



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di laurea : Scienze biologiche

MICROCHIMERISMO FETALE: Un collegamento per la vita

FETAL MICROCHIMERISM: A link for life

Sessione Autunnale (dicembre 2024)

Anno Accademico 2023/2024

Relatore: Francesca Maradonna

Tesi di: Mondaini Rebecca Sarah



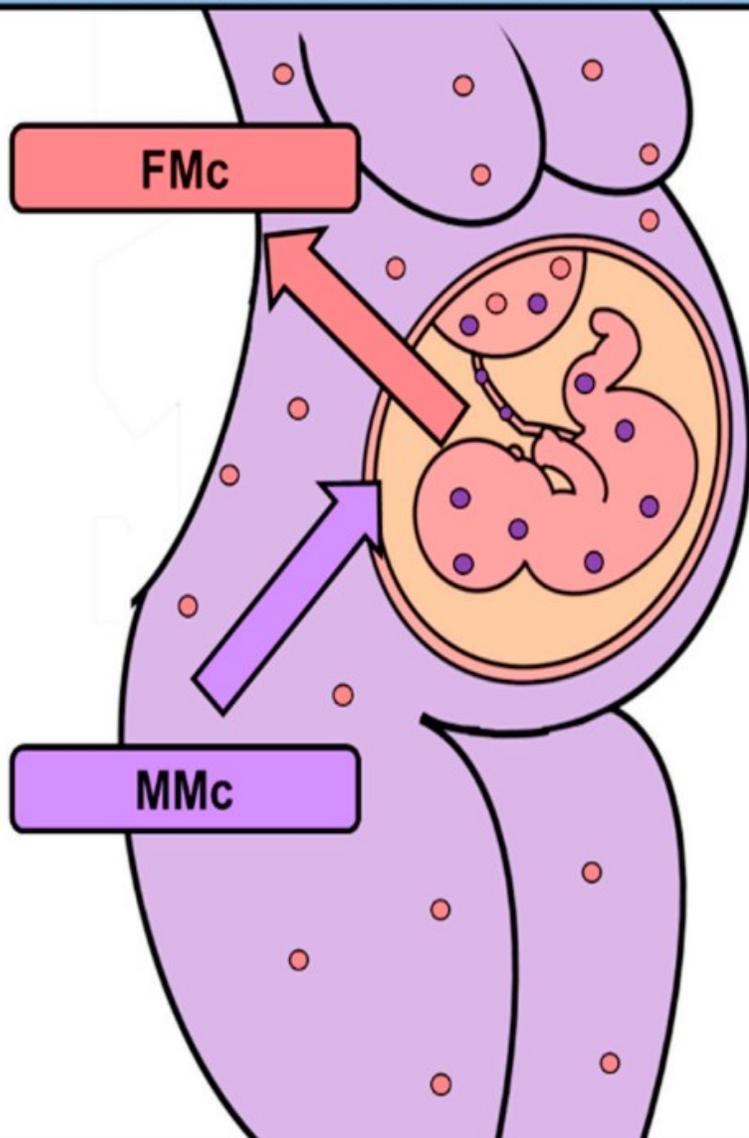
Da dove viene il termine microchimerismo?

- Nella mitologia greca fa comparsa per la prima volta il termine di Chimera, una creatura imponente con corpo e testa di leone, una seconda testa di capra sporgente dal dorso e un serpente al posto della coda: differenti animali si mescolavano in un solo corpo, una cosa talmente assurda da diventare poi sinonimo di impossibile
- In zoologia si parla di chimera quando un animale ha due o più popolazioni differenti di cellule geneticamente distinte.
- Nell'uomo esistono forme di chimerismo che si verificano quando cellule di un individuo migrano nel corpo di un altro (in caso di trasfusioni, trapianto di organi);
- Un tipo particolare definito microchimerismo fetale



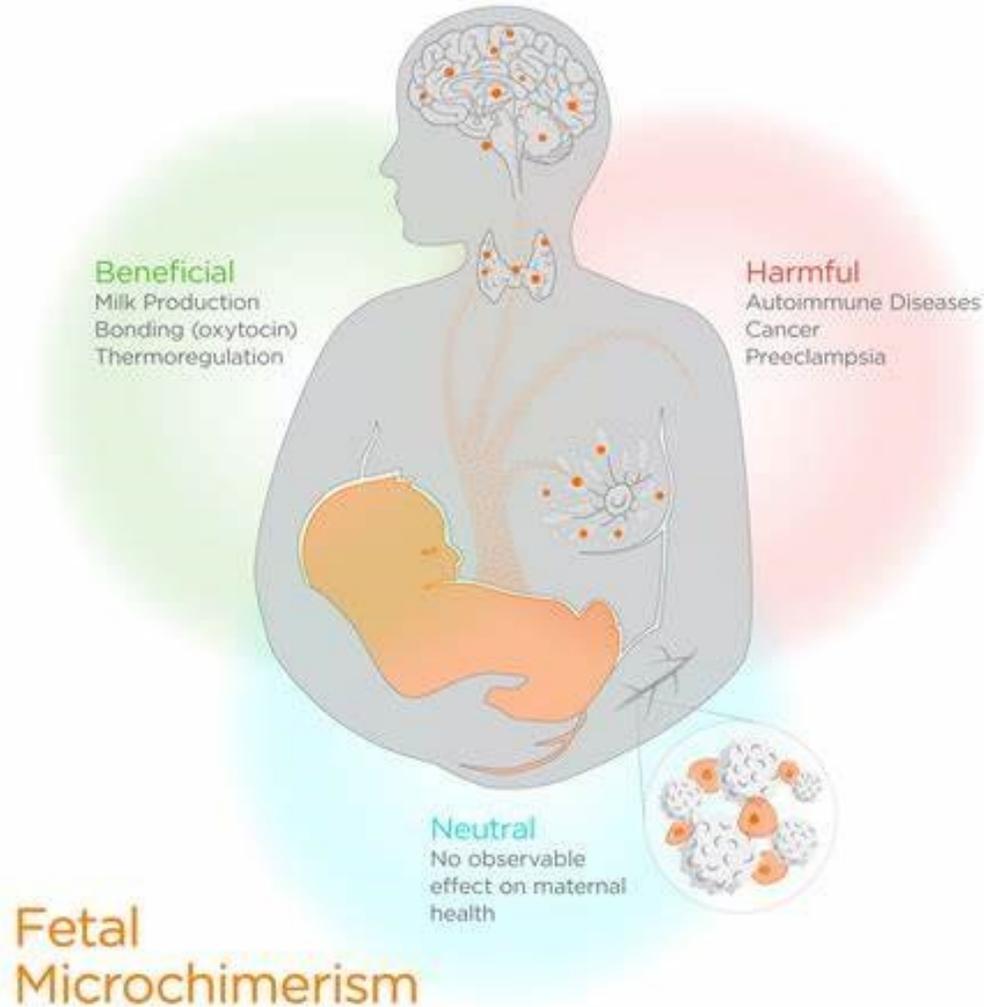
Fetomaternal microchimerism

Cosa si intende per microchimerismo fetale :



- presenza e persistenza di cellule staminali fetali nel corpo della madre
- a partire dalla 4° o 6° settimana di gestazione
- scambio bidirezionale transplacentare asimmetrico di cellule tra madre e feto
- la maggioranza di cellule fetali viene prontamente eliminata dal sistema immunitario materno; tuttavia una piccola parte persiste e si diffonde attraverso il circolo sanguigno ai vari tessuti.
- grazie alla loro plasticità fenotipica e alla loro capacità multilineare, si differenziano in diversi tipi cellulari integrandosi fisiologicamente e funzionalmente ai tessuti materni.
- Queste cellule sono state oggetto di studio e molti risultati sono stati ottenuti focalizzando sul loro ruolo nell'insorgenza di patologie materne

Quali sono i ruoli del FMc sulla salute materna?



Ruolo negativo:

- elevata percentuale di FMc in patologie materne e placentari, come aneuploidie fetali, parti prematuri o aborti spontanei e anomalie placentari.
- La FMc è anche presente anche a livello di tumori dove contribuisce a progressione e sviluppo della patologia

Ruolo benefico:

- FMc coinvolto nei processi angiogenici e di guarigione,
- partecipa alla riparazione e alla rigenerazione dei tessuti e alla sostituzione delle cellule.
- Stimolano l'adenoipofisi a produrre prolattina
- Partecipa alla termoregolazione e alla omeostasi materna
- La presenza di FMc è anche correlata a un minor rischio di cancro al seno e alla vescica.

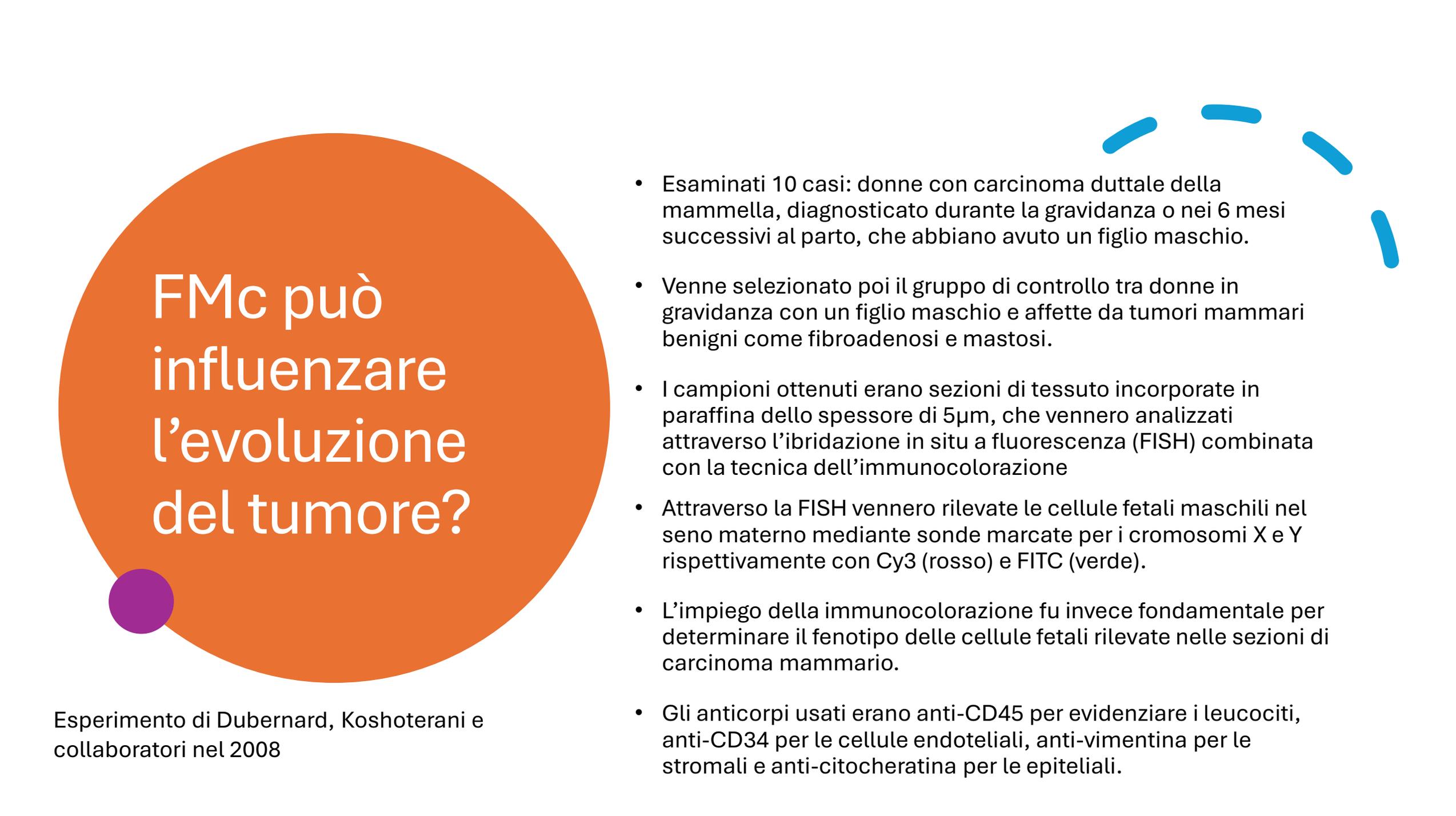
Microchimerismo fetale e cancro al seno

- Il cancro al seno è uno dei due tumori più comunemente diagnosticati in gravidanza, insieme al cancro del collo dell'utero.
- Fino al 3,8% di tutti i carcinomi mammari sono associati alla gravidanza.
- Questi tumori rappresentano l'8% dei tumori al seno che si verificano nelle donne di età inferiore ai 45 anni e addirittura il 18% delle donne di età inferiore ai 30 anni.
- La definizione più utilizzata è carcinoma mammario associato alla gravidanza (PABC) e sottolinea il fatto che questi tumori si sviluppano durante la gravidanza stessa o durante il primo anno dopo il parto.
- in questo elaborato, focalizzerò proprio sullo stretto rapporto che lega il microchimerismo fetale alla comparsa di cancro al seno



C'è una correlazione tra assenza di FMc nel sangue e comparsa del cancro al seno ?

- 2008 Gadi e i suoi collaboratori mettono in evidenza il possibile ruolo protettivo del microchimerismo fetale verso la comparsa di cancro al seno
- Studio caso-controllo su campioni di sangue periferico di donne pluripare analizzati con PCR quantitativa per DYS14 allo scopo di verificare la presenza e la concentrazione di DNA maschile (da precedenti gravidanze con feto maschio)
- Esaminate 99 donne pluripare: 54 affette da cancro al seno invasivo e 45 sane (popolazione di controllo)
- Si osserva che la prevalenza di FMc nelle donne sane era del 56% mentre nelle donne malate era del 26%; le donne con tumore al seno sono carenti sia per presenza che per quantità di FMc nel buffy coat del sangue periferico
- Buffy coat è la componente leucocitario-piastrinica del sangue anticoagulato dopo il frazionamento, quindi ricco di neutrofili e cellule dendritiche.
- i dati suggeriscono che FMc possa essere rappresentato nelle donne sane da cellule che fanno parte della risposta immunitaria innata o di cellule che partecipano alla presentazione dell'antigene.
- Risultato: nelle donne affette da cancro al seno si verifica una mancata acquisizione o un mancato mantenimento di cellule immunitarie allogeniche (FMc) trasmesse dal feto alla madre durante la gravidanza.



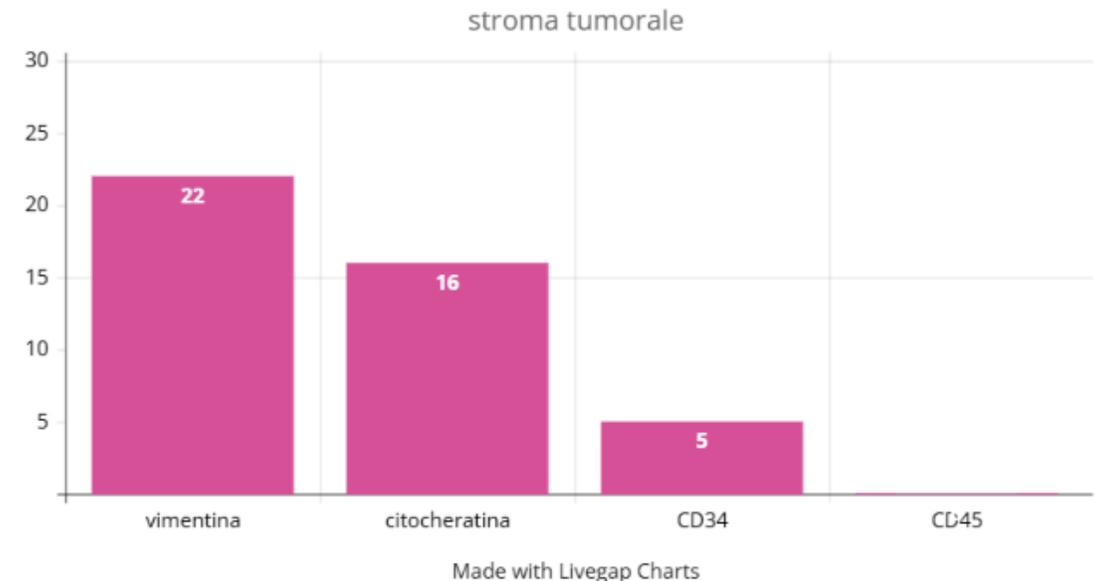
FMc può influenzare l'evoluzione del tumore?

Esperimento di Dubernard, Koshoterani e collaboratori nel 2008

- Esaminati 10 casi: donne con carcinoma duttale della mammella, diagnosticato durante la gravidanza o nei 6 mesi successivi al parto, che abbiano avuto un figlio maschio.
- Venne selezionato poi il gruppo di controllo tra donne in gravidanza con un figlio maschio e affette da tumori mammari benigni come fibroadenosi e mastosi.
- I campioni ottenuti erano sezioni di tessuto incorporate in paraffina dello spessore di 5 μ m, che vennero analizzati attraverso l'ibridazione in situ a fluorescenza (FISH) combinata con la tecnica dell'immunocolorazione
- Attraverso la FISH vennero rilevate le cellule fetali maschili nel seno materno mediante sonde marcate per i cromosomi X e Y rispettivamente con Cy3 (rosso) e FITC (verde).
- L'impiego della immunocolorazione fu invece fondamentale per determinare il fenotipo delle cellule fetali rilevate nelle sezioni di carcinoma mammario.
- Gli anticorpi usati erano anti-CD45 per evidenziare i leucociti, anti-CD34 per le cellule endoteliali, anti-vimentina per le stromali e anti-citocheratina per le epiteliali.

- Sono state rilevate cellule fetali nei tessuti tumorali di 9 casi su 10 contro nessuno dei campioni di controllo
- i risultati mostrano che tra le donne esaminate solo quelle con carcinoma mammario presentavano cellule fetali nel tessuto.
- Le cellule microchimeriche erano distribuite in tutti i campioni preferenzialmente localizzate nelle aree tumorali piuttosto che in quelle non tumorali e non erano mai raggruppate in ammassi.
- Le percentuali fenotipiche riscontrate erano 22% quelle marcate con vimentina, 16% quelle con citocheratina e solo il 5% di CD34; pertanto, le cellule fetali in prossimità dei carcinomi mammari erano prevalentemente di origine mesenchimale ed epiteliale.
- Questo dimostra che lo stroma di tumori maligni che si sviluppano durante la gravidanza recluta quasi sempre cellule di derivazione fetale.
- Le cellule stromali di derivazione fetale a differenza delle cellule adulte presentano un elevato grado di plasticità, crescono più rapidamente e presentano telomeri più lunghi rispetto alle loro controparti adulte.
- Si può quindi ipotizzare che le cellule fetali nei tumori del seno possano influenzare l'evoluzione del tumore e potrebbero intervenire nel profilo più sfavorevole di tali carcinomi.

Percentuali fenotipiche rilevate



Il microchimerismo è legato a un ridotto rischio di sviluppare il cancro al seno ?

- Si tratta di uno studio prospettico di coorte condotto da Kamper- Jorgens nel 2012
- sono state scelte donne di età compresa tra i 50 e i 64 anni al momento della selezione nel 1993-1997 e sono state seguite fino al 2006.

Aspetti innovativi :

- Vengono usati campioni di sangue prelevati prima dell'insorgenza della malattia.
- Per determinare se il microchimerismo rilevato nel sangue periferico recasse un effetto benefico solo verso il cancro al seno o se fosse positivo anche per altri tumori si è studiato parallelamente l'effetto sul cancro al colon.
- campionate 100 donne con cancro al seno e 300 controlli senza cancro
- Impatto di gravidanze maschili : 17% non avesse figli maschi nati vivi, il 30% avesse un figlio maschio nato vivo, il 30% avesse due figli maschi nati vivi e il 23% avesse tre o più figli maschi nati vivi.
- Si è cercato di mantenere la stessa distribuzione per il tumore del colon ma, avendo meno casi da selezionare è stata ristretta la distribuzione dello studio a 17, 30 e 30 (per un totale di 77) donne con zero, uno e due figli nati vivi rispettivamente.
- Il procedimento di analisi dei campioni sanguigni è il medesimo visto con Gadi, viene prelevato il buffy coat e trattato con qPCR per DYS14.

Risultati

- Conferma la teoria sviluppata con Gadi e collaboratori di una riduzione del 70% delle probabilità di sviluppare cancro al seno in presenza di FMc nel sangue periferico
- Forniscono la prova che la rilevazione di FMc possa essere associata a un aumento di 4 volte delle probabilità di sviluppare cancro al colon.
- Non è stata evidenziata alcuna indicazione che la concentrazione di cellule chimeriche influenzasse il rischio di sviluppare il cancro al seno
- Per quanto riguarda il cancro del colon, invece, concentrazioni più elevate sono state associate a un aumento del rischio e, sebbene non sia statisticamente significativo, si è ipotizzato che la rilevazione fosse più frequente con una maggiore vicinanza alla diagnosi di cancro.
- Questi risultati sono contrari a un ruolo benefico generale del microchimerismo nel sangue periferico sul cancro, ma sostengono piuttosto la possibilità che il microchimerismo abbia effetti differenziati in diversi tipi di cancro.



Distribuzione del microchimerismo fetale a livello del cancro al seno

Esperimento condotto da Nemescu e collaboratori nel 2016

- Le donne sottoposte al campionamento erano 19 con neoplasia mammaria confermata e sottoposte a resezione chirurgica tra gennaio 2013 e giugno 2014.
- Dopo la mastectomia sono stati raccolti 3 campioni freschi: dal nucleo del tumore, dal tessuto mammario periferico rispetto al tumore e da quello sano.
- Sono stati tagliati tessuti di circa 25 mg
- Dagli omogenati è stato estratto il DNA ed eluito in un volume finale di 50 μ l e conservato a 4°C per un massimo di 24 ore prima dell'amplificazione con qPCR.
- Il marcatore fetale usato per rilevare FMc è il gene determinante il sesso (SRY) del cromosoma Y.
- fu il primo studio in cui la quantificazione microchimerica del cancro al seno è stata effettuata in base al numero di figli dei campioni

Risultati:

- Due dei casi presi in esame non avevano avuto alcuna gravidanza e per tanto non hanno mostrato nessuna amplificazione del gene SRY per tutti i campioni provenienti da qualsiasi parte della mammella.
- Al contrario nelle donne che avevano dato alla luce almeno un figlio è stato rilevato microchimerismo nel 100% dei campioni di tumore (nucleo e periferia) e un 64% nel tessuto sano.
- La distribuzione eterogenea delle cellule chimeriche nell'ambiente locale del tumore al seno può avvenire attraverso il loro reclutamento da parte del tessuto tumorale, dell'infiammazione locale o di un fattore sconosciuto.
- Ciò riduce contemporaneamente il numero di cellule chimeriche provenienti dal corpo della donna, come è stato osservato nel sangue periferico e nel tessuto mammario. Studi precedenti hanno dimostrato che il microchimerismo fetale è significativamente raro nel sangue periferico di donne con cancro al seno in situ o invasivo rispetto ai controlli normali.
- Ciò è supportato da studi recenti, che hanno rilevato che il microchimerismo maschile nel sangue periferico è associato a una riduzione del rischio di cancro al seno di un terzo e a una mortalità per tutte le cause inferiore del 60%, rispetto alle donne SRY-negative.
- Il fenomeno sembra essere specifico del cancro al seno, poiché non è associato a una riduzione della mortalità nel cancro del colon. Inoltre, poiché la diminuzione del microchimerismo nel sangue periferico compare anni prima della diagnosi di tumore al seno, potrebbe essere utilizzata per una diagnosi precoce del cancro al seno.

Conclusione:

Definire un ruolo univoco per FMc come si è potuto apprezzare dalle precedenti evidenze è impossibile dal momento che assume funzioni diverse a seconda del distretto corporeo o della patologia esaminata

Nel caso da me esaminato, il cancro al seno, si è osservato che nelle donne sane le cellule fetali sono rilevate con grande frequenza nel buffy coat ottenuto dal sangue periferico e, per tanto, si è evidenziata la loro partecipazione a meccanismi immunitari o di presentazione antigenica che consentono una difesa e una prevenzione per la madre verso lo sviluppo della patologia. Nelle donne affette si ha quindi mancata acquisizione o mancato mantenimento di cellule immunitarie allogeniche (FMc) trasmesse dal feto alla madre.

Il riscontro di FMc a livello tissutale con una frequenza del 100% nella zona del tumore nelle donne affette, associato alla mancanza delle stesse nel buffy coat, mostra come queste cellule pluripotenti in realtà non siano perse ma vengano richiamate dalla circolazione al tessuto lesa o infiammato con meccanismi ancora sconosciuti. A questo livello sono in grado, in virtù della loro plasticità di contribuire al decorso più negativo della patologia

I risultati finora ottenuti, se studiati ulteriormente, potrebbero essere sfruttati clinicamente come test di preselezione per identificare le donne con un'alta frequenza di cellule maschili in circolo come a rischio di sviluppare il cancro del colon, e quindi seguirle con regolari colonscopie. Allo stesso modo, le donne identificate come negative al microchimerismo maschile potrebbero essere più a rischio di sviluppare il cancro al seno e potrebbero essere seguite con regolari mammografie.

Riassunto :

- La presenza e la persistenza di cellule fetali nei tessuti materni sono note come microchimerismo fetale (FMc).
- La FMc ha un elevato potenziale multilineare con una grande capacità di differenziarsi e di integrarsi funzionalmente nel tessuto materno.
- L'FMc è stato trovato in vari tessuti materni, la sua permanenza nel corpo materno fino a decenni dopo il parto suggerisce che potrebbe svolgere un ruolo essenziale nella fisiopatologia materna.
- Lo studio della presenza, della localizzazione e delle caratteristiche della FMc nei tessuti materni è fondamentale per comprendere il suo impatto sul corpo della donna.
- La FMc è stata associata alla tolleranza autoimmune e alla riparazione dei tessuti, ma anche alle malattie autoimmuni e al cancro, sollevando la possibilità che eserciti effetti multipli e opposti nell'organismo materno.
- La funzionalità potrebbe anche dipendere dal tessuto di origine, dal suo ambiente cellulare (per esempio, pro-vs anti-infiammatorio) e dal momento analizzato (poco dopo il parto, durante il postpartum o in età riproduttiva avanzata).
- In questa tesi ho esaminato in particolare la correlazione tra la presenza di queste cellule fetali e il tasso d'insorgenza del cancro al seno, evidenziando però che l'effetto di questo trasferimento cellulare cambia sulla base del distretto corporeo considerato.

Grazie per l'attenzione !!

Bibliografia

- Gadi, V.K., Malone, K.E., Guthrie, K.A., Porter, P.L., and Nelson, J.L. (2008). Case-control study of fetal microchimerism and breast cancer. *PLoS One* 3, e1706.
- Dubernard, G., Aractingi, S., Oster, M., Rouzier, R., Mathieu, M.-C., Uzan, S., and Khosrotehrani, K. (2008). Breast cancer stroma frequently recruits fetal derived cells during pregnancy. *Breast Cancer Res.* 10, R14.
- Kamper-Jørgensen, M., Biggar, R.J., Tjønneland, A., Hjalgrim, H., Kroman, N., Rostgaard, K., Stamper, C.L., Olsen, A., Andersen, A.-M.N., and Gadi, V.K. (2012). Opposite effects of microchimerism on breast and colon cancer. *Eur. J. Cancer* 48, 2227–2235. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.006>.
- Nemescu, D., G Ursu, R., Nemescu, E.R., and Negura, L. (2016). Heterogeneous distribution of fetal microchimerism in local breast cancer environment. *PLoS One* 11, e0147675.