolerogene în asociere cu celulele stem mezenchimale maternelor, punând în discuție sinergia benefică dintre acestea două în ceea ce privește efectul imunomodulator și reparator în transplantul de celule stem.

## **STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII**

Stadiul actual al cunoașterii are la bază evidențierea rezultatelor cercetărilor din ultimii ani cu privire la microchimerismul feto-matern și influența pe care o poate avea asupra stării de sănătate. Primul capitol intitulat organizarea ierarhică a celulelor stem în organismul uman sumarizează ierarhia de dezvoltare din compartimentul celulelor stem descriind în același timp caracteristicile celulelor de la cele mai primitive la cele mai avansate în calea diferențierii lor. Totodată acest capitol prezintă progresele făcute în cercetarea cu celule stem și implicațiile lor în patologie și în terapie.

Al doilea capitol intitulat microchimerismul feto-matern prezintă mecanismele transferului celular transplacentar făcând referire la procesele imunologice implicate în toleranța față de structurile fetale din timpul sarcinii. Sunt expuse cele mai importante interacțiuni celulare și moleculare ale interfeței feto-materne precum și implicațiile lor în transferul celulelor fetale care devin acompaniate de semnale de acceptare față de sistemul imun matern. Este descris accesul nemijlocit al celulelor stem fetale microchimerice prin barierele naturale ale organismului în zone privilegiate și totodată sunt prezentate consecințele benefice și cele negative ale acestui fenomen pentru mamă făcând referire la reparațiile tisulare, boli autoimune și cancer, punând accent pe avantajele pe care le aduce în tratamentul prin transplantul alogen de celule stem.

## **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**

Teza de doctorat este structurată în 3 studii principale concentrate pe identificarea celulelor stem fetale de la nivelul unor nișe accesibile și a unor metode de

izolare și caracterizare a acestor celule primitive cu scopul de a evalua metode care să valorifice și să îmbunătățească efectele regenerative și imunomodulatoare ale acestora.

### **Studiul 1 – Evaluarea microchimerismului fetal de la nivelul foliculului pilos unam obținut prin pensare**

În acest studiu a fost testată ipoteza prezenței celulelor stem fetale microchimerice la nivelul foliculilor piloși având în vedere că foliculul pilos este descris în literatură ca fiind o sursă bogată de celule progenitoare cu specificitate de țesut dar și a unor populații celulare stem mai nediferențiate. Ținând cont că prezența celulelor stem fetale microchimerice a fost raportată anterior mai ales la nivelul unor leziuni materne la femei în timpul și după sarcină, un criteriu important de selecție al donatoarelor de sprâncene a fost obiceiul pensării cu regularitate al sprâncenelor în scop cosmetic pentru a identifica cellule stem microchimerice recutate pentru reparația microleziunilor de la acest nivel. A fost utilizat cromozomul Y ca marker surrogat al microchimerismului cu celule masculine din sarcini anterioare cu băieți, ținând cont că această abordare care identifică neconcordanțe de cromozomi sexuali este preferată în rândul studiilor de microchimerism, fiind nevoie de o probă biologică doar de la mamă.

Probele de sprâncene obținute prin pensare au fost testate pentru prezența unor gene specifice cromozomului Y folosind metode sensibile precum reacția cantitativă de polimerizare în lanț în timp real (real-time-qPCR) și secvențierea de nouă generație pentru haplogrupuri Y transmise exclusiv pe linie paternă. În prezentul studiu această abordare prin testarea foliculului pilos după pensare nu a permis identificarea celulelor stem fetale microchimerice sau a ADN-ului fetal cel mai probabil din cauză că în urma pensării, nișa de cellule stem rămâne ancorată în teaca foliculului pilos de la nivelul dermului interfollicular și nu pe foliculul propriuzis. Aceste rezultate au fost confirmate și prin experimental culturilor celulare care nu au izolat celule stem aderente din probele amplasate în mediu de cultură specializat. Acest studiu aduce informații valoroase literaturii de specialitate evidențiind importanța modului în care probele sunt obținute acesta fiind esențial în evaluarea nișei de celule stem de la acest nivel. Deoarece compartimentul cel mai important de celule stem al foliculului pilos se află la nivelul protuberanței și papilei dermice, structuri aparținând unității foliculare de la nivelul dermului –teaca foliculului pilos, este nevoie de tehnici care să cuprindă întreaga unitate foliculară în procesul de prelevare.

### **Studiul 2 – izolarea și caracterizarea moleculară a unei populații de celule stem microchimerice feto-materne de la nivelul foliculilor piloși materni la distanță de sarcină.**

Obiectivul acestui studiu a fost testarea ipotezei prezenței celulelor stem fetale microchimerice la nivelul foliculului pilos prin tehnici capabile să extragă și să permită izolarea în mediu de cultură celulară a întregii unități foliculare precum FUE (tehnica extracției unității foliculare utilizată în transplantul de păr).

Probele astfel obținute de la femei care au avut sarcini cu băieți, au fost plasate în mediu de cultură pentru celule stem, urmând ca o populație de celule aderente la

placă să se individualizeze în timp, aceasta fiind cultivată în mai multe pasaje successive, ceea ce a permis caracterizarea imunofenotipică, a profilului genetic precum și a potențialului de diferențiere spre multiple lineaje celulare.

Prin utilizarea tehnicii FUE, a mediului de cultură pentru celule stem fetale „amnicochrome II” și tehnica fluorizării și hibridizării in situ – FISH pentru cromozomul Y, a fost posibilă identificarea pentru prima oară în literatură a celulelor stem fetale microchimerice în cadrul unei populații de celule stem materne primitive, izolate de la nivelul unei nișe accesibile, foliculul pilos al sprâncenei. Acestea au prezentat un fenotip tipic de celule stem mezenchimale, au avut un profil de expresie genică caracteristic celulelor stem pluripotente și au avut capacitatea de diferențiere către linii celulare osteogenice, adipogenice și condrognice.

Expresia genică evaluată prin real-time qPCR a indicat o plasticitate mai mare a acestei populații de celule stem mixte materne și fetale microchimerice, în comparație cu celulele stem fetale placentare utilizate ca și control.

Aceste rezultate indică pentru prima oară prezența celulelor stem fetale microchimerice la nivelul foliculului pilos, la distanță de sarcină iar această nișă accesibilă conține celule cu potențial replicativ superior celulelor stem fetale din placentă. Aceste calități le fac să reprezinte candidați potriviți pentru manipularea *ex-vivo* și transplantul alogenic în terapiile regenerative, în analogie cu celulele stem din alte surse disponibile.

### **Studiul 3 – Evaluarea efectului gonadotrofinei corionice umane asupra celulelor stem mezenchimale și microchimerice fetale de la nivelul măduvei osoase hematogene**

Acest studiu a urmărit izolarea în cultură a unei populații aderente de celule stem de la nivelul măduvei osoase hematogene cu scopul de a evalua prezența celulelor stem fetale microchimerice de la o mamă de băieți, utilizând tehnica FISH pentru cromozomul Y, precum și de a testa efectul gonadotrofinei corionice umane recombinante asupra proliferării celulare și expresiei genice prin real-time qPCR, asupra reglării genice prin platformă microarray și a potențialului de diferențiere prin tehnica mediilor de cultură specifice de diferențiere spre linii osteogenice, condrognice și adipogenice.

Evaluarea potențialului de diferențiere al celulelor stem aderente de la nivelul măduvei osoase hematogene a indicat o capacitate mai bună a celulelor expuse la  $\beta$ HCG recombinantă, de diferențiere spre condrocite și adipocite față de celulele neexpuse, cu o capacitate similară pentru diferențierea osteogenică. Aceste rezultate sunt în concordanță cu rezultatele testării potențialului replicativ prin RT-qPCR pentru expresia genelor de potențialitate. Supraexpresia genelor PROM1, SOX2, NANOG, POUF5 (Oct4) și FGF2 în cultura tratată cu  $\beta$ HCG recombinantă, cu semnificație statistică pentru NANOG și FGF2, a indicat efectul important al  $\beta$ HCG recombinantă asupra potențialului replicativ și proliferativ în comparație cu celulele de control netratate. Subexpresia genelor NCAM1 și BMP2, gene implicate în adeziunea

celulară și diferențiere spre linia osteoblastică, cu o semnificație statistică pentru NCAM1, a indicat o tendință a celulelor din cultură pentru menținerea unei stări nediferențiate în populația tratată cu  $\beta$ HCG recombinantă în comparație cu celulele de control netratate.

Analiza în dinamică a expresiei genice utilizând tehnica microarray a indicat un potențial adaptativ al celulelor stem aderente din măduva osoasă hematogenă la micromediul culturii celulare prin supra și subexpresia genică, respectiv supraexpresia genelor implicate în păstrarea unei stări nediferențiate și de pluripotență și subexpresia unor gene care nu sunt esențiale în condițiile de cultură - *in vitro*.

În prezentul studiu, tratamentul celulelor stem aderente din măduva osoasă hematogenă cu forma disponibilă comercial de  $\beta$ HCG recombinantă a dus la supraexpresia genelor de proliferare și potențialitate și în același timp subexpresia genelor de adeziune celulară și diferențiere. Astfel reiese că tratamentul cu  $\beta$ HCG recombinantă amplifică potențialul replicativ al celulelor din cultură modulând expresia genelor de potențialitate prin intermediul receptorilor LHCG de pe suprafața celulelor stem mezenchimale așa cum a fost raportat de alți autori, și un mecanism asemănător ar putea fi valabil în egală măsură pentru celulele stem fetale microchimerice de tip mezenchimal din aceeași cultură. Această amplificare a potențialului replicativ reprezintă un efect important în domeniul medicinei regenerative având în vedere că ea generează exemplare de celule stem mezenchimale mai primitive cu potențial replicativ mai important și în același timp are efect asupra celulelor stem fetale microchimerice prin subexpresia genelor de pe cromozomul Y, gene care conțin antigene aloreactive, în acest fel amplificând tolerabilitatea și efectul imunomodulator al populației mixte de celule stem mezenchimale feto-materne într-o sinergie benefică în tratamentul prin transplant de celule stem descrisă în literatură.

## **CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI**

Foliculul pilos reprezintă o sursă bogată de celule stem necesare creșterii și regenerării acestuia, precum și o nișă de celule stem progenitoare mai primitive. Teza de doctorat a testat ipoteza prezenței unor celule stem fetale microchimerice la acest nivel după sarcină ca urmare a microleziunilor produse prin pensarea în mod cosmetic și participarea celulelor stem fetale la procesele de reparație de la acest nivel.

Cu toate că obținerea probelor prin pensare nu a permis identificarea celulelor și ADN-ului fetal de la nivelul foliculului pilos în studiul 1, probabil din cauza rămânerii nișei de celule stem la nivelul tecii foliculului pilos după pensare, tehnica FUE (extracția unității foliculare) a permis izolarea în cultură și caracterizarea unei populații de celule stem feto-materne de la acest nivel la distanță de sarcină în studiul 2. Cu toate că microchimerismul feto-matern a fost identificat anterior la nivelul mai multor tesuturi materne, fiind implicate în procese de reparație tisulară, acesta este



primul studiu din literatură care a identificat microchimerismul feto-matern la nivelul foliculului pilos uman.

Măduva osoasă hematogenă reprezintă o nișă pentru numeroase celule progenitoare hematopoietice și mezenchimale iar microchimerismul fetal a fost identificat anterior și la nivelul acestei nișe. Studiul 3 al tezei a permis izolarea în cultură a unor celule stem mezenchimale aderente, confirmând în același timp prezența unei subpopulații de celule stem fetale microchimerice la acest nivel. În studiul 3 a fost testată ipoteza conform căreia celulele stem fetale microchimerice și cele mezenchimale primitive ale gazdei de la nivelul măduvei osoase hematogene ar putea păstra anumite caractere din timpul sarcinii, fiind potențial responsive la hormoni ai sarcinii. În felul acesta, expunerea în dinamică la  $\beta$ HCG recombinantă pe parcursul pasajelor consecutive din cultură a dus la supraexpresia genelor de proliferare și replicare în comparație cu celulele netratate. Aceste rezultate au fost de asemenea confirmate prin potențialul de diferențiere mai bun spre linii condrogenice și adipogenice din experimentul de diferențiere pe medii specifice al celulelor tratate. Cu toate că tratamentul cu  $\beta$ HCG recombinantă nu a influențat numărul de celule fetale microchimerice evaluate prin tehnica FISH, acesta a dus la subexpresia unor gene ale cromozomului Y, fiind interpretat ca un mecanism de adaptare pentru persistența pe termen lung al acestor celule alogene masculine în organismul matern, cu atât mai mult cu cât gene de pe cromozomul Y codifică aloantigene în transplantul de celule stem cu neconcordanță de gen.

Prin identificarea microchimerismului feto-matern la nivelul unor sanctuare de celule stem mezenchimale primitive din țesuturile gazdei precum foliculul pilos și măduva osoasă hematogenă, teza aduce contribuții importante cunoașterii procesului de migrare al celulelor pluripotente/multipotente din timpul embriogenezei și stadiilor postnatale. Aceste date vin în sprijinul teoriei sanctuarelor de celule primitive din organismul adult formate în timpul embriogenezei și sprijină de asemenea teorii mai vechi precum teoria restului embrionar a lui Vorchow, prin identificarea celulelor stem fetale microchimerice în nișele celulelor pluripotente primitive ale gazdei.

Rezultatele tezei pun în evidență rolul expunerii la  $\beta$ HCG recombinantă asupra reglării genice a celulelor stem mezenchimale de la nivelul măduvei osoase hematogene. Prin supraexpresia genelor de pluripotențialitate și subexpresia genelor de diferențiere,  $\beta$ HCG recombinantă stimulează proliferarea și selecția unor populații de celule stem mezenchimale mai primitive. Aceasta se traduce printr-un potențial replicativ și de diferențiere mai crescut și crează premisele validării acestor efecte în trialuri clinice ulterioare.

Prin subexpresia sau chiar neexprimarea unor gene care codifică antigene aloreactive precum cele de pe cromozomul Y, apar efecte cumulative de imunomodulare și toleranță imunologică față de aceste celule cu avantaje atât pentru celulele fetale cât și pentru celulele stem mezenchimale ale gazdei din anturajul lor. Această sinergie a efectelor poate avea potențialul de a îmbunătăți rezultatele tratamentelor prin transplant de celule stem contribuind la regenerarea tisulară, inducerea toleranței pentru grefa și îmbunătățirea efectului de grefă contra tumoră, devenind instrumente importante în tratamentul patologiei oncologice.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Thellin, O., Coumans, B., Zorzi, W., Igout, A., & Heinen, E. (2000). Tolerance to the foetoplacental graft: ten ways to support a child for nine months. *Current Opinion in Immunology*, 12(6), 731–737 Review.
2. Chan WFN, Gurnot C, Montine TJ, Sonnen JA, Guthrie KA, et al. (2012) Male Microchimerism in the Human Female Brain. *PLoS ONE* 7(9): e45592.doi:10.1371/journal.pone.0045592
3. Bianchi, D. W., Zickwolf, G. K., Weil, G. J., Sylvester, S., & DeMaria, M. A. (1996). Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(2), 705–708.
4. Magued, M., Hamdi, H., Welsh, J., Levicar, N., Marley, S., Nicholls, J., et al. (2008). High frequency of fetal cells within a primitive stem cell population in maternal blood. *Human Reproduction*, 23(4), 928–933.
5. Tsutsumi, Y., Tanaka, J., Miura, T., Saitoh, S., Yamada, M., Yamato, H., et al. (2004). Successful non-T-cell-depleted nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation (NST) from an HLA haploidentical 2-loci-mismatched sibling in a heavily transfused patient with severe aplastic anemia based on the fetomaternal microchimerism. *Bone Marrow Transplantation*, 34(3), 267–269.
6. Teshima, T., Matsuoka, K., & Ichinohe T. (2006). Impact of fetalmaternal tolerance hematopoietic stem cell transplantation. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 54, 165–172.
7. Yu, J., Ren, X., Cao, S., Li, H., & Hao, X. (2008). Beneficial effects of fetal-maternal microchimerism on the activated haplo-identical peripheral blood stem cell treatment for cancer. *Cytotherapy*, 10(4), 331–339.
8. Yoshihara, T., Morimoto, A., Inukai, T., Kuroda, H., Ishida, H., Sugita, K., et al. Non-T-cell-depleted HLA haploidentical stem cell transplantation based on feto-maternal microchimerism in pediatric patients with advanced malignancies. *Bone Marrow Transplantation*, 34(4), 373–375.
9. Levy V, Lindon C, Harfe BD, Morgan BA. (2005). Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Dev Cell*. 2005;9:855–61. doi: 10.1016/j.devcel.2005.11.003.
10. Yu H, Fang D, Kumar SM, et al. (2006). Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* 2006;168:1879–88. 10.2353/ajpath.2006.051170
11. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003; 57: 11.