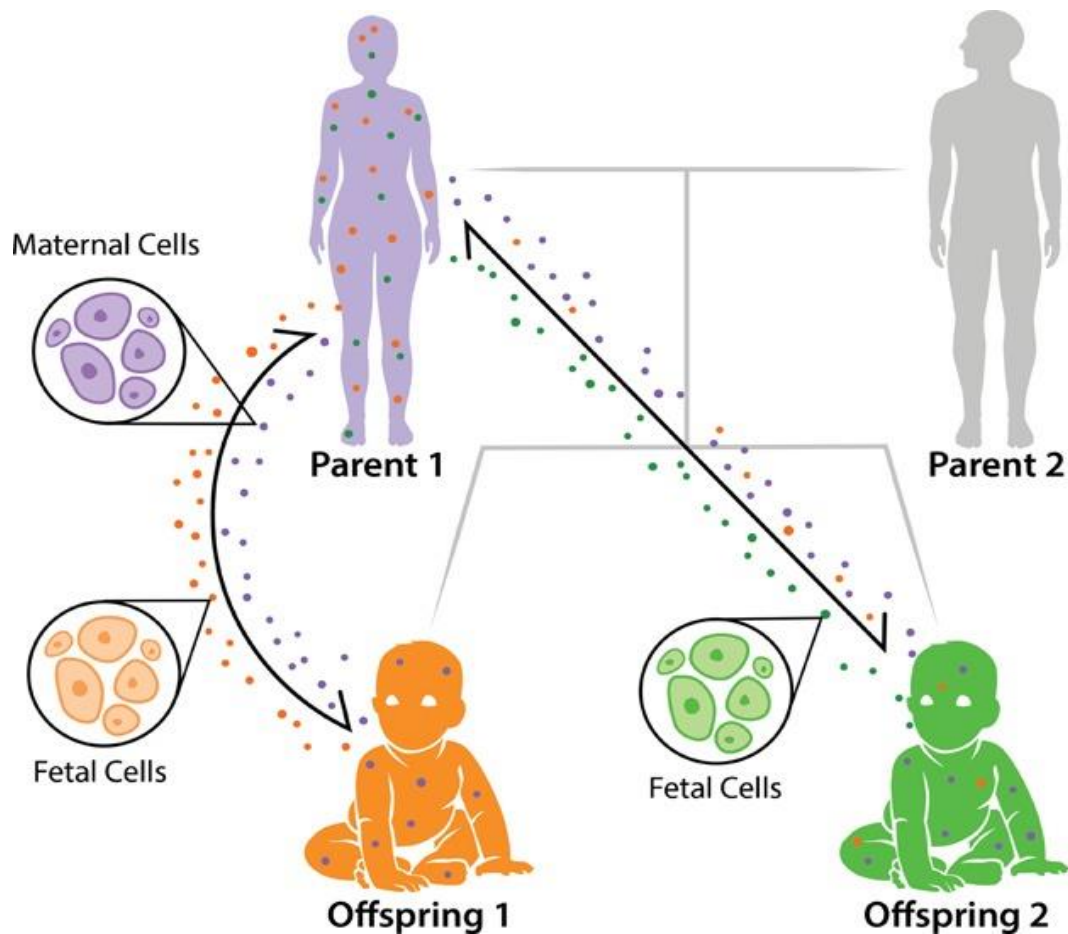


Microchimerismo fetale : il caso di mamme chimere

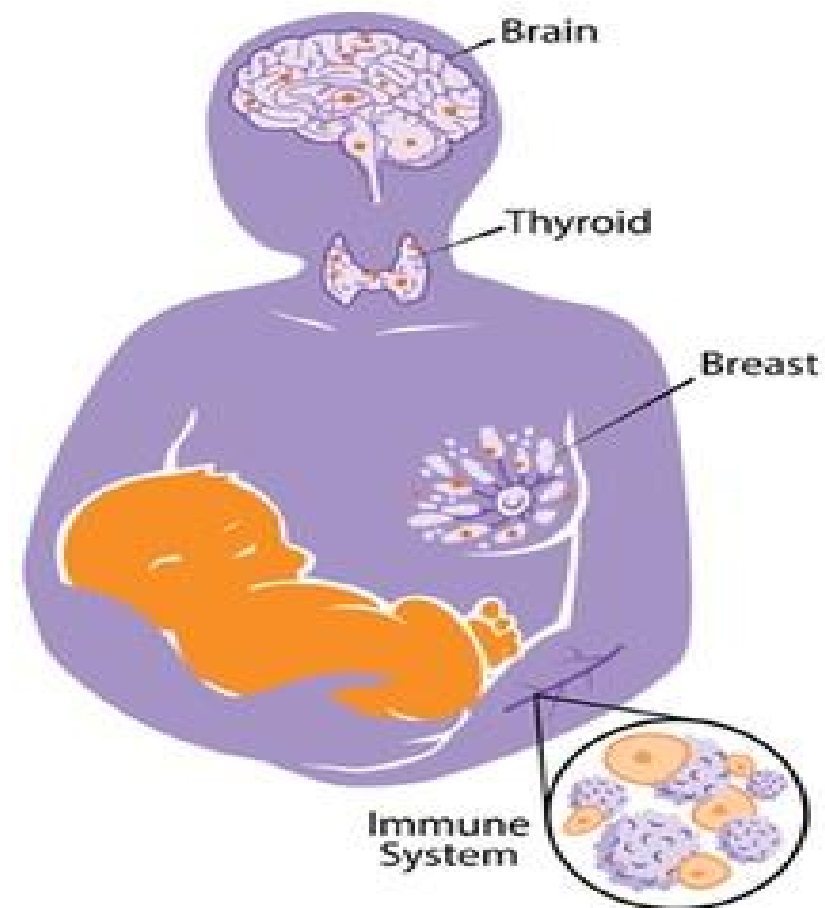
Cos'è il microchimerismo fetale:



- ❖ Scambio **bidirezionale** di cellule tra madre e feto, a partire dalla 4° settimana fino alla 6° settimana di gestazione.
- ❖ Nelle gravidanze normali, al secondo trimestre, il numero di cellule fetali nella circolazione materna è stato stimato essere di **1-6 cell/mL**.
- ❖ Alla 36° settimana di gestazione, il **100%** delle donne ha cellule fetali nella circolazione materna.
- ❖ Dopo il parto, questa frazione diminuisce e il **30-50%** delle donne sane ha cellule rilevabili nel sangue da 4 settimane a decenni dopo il parto.
- ❖ Sia le cellule dei fratelli più grandi che le cellule della nonna materna possono essere trasferite al feto.

Ruolo delle cellule fetali nei tessuti materni

- ❖ Stimolano l'adenipofisi a produrre più prolattina.
- ❖ Termoregolazione.
- ❖ Protezione contro alcune malattie della tiroide.
- ❖ Contribuiscono allo sviluppo e/o alla progressione di tumori.
- ❖ Induzione dell'angiogenesi.
- ❖ Suscettibilità alle malattie autoimmuni.
- ❖ Migliorano la guarigione delle lesioni.



Cellule fetali marcate con il GFP

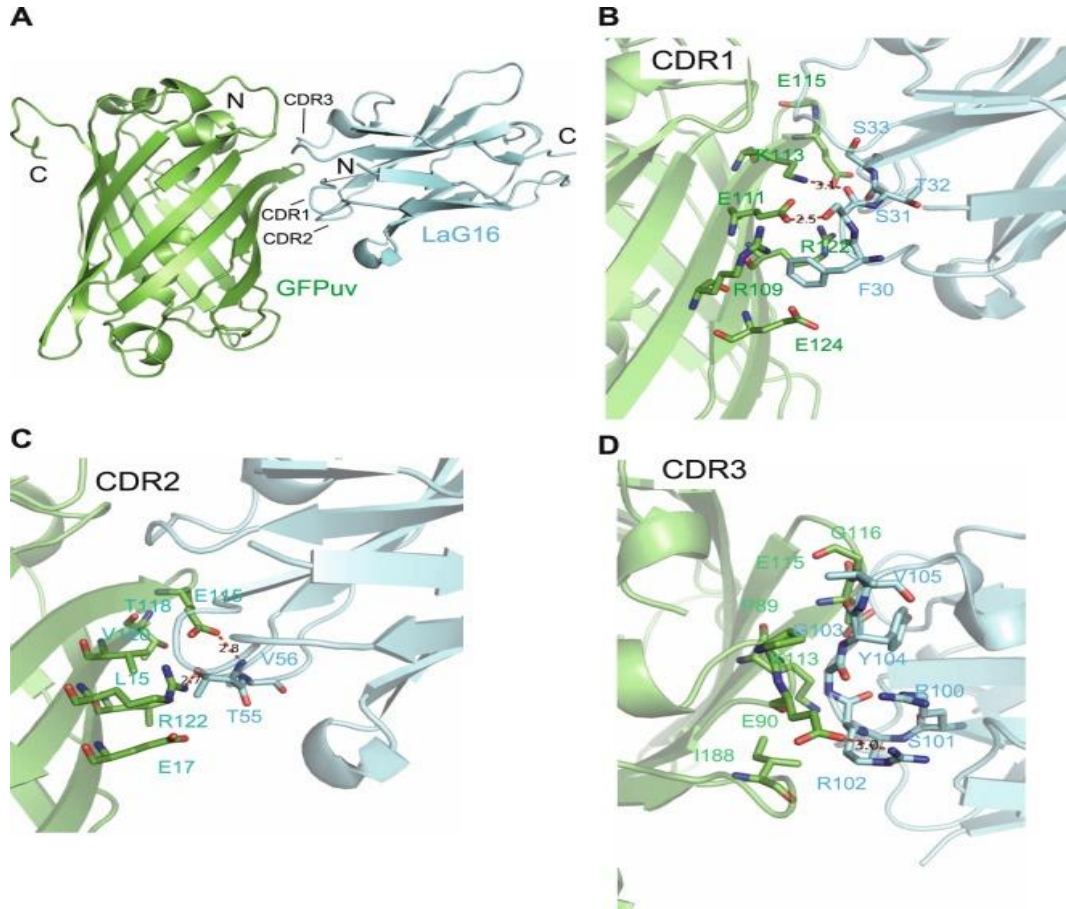


Figura 1: struttura dimerica della proteina fluorescente verde (GFP) LaG16-GFPuv. E' costituita da 11 foglietti β disposti in circolo a formare la struttura β -barrel e due segmenti ad α -elica.

- ❖ E' stato dimostrato che le cellule fetali di topo positive al **GFP** (proteina di fluorescenza verde) attraversano la **barriera emato-encefalica**, migrando verso una lesione del **SNC** indotta artificialmente e si differenziano in cellule neurali.
- ❖ Concentrate nell'**ippocampo**, nei **lobi parietali e temporali** della **corteccia prefrontale**.
- ❖ La presenza di DNA maschile nella materia grigia di una donna deceduta a 94 anni, è stata ricondotta ad un **aborto procurato o spontaneo**.

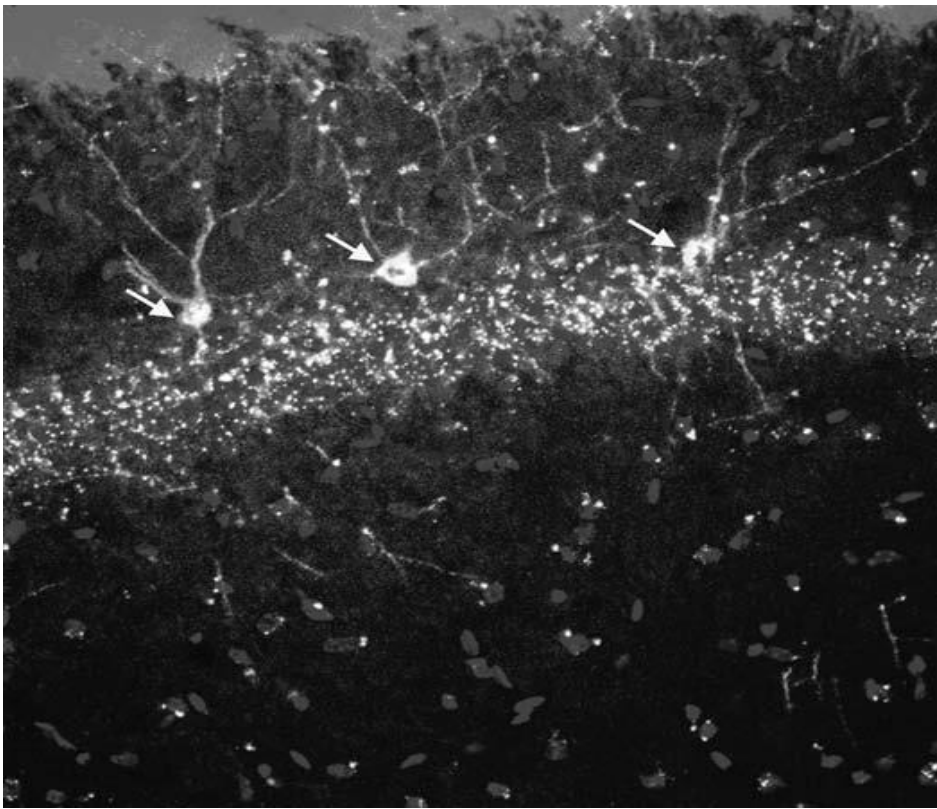
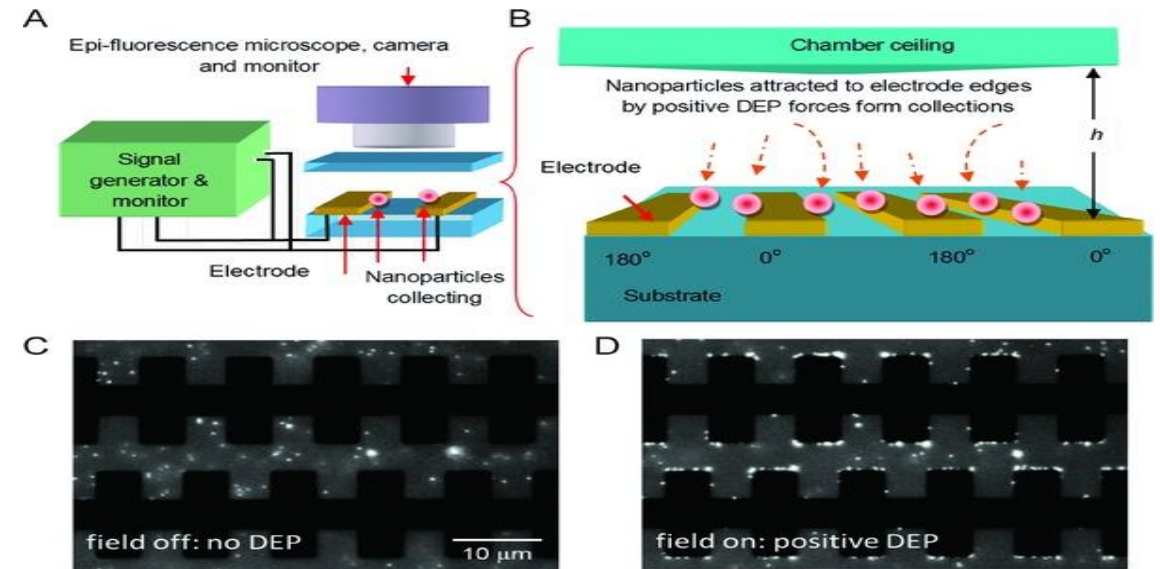


Figura 2 : Le frecce mostrano **3 P****A****P****C** che coesprimono il marcatore **GFP** delle cellule fetali e il marcatore neuronale **β -3-tubulina** nello strato cellulare dell'**ippocampo** di un murino.

- ❖ Le cellule fetali hanno alcuni caratteri simili alle cellule progenitrici come il potenziale di differenziazione multilineare e di conseguenza sono chiamate cellule progenitrici associate alla gravidanza (**PAPC**).
- ❖ I **PAPC** sopravvivono spostandosi nelle nicchie delle cellule staminali materne come il **midollo osseo** e rappresentano un serbatoio a lungo termine di cellule staminali in caso di lesione tissutale.

Tecniche per isolare le cellule fetali

- ❖ Metodica utilizzata: tecnologia **DEParray** al posto della tecnica «della biopsia liquida».
- ❖ Dispositivo con un micro-chip in silicio, sul quale viene caricato il campione.
- ❖ Le cellule d'interesse sono catturate sulla sua superficie secondo il **principio DEP**.
- ❖ Ogni cellula isolata, viene poi analizzata da un microscopio a fluorescenza.
- ❖ Presenza di **10-20** cellule fetali in ogni **20** milligrammi di sangue.

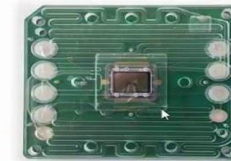


DEPArray™_{NxT}

DEPArray™ NxT Instrument:
Image-based digital sorter



DEPArray™ A300K:
semiconductor cartridge



Cancro della cervice e microchimerismo

Patient or control group	Age (y)	Pregnancy history			Diagnosis	Type of surgery	Section size*
		Male	Female	Abortion			
Patients with large (surgical) tissue specimens							
1	62	1	1	0	Adenocarcinoma	RAH, BSO	Large
2	50	1	1	2	Squamous cell carcinoma (NK)	RAH	Large
3	63	1	0	3	Squamous cell carcinoma (NK)	RAH, BSO	Large
4	57	1	4	5	Squamous cell carcinoma (NK)	RAH, BSO	Large
Patients with small (biopsy) tissue specimens							
5	75	3	4	2	Squamous cell carcinoma (NK)	RAH, BSO	Small
6	49	3	2	1	Squamous cell carcinoma (NK)	RAH	Small
7	73	3	3	2	Squamous cell carcinoma (NK)	RAH, BSO	Small
8	54	1	1	2	Squamous cell carcinoma (K)	RAH, BSO	Small
Positive controls							
1	59	2	4	1	Uterine myoma	TAH, BSO	Large
2	75	2	5	0	Ovarian cyst, uterine myoma	TAH, BSO	Small
Negative controls							
3	55	0	5	0	Uterine myoma	TAH, BSO	Large
4	43	0	2	0	Uterine myoma	TAH	Small
5	45	0	0	0	Squamous cell carcinoma (K)	RAH	Small
6	42	0	2	0	Squamous cell carcinoma (NK)	RAH	Large
7	39	0	2	0	Squamous cell carcinoma (NK)	RAH	Large

RAH = radical abdominal hysterectomy; BSO = bilateral salpingo-oophorectomy; NK = nonkeratinizing tumor; K = keratinizing tumor; TAH = total abdominal hysterectomy.

* Small = $\sim 0.5 \times 0.1$ cm; large = $\sim 1.5 \times 2.0$ cm.

Tabella 1 : Storia clinica e riproduttiva di pazienti con cancro della cervice e controlli.

- ❖ Il cancro **della cervice** è il terzo tipo di cancro più comune nelle donne. Alcuni fattori di rischio sono infezioni da *Papillomavirus* umano (HPV) a trasmissione sessuale.
- ❖ Il tessuto della cervice è stato ottenuto da 8 donne sottoposte a **isterectomia radicale**.
- ❖ Il microchimerismo nella cervice potrebbe svilupparsi da 3 diversi fattori:
 1. Traffico di cellule fetali durante la gravidanza.
 2. Presenza di spermatoцитi dopo un rapporto sessuale.
 3. Trasferimento orizzontale di DNA dopo la fagocitosi dei nuclei maschili degli spermatozoi.

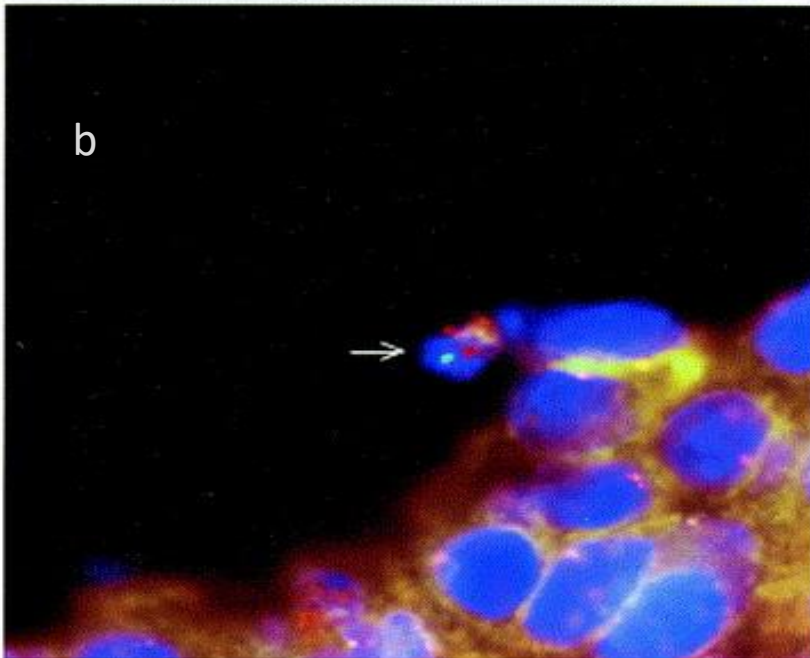
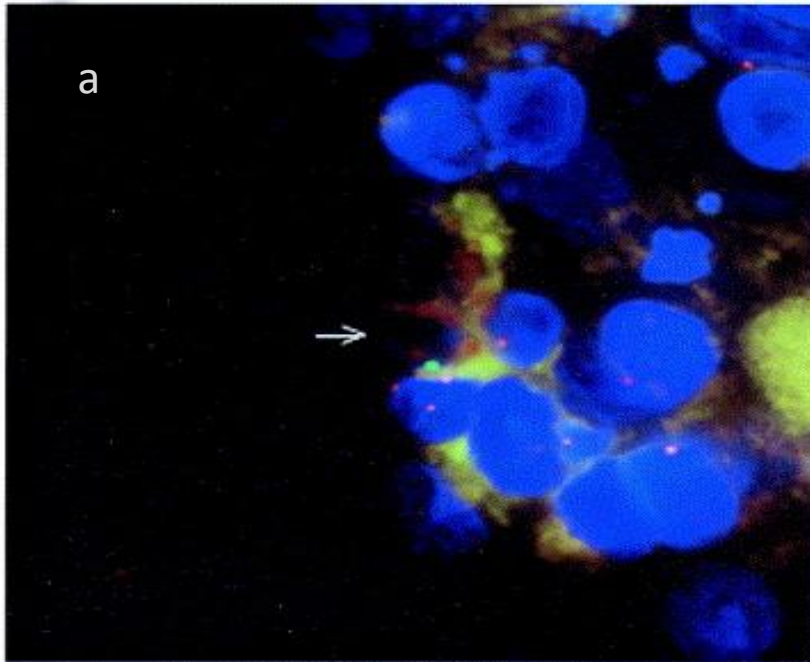
Materiali e metodi utilizzati

- ❖ Le sezioni di tessuto sono state analizzate con ibridazione in situ fluorescente (**FISH**) e l'**immunomarcatura** per la rilevazione simultanea dei cromosomi sessuali e dei marcatori proteici (**CD45** e **citocheratina**).
- ❖ Le cellule maschili sono state trovate in tutti e 4 i pazienti per i quali sono state analizzate **sezioni chirurgiche** (1,5x 2 cm).
- ❖ Solo 1 cellula maschile è stata trovata in 2 dei 4 pazienti per i quali sono stati analizzati **campioni bioptici** (0,1x0,5 cm).
- ❖ Nessuna cellula maschile è stata trovata nei campioni di tessuto dei controlli.

Patient or control group	Numbers of microchimeric cell		
	Slide 1	Slide 2	Slide 3
Patients with large sections available			
1	6		
2	3	4	3
3	7 (cluster of 6)	2	7 (cluster of 5)
4	5	11 (includes 2 clusters of 6 and 3)	7
Patients with small section available			
5	1	0	0
6	0	0	0
7	0	0	1
8	0	0	0
Internal control (from patient 1)			
Lymph node (R)	0	0	0
Lymph node (L)	0	0	0
Endometrium	0	0	0
Myometrium	0	0	0
Ovary	0	0	0
Tube	0	0	0
Positive Control			
1	0	0	0
2	0	0	0
Negative Control			
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0

FISH = fluorescence in situ hybridization; R = right; L = left.

Tabella 2 : Numero di cellule maschili microchimeriche osservate nel tessuto della cervice da FISH.



- ❖ Il **44%** (8 su 18) delle cellule microchimeriche era positivo per CD45, un marcatore leucocitario comune e il **24%** (9 su 37) delle cellule microchimeriche era positivo per la citocheratina.
- ❖ Nessuna cellula era positiva per entrambi i marcatori.
- ❖ La scoperta di **cellule CD45 positive** suggerisce la migrazione dei leucociti dalla circolazione materna nel tessuto della cervice.
- ❖ La presenza di **cellule positive alla citocheratina** suggerisce la presenza di cellule epiteliali nel tessuto della cervice formato da strati di cellule squamose e colonnari.

Figura 2: Fotomicrografie che mostrano cellule maschili CD45 positive con segnali cromosomici X (**rosso**) nella **figura A** e segnali cromosomici Y (**verde**) nella **figura B**, all'interno del campione del tessuto della cervice dopo FISH e immunomarcatura.

Figura 3: Fotomicrografie che mostrano le cellule maschili all'interno del tessuto della cervice dopo l'immunomarcatura con l'anticorpo della citocheratina.

- a) Cellule positive alla citocheratina (**freccia grande**) e negative (**freccia piccola**).
- b) Un cluster di cellule positive alla **citocheratina**.
- c) Una cellula maschile **negativa** alla citocheratina con segnali X (**rosso**) e Y (**verde**) **prima** dell'immunomarcatura.
- d) La freccia indica una cellula maschile negativa alla citocheratina **dopo** immunomarcatura.
- e) Cellula maschile **positiva** alla citocheratina **prima** dell'immunomarcatura .
- f) La freccia indica una cellula maschile **positiva** alla citocheratina **dopo** immunomarcatura.

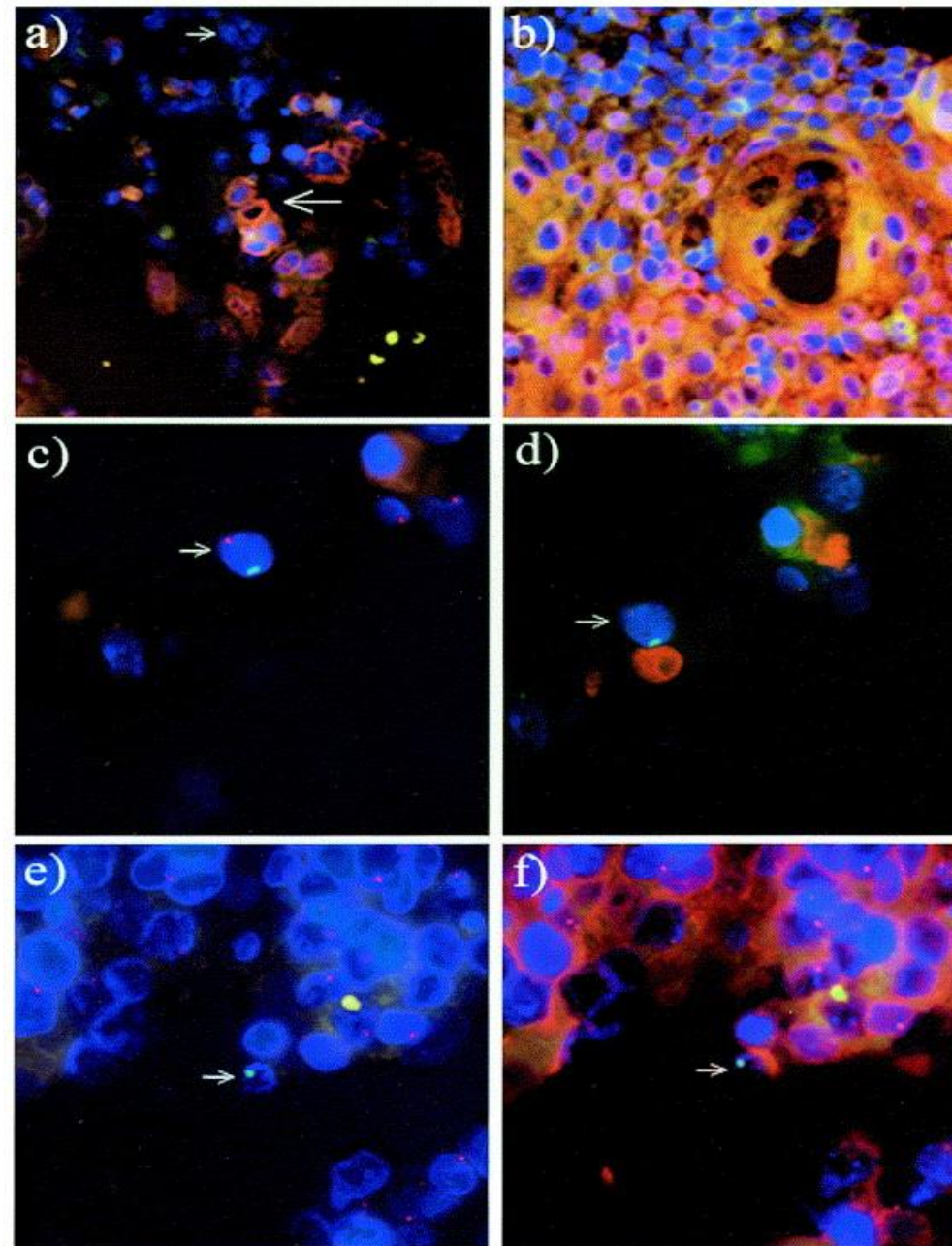


Table 1

Fetal cell microchimerism and cancer. The tumors in whom microchimerism has been studied, the laboratory techniques employed to detect it, and the hypotheses about its role are reported.

Disease	Sample analyzed	Technique	Hypothesized role for FCM	References
Cervical cancer	Tissue	FISH, ImmunoFISH	Carcinogenetic or protective	Cha et al. [22]
Papillary thyroid cancer	Tissue	PCR, FISH, ImmunoFISH	Protective	Cirello et al. [26]
Lung cancer	Tissue	FISH, nested-PCR	Protective	O'Donoghue et al. [27]
Breast cancer	Blood	Q-PCR	Protective	Gadi et al. [23,24]
	Tissue	FISH, Immuno-FISH	Carcinogenetic	Dubernard et al. [25]
Hematological malignancies and solid tumors ^a	Blood	Two-stage PCR	Protective	Gilmore et al. [28]

^a Breast, lung, colon, uterus, ovarian, cervical and miscellaneous cancers.

❖ La presenza persistente di cellule microchimeriche nella cervice potrebbe svolgere un ruolo nella **cancerogenesi**:

1. Alterando o sopprimendo il **sistema immunitario** della donna.
2. Rendendo più suscettibile il tessuto cervicale all'infezione da **HPV** o fornendo un ambiente più adatto per la crescita del tumore.
3. Oppure i **PAPC** potrebbero essere in grado di differenziarsi nel tentativo di ripopolare o riparare la porzione di tessuto della cervice colpito.

❖ Negli ultimi anni, il campo di ricerca sul microchimerismo si è esteso dalle malattie autoimmuni ai tumori maligni e sono state ottenute diverse evidenze che indicano un **ruolo protettivo** piuttosto che **patogenico** di questo fenomeno.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE.



BELLEGGIA DEMI

Bibliografia

- ❖ «Cervical cancer and microchimerism» Cha D, Khostrotehrani K, Kim Y, Stroh H, Bianchi DW, Johnson KL. 4, October 2003. (Pubmed.gov)
- ❖ «Fetal cell microchimerism in human cancers» Fugazzola L, Cirello V, Beck-Peccoz P. 28 January 2010. (Pubmed.gov)
- ❖ «Fetal Microchimerism» Molecular Human Reproduction; Vol.21 n. 11, November 2015.
- ❖ «Le cellule staminali del feto possono guarire gli organi materni malati?» Il Sussidiario. Net, 13 Dicembre 2016.
- ❖ «Entro un anno il prototipo del test per la diagnosi prenatale del sangue materno» Salute e Benessere; Redazione Ansa, Roma, 29 febbraio 2019.