

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO**



*Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali*

*Dipartimento di Scienze Mediche*

*Corso di Dottorato in Scienze Endocrinologiche e Metaboliche XXIV ciclo*

**MICROCHIMERISMO CELLULARE FETALE NEL  
CARCINOMA PAPILLARE DELLA TIROIDE:  
ANALISI SU TESSUTI E SU SANGUE PERIFERICO**

Settore scientifico disciplinare: MED 13

Tesi di Dottorato di:

Carla Colombo

Matricola: R08082

Tutor: Prof.ssa Laura Fugazzola

Coordinatore del Corso di Dottorato: Prof. Paolo Beck-Peccoz

**ANNO ACCADEMICO 2010-2011**

# INDICE

INTRODUZIONE.....	3
1.1 MICROCHIMERISMO E PATOLOGIE CHE SI SVILUPPANO IN GRAVIDANZA.....	9
1.1.1 Parto pre-termini .....	9
1.1.2 PEP (eruzioni polimorfiche della gravidanza).....	9
1.1.3 Pre-eclampsia.....	9
1.1.4 Gravidanze aneuploidi .....	10
1.2 MICROCHIMERISMO CELLULARE FETALE E PATOLOGIE AUTOIMMUNITARIE .....	11
1.2.1 Cirrosi biliare primaria (PBC) .....	12
1.2.2 Sindrome di Sjögren .....	13
1.2.3 Malattie del tessuto connettivo .....	14
1.2.4 Malattie autoimmunitarie della tiroide .....	17
1.3 MICROCHIMERISMO CELLULARE FETALE E PATOLOGIE NON AUTOIMMUNITARIE .....	23
1.3.1 Malattie tiroidee non autoimmunitarie .....	23
1.3.2 Malattie epatiche non autoimmunitarie .....	25
1.3.3 Carcinoma della cervice .....	27
1.4 MICROCHIMERISMO CELLULARE MATERNO E PATOLOGIE AUTOIMMUNITARIE .....	30
1.4.1 Diabete mellito di tipo 1 .....	32
1.4.2 Malattie infiammatorie cutanee .....	34
1.4.3 Lupus neonatale con blocco cardiaco congenito .....	35

1.4.4	Sclerosi sistemica (SSc) e lupus eritematoso sistemico (SLE).....	37
1.4.5	Miopatie infiammatorie giovanili .....	37
1.5	MECCANISMI DEL MICROCHIMERISMO NELL'ORGANISMO .....	38
1.5.1	Coinvolgimento del microchimerismo nello sviluppo di patologie .....	38
1.5.2	Coinvolgimento del microchimerismo nei processi di riparo tissutale ...	39
1.5.3	Microchimerismo e trapianto d'organo .....	42
1.5.4	Microchimerismo e trasfusioni .....	43
	SCOPO DELLA RICERCA.....	45
	MATERIALI E METODI.....	46
2.1	STUDIO EFFETTUATO SU TESSUTI NEOPLASTICI E TESSUTI SANI .....	47
2.2	STUDIO EFFETTUATO SU SANGUE PERIFERICO DI PAZIENTI AFFETTE DA PTC E DI CONTROLLI SANI.....	50
2.3	SCORING E ANALISI STATISTICA .....	52
	RISULTATI .....	54
3.1	RISULTATI PRELIMINARI DALL'ANALISI EFFETTUATA SU TESSUTI NEOPLASTICI E TESSUTI SANI APPARTENENTI A PAZIENTI AFFETTE DA PTC CON O SENZA GRAVIDANZE MASCHILI .....	55
3.2	IDENTIFICAZIONE DI DNA MASCHILE IN CAMPIONI DI SANGUE PERIFERICO.....	61
3.3	IDENTIFICAZIONE DI DNA MASCHILE IN TESSUTI NEOPLASTICI TRAMITE ANALISI PCR E ANALISI FISH .....	64
	DISCUSSIONE.....	66
	Bibliografia.....	74

# **CAPITOLO 1**

## **INTRODUZIONE**

Con il termine microchimerismo si definisce la presenza di un piccolo numero di cellule circolanti da un individuo ad un altro individuo. Questo fenomeno si osserva in caso di trasfusione di sangue, trapianto d'organo, ma più spesso fisiologicamente in corso di gravidanza. È infatti proprio in questo ultimo caso che si osserva un traffico bi-direzionale di cellule a partire dalla 4<sup>a</sup>-6<sup>a</sup> settimana di gestazione. Numerosi studi hanno dimostrato che queste cellule microchimeriche persistono per decenni nel circolo e nei tessuti con capacità di differenziarsi in diverse linee cellulari.

Altre forme di microchimerismo associate alla gravidanza sono la presenza di un gemello o di un gemello riassorbito, il cosiddetto *vanishing twin*, o di un fratello avuto da una precedente gravidanza o ancora un aborto spontaneo, sia noto che misconosciuto, o elettivo.

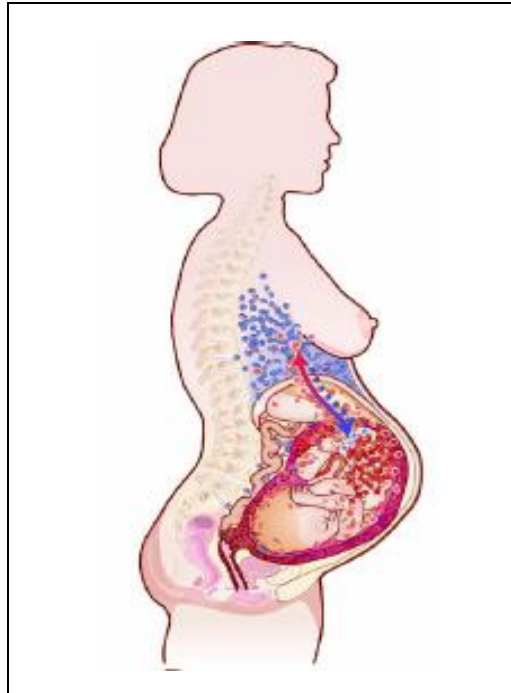
Numerosi studi hanno suggerito un possibile ruolo del microchimerismo cellulare nella patogenesi di alcuni disordini autoimmuni e non autoimmuni.

Infatti alcuni autori ipotizzano che il microchimerismo cellulare fetale (MCF) possa essere coinvolto nella risposta infiammatoria cronica e quindi nel danno tissutale (*bad microchimerism*) mentre altri lavori sostengono che il MCF possa giocare un ruolo fondamentale nell'immunosorveglianza contro le neoplasie e nel riparo tissutale (*good microchimerism*).

Tuttavia non si può escludere che tali cellule non abbiano in realtà alcun effetto biologico sulla salute dell'uomo (*innocent bystanders*) (Johnson KL et al., 2004).

Come accennato, la gravidanza è la fonte principale di microchimerismo cellulare. Pur essendo stato descritto un traffico bi-direzionale di cellule (Fig. 1.1), il passaggio di cellule da feto a madre (microchimerismo cellulare fetale, MCF) risulta essere più

imponente rispetto a quello da madre a feto (microchimerismo cellulare materno, MCM) (Lo YM et al., 2000).



**Figura 1.1** Rappresentazione del traffico bi-direzionale di cellule tra madre e feto osservato durante la gravidanza.

È stata osservata inoltre una correlazione positiva tra il numero di cellule fetali presenti nel sangue materno e l'età gestazionale. Infatti, alla 36<sup>a</sup> settimana di gestazione oltre il 90% delle donne gravide hanno una quantità di cellule fetali in circolo tale da essere facilmente rilevata (Khosrotehrani K et al., 2003).

Sebbene il numero di cellule fetali circolanti sia molto basso, da cui il termine microchimerismo, è stato stimato che sia presente almeno 1 cellula fetale ogni 500000 cellule materne. Alcune cellule fetali persistono nel circolo sanguigno e nei tessuti materni per decenni dopo il parto, se non addirittura per tutta la durata della vita (Bianchi DW et al., 1996).

È necessario a questo punto sottolineare il fatto che sia le cellule fetali maschili che quelle femminili sono in grado di oltrepassare la barriera placentare e di entrare nel circolo materno durante la gravidanza. Tuttavia la maggior parte degli studi condotti sul MCF si basa su metodiche semplici e rapide che sfruttano la differenza di sesso tra feto maschio e madre per ricercare la presenza di DNA o di cellule fetali maschili.

L'utilizzo di *markers* specifici maschili (sequenze presenti esclusivamente sul cromosoma Y) ha infatti permesso di identificare diversi tipi cellulari fetali nel circolo materno: trofoblasti, cellule staminali ematopoietiche CD34<sup>+</sup> o progenitori CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, cellule staminali mesenchimali, eritroblasti nucleati, linfociti B e T, monociti/macrofagi e cellule NK. Oltre al rilevamento di cellule fetali intatte, è stata riscontrata anche la presenza di DNA fetale libero nel siero e nel plasma materni (Bianchi DW, 2007).

Il passaggio di cellule fetali nel circolo materno è un evento fisiologico ed è infatti stato dimostrato che è necessario raggiungere una soglia critica di cellule fetali nel circolo materno affinché venga stabilita e mantenuta la gravidanza. Un numero insufficiente di cellule fetali sembrerebbe provocare un aborto, mentre al contrario un numero troppo elevato di tali cellule potrebbe essere un fattore predittivo di complicanze tardive o addirittura predisporre allo sviluppo di patologie autoimmuni (Arlett et al., 2005).

È importante ricordare che il feto non è altro che un trapianto semi-allogeneico, in quanto sulla superficie delle sue cellule sono espressi anche antigeni HLA di origine paterna. Tuttavia il feto normalmente non viene abortito, in quanto per mezzo di numerosi meccanismi di tolleranza attiva periferica in gravidanza le cellule immunitarie materne diventano irresponsive alle cellule fetali microchimeriche.

Il passaggio e la persistenza di cellule fetali nel circolo materno denota un'imperfezione della barriera placentare e non è correlabile ad un difetto della risposta immunitaria da parte della madre, anzi è possibile che tali cellule abbiano un ruolo attivo nella determinazione del repertorio immunologico (Ando T et al., 2003).

È stato infatti postulato che alcune cellule fetali riescano a raggiungere gli organi linfoidi e il midollo osseo materni inducendo e mantenendo la tolleranza materna all'impianto fetale semi-allogenico.

In questo processo gioca un ruolo molto importante la placenta. Infatti il trofoblasto, che serve da barriera fisica tra madre e feto, è soggetto all'immuno-sorveglianza materna ed è composto da varie cellule esprimenti molecole immuno-modulanti, tra cui l'antigene G leucocitario umano HLA-G (appartenente alla famiglia MHC di classe I, inibisce l'immunità mediata dalle cellule NK e compromette la maturazione spontanea delle cellule dendritiche), il ligando Fas (coinvolto nell'apoptosi dei cloni di cellule T materne reattive ad antigeni fetali in modelli animali) e l' indoleamina 2,3-dioxygenasi (catabolizza il triptofano nelle cellule immunitarie materne), e secernenti diversi fattori umorali, tra cui il fattore inibitorio della leucemia e il progesterone.

In gravidanza avvengono vari cambiamenti sistemici che includono una riduzione nel rapporto della frazione cellulare  $CD4^+/CD8^+$ , che rimane basso anche dopo 6 mesi dal parto, ed un cambiamento nel profilo delle citochine a favore della risposta T-helper di tipo 2 durante la gravidanza e T-helper 1 nel periodo post-parto.

Tuttavia alcuni fattori modulatori, che favoriscono la sopravvivenza delle cellule fetali durante la gravidanza, non ritornano alla normalità dopo il parto, favorendo così la persistenza del microchimerismo cellulare fetale (Ando T et al., 2002). Altri fattori che potrebbero agire sulla persistenza del microchimerismo cellulare fetale sono



l'istocompatibilità tra madre e feto e la presenza di specifici antigeni tissutali (ad es. HLA-DQA1\*0501 materno). È stato inoltre osservato un maggiore traffico di cellule fetali in presenza di parto pre-termine, di anomalie della placenta o in presenza di complicanze della gravidanza (aneuploidie e pre-eclampsia) (Khosrotehrani K et al., 2005).

Altre fonti di microchimerismo legato alla gravidanza, come precedentemente accennato, sono la presenza di un gemello, di un precedente fratello o di un aborto spontaneo o elettivo (Sarkar K et al., 2004).

## 1.1 MICROCHIMERISMO E PATOLOGIE CHE SI SVILUPPANO IN GRAVIDANZA

### 1.1.1 Parto pre-termine

Nelle donne con parto pre-termine la concentrazione di DNA fetale microchimerico è risultata maggiore rispetto alle donne con parto a termine. Inoltre la concentrazione è ancora più elevata nell'aborto chirurgico rispetto all'aborto tramite procedura medica. Queste elevate concentrazioni di DNA fetale riscontrate prima di un parto pre-termine spontaneo rendono possibile la differenziazione tra parto pre-termine vero e falso.

### 1.1.2 PEP (eruzioni polimorfiche della gravidanza)

Le eruzioni polimorfiche della gravidanza (PEP) rappresentano un disordine transitorio della gravidanza, si sviluppano generalmente dopo la 34<sup>°</sup> settimana di gravidanza e si presentano come papule pruriginose ed eritematose su addome, braccia ecc.

Il riscontro di DNA maschile nelle lesioni cutanee di donne con PEP suggerisce che le cellule fetali siano in grado di migrare alla cute durante la gravidanza e che potrebbero essere coinvolte in una risposta infiammatoria di breve durata nei tessuti materni. Tuttavia il meccanismo patologico rimane tuttora ignoto (Arlett CM et al., 2005).

### 1.1.3 Pre-eclampsia

È un altro disordine multisistemico legato alla gravidanza, dovuto ad una disfunzione dell'endotelio vascolare con conseguente scarsa placentazione e causa di mortalità materna e fetale. È stato dimostrato che una sostanziale porzione di eritroblasti presenti nel sangue di donne con pre-eclampsia era di origine fetale, in accordo con un effettivo

incremento del traffico di cellule fetali attraverso la placenta osservato in queste donne rispetto a controlli (Sakar K et al., 2004).

#### **1.1.4 Gravidanze aneuploidi**

In alcune donne con feti maschili con cariotipo 47XY,21 e 47 XY, + inv (dup) 15 è stato riscontrato un numero più elevato di cellule fetali microchimeriche. Questo suggerisce la possibilità che alcune gravidanze aneuploidi possano presentare anomalie vascolari della placenta.

## 1.2 MICROCHIMERISMO CELLULARE FETALE E PATOLOGIE AUTOIMMUNITARIE

Le malattie autoimmunitarie costituiscono un gruppo eterogeneo di oltre 80 disordini caratterizzati da una risposta immunitaria patologica diretta contro i tessuti self. È interessante notare che le donne mostrano una maggiore predisposizione per alcune di queste patologie, con miglioramento durante la gravidanza e peggioramento o comparsa dopo il parto. Inoltre alcune patologie autoimmunitarie (sclerosi sistemica, cirrosi biliare primaria, sindrome di Sjögren e occasionalmente miositi e lupus) si presentano con caratteristiche cliniche simili a quelle osservate nella malattia cronica del trapianto contro l'ospite (chronic Graft-versus-Host Disease, cGvHD).

La cGvHD è una forma di chimerismo iatrogeno, che si sviluppa in alcuni pazienti in seguito a trapianto di midollo osseo ed è causato da una reazione dei linfociti T del donatore contro gli antigeni di superficie delle cellule del ricevente. Si innesca così una serie di risposte immunitarie contro diversi tessuti dell'ospite (Nelson LJ et al., 2002). I geni codificanti gli antigeni leucocitari comuni (HLA) specifici del donatore e del ricevente, la competenza immunologica dell'ospite e il numero e le caratteristiche delle cellule T del donatore svolgono un ruolo centrale nello sviluppo della cGvHD, così come i geni codificanti per gli antigeni HLA di classe II sono importanti nelle malattie autoimmunitarie (Nelson JL et al., 2002; Sarkar K. et al., 2004).

Queste osservazioni hanno portato ad ipotizzare che il microchimerismo osservato in corso di gravidanza e i geni HLA delle cellule self e non-self siano coinvolti nella patogenesi di alcune malattie autoimmunitarie. Si sono così susseguiti diversi studi con

lo scopo di valutare e comprendere le conseguenze a lungo termine della gravidanza sulla salute dell'uomo (Nelson LJ et al., 2002).

Numerosi dati riportati in letteratura indicano che il microchimerismo cellulare sia presente in una grossa porzione di soggetti affetti da patologie autoimmunitarie e/o che un alto numero di cellule microchimeriche sia presente nei casi rispetto ai controlli. Tuttavia alcuni risultati non sono concordanti, probabilmente a causa di differenze nel disegno sperimentale (PCR quantitative o qualitative piuttosto che FISH), nella sensibilità e specificità delle tecniche utilizzate e nel tipo di campione analizzato (sangue o tessuti).

Diversi fattori potrebbero inoltre favorire la persistenza del microchimerismo in alcune malattie autoimmunitarie piuttosto che in altre. Tra questi potrebbero avere un ruolo importante, come precedentemente accennato, i geni HLA. Infatti differenze negli antigeni HLA tra madre e feto potrebbero essere fondamentali nella determinazione della tolleranza immunitaria.

Oltre a fattori genetici, potrebbero contribuire allo sviluppo di tali patologie anche fattori riproduttivi e ambientali (tossine, droghe e infezioni) probabilmente modulando il traffico, la proliferazione e la persistenza delle cellule microchimeriche (Sarkar K et al., 2004).

### **1.2.1 Cirrosi biliare primaria (PBC)**

La cirrosi biliare primaria è una patologia autoimmunitaria con caratteristiche cliniche simili a quella che si sviluppa in corso di cGvHD.

È caratterizzata da un'inflammatione periportale a carico dell'epitelio dei dotti biliari, con conseguente perdita dei dotti interlobulari e biliari settali e colestasi intraepatica. È

ricorrente nelle donne in età post-riproduttiva e sembrerebbe essere più frequente nelle donne che hanno avuto un maggior numero di gravidanze.

È stata evidenziata la presenza di MCF nel fegato di donne affette da PBC, tuttavia la maggior parte degli studi condotti non ha rilevato una differenza statisticamente significativa nella frequenza di MCF in donne con PBC e controlli affetti da altre patologie epatiche (Tanaka A et al., 1999; Rubbia-Brandt L et al., 1999; Corpechot C et al., 2000; Invernizzi P et al., 2000).

Soltanto uno studio, basato sulla tecnica FISH, ha dimostrato una significativa differenza nella frequenza di microchimerismo rilevato nel fegato di pazienti affette da PBC rispetto a controlli. Tuttavia non è stato possibile escludere se alcune di queste donne fossero anche affette da SSc. Le cellule fetali intraepatiche riscontrate esprimevano gli antigeni CD45 e HLA-DR, ma non CD34 o  $\alpha$ -fetoproteina. (Fanning PA et al., 2000).

### **1.2.2 Sindrome di Sjögren**

Questa sindrome autoimmune è caratterizzata dalla presenza di secchezza oculare e orale e si può associare a patologie tiroidee.

Anche in questo caso i dati riportati in letteratura sono discordanti: in alcuni lavori è stata evidenziata la presenza di alti livelli di MCF nel sangue o nella frazione di cellule CD34<sup>+</sup> sia in pazienti affette da tale sindrome che in controlli sani, senza alcuna differenza significativa nella frequenza (Miyashita Y et al., 2000), mentre in altri non è stato riscontrato DNA maschile nel sangue di tali pazienti (Toda I et al., 2001; Kuroki M et al., 2002).

Per quanto riguarda gli studi condotti sui tessuti, cellule maschili microchimeriche sono risultate essere statisticamente più frequenti nelle ghiandole salivari, in quelle labiali e nel fluido bronco-alveolare di donne affette rispetto ai controlli (Endo Y et al., 2002; Kuroki M et al., 2002).

Il MCF sembrerebbe essere coinvolto nel processo infiammatorio che causa la Sindrome di Sjögren, tuttavia questo disordine frequentemente si sviluppa secondariamente ad altre patologie autoimmunitarie, quali la SSc, il lupus e l'artrite reumatoide. Infatti non sono state riscontrate cellule maschili microchimeriche nelle ghiandole salivari e lacrimali di donne affette da Sindrome di Sjögren primaria, mentre erano presenti nei tessuti coinvolti di donne che avevano sviluppato tale malattia in seguito a SSc (Toda I et al., 2001; Aractingi S et al., 2002).

### **1.2.3 Malattie del tessuto connettivo**

#### *Sclerosi sistemica (SSc)*

Gli studi iniziali sul microchimerismo si sono focalizzati sulla SSc, una patologia caratterizzata da un progressivo ispessimento della pelle coinvolgente spesso i polmoni, l'intestino, il cuore e i reni, e presente in pazienti con cGvHD.

Diversi studi hanno dimostrato che le donne affette da SSc, con almeno un figlio maschio nato precedentemente alla diagnosi di malattia, hanno un più alto numero di cellule fetali maschili nel loro sangue rispetto a donne sane, ma la percentuale relativa di donne con cellule microchimeriche non è statisticamente significativa tra i due gruppi (Nelson JL et al., 1998; Lambert NC et al., 2002; Arlett CM et al., 2002).

La maggior parte delle cellule microchimeriche, riscontrate nel compartimento delle cellule CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> del sangue, esprimeva l'antigene di superficie CD4. È stato

dimostrato che queste cellule erano immunologicamente competenti e che il sistema immunitario dell'ospite era incapace di reagire contro queste cellule (Arlett CM et al., 2002, Arlett CM et al., 2005).

È stata evidenziata la presenza di cellule fetali maschili anche nei tessuti coinvolti nella SSc e in quelli ottenuti da soggetti sani, con differenze significative sia nella frequenza di microchimerismo che nel numero medio di cellule fetali osservate nei due gruppi (Arlett CM et al., 1998; Johnson KL et al., 2001; Ohtsuka T et al., 2001; Gannage M et al., 2002).

È stata riscontrata la presenza di numerose cellule microchimeriche anche nella cute non affetta ottenuta da pazienti con SSc. Questo risultato suggerisce che un influsso di cellule microchimeriche possa precedere lo sviluppo della fibrosi tissutale, quindi essere presente nei tessuti prima di ogni evidenza clinica di cambiamenti sclerotici.

Questi dati suggeriscono che le cellule microchimeriche possano essere attivate da fattori ambientali (es. virus, agenti chimici, batteri) e migrare verso la cute dove vengono innescati vari eventi fra cui il reclutamento di cellule autologhe tramite la secrezione di citochine proinfiammatorie ed ottenere alterazioni fibroproliferative e vascolari tipiche della SSc.

Anche nelle lesioni cutanee di donne affette da SSc è stata evidenziata la presenza di cellule T maschili con fenotipo CD4<sup>+</sup> in grado di reagire contro gli antigeni di istocompatibilità materni e produttori alti livelli di citochina IL-4 pro-fibrotica.

Questi risultati mostrano che le cellule fetali sono immunologicamente attive e in grado di proliferare piuttosto che *innocent bystanders* (Scaletti C et al., 2002).

In conclusione, sembra non esserci differenza nell'occorrenza del microchimerismo nel sangue di pazienti affette da SSc e di controlli sani, al contrario è stata osservata una



differenza significativa nel numero di cellule rilevate tra i due gruppi. I risultati degli studi condotti sui tessuti mostravano una differenza significativa nella frequenza di microchimerismo tra casi e controlli. Inoltre è stato ipotizzato che i linfociti T microchimerici CD4<sup>+</sup> piuttosto che CD8<sup>+</sup> possano essere coinvolti nella patogenesi della SSc. Tuttavia non è ancora stato determinato se queste cellule siano effettivamente coinvolte nello sviluppo della SSc o se siano semplicemente un *marker* di infiammazione. È necessario inoltre considerare comunque che linfociti T microchimerici sono stati riscontrati anche in donne sane (Bianchi DW et al., 1996) e che il microchimerismo fetale è comune anche tra le cellule B, NK e i monociti sia in donne sane che affette da SSc (Evans PC et al., 1999).

#### *Lupus eritematoso sistemico (SLE)*

È stata presa in considerazione anche una possibile associazione tra lupus eritematoso sistemico e microchimerismo. I risultati riportati in letteratura sono discordanti tra loro, infatti in alcuni casi sono state riscontrate meno frequentemente cellule microchimeriche nelle donne con SLE rispetto ai controlli sani (Miyashita Y et al., 2000), mentre in altri è stata rilevata la presenza di un elevato numero di cellule fetali maschili nei tessuti coinvolti ma senza dimostrare una stretta relazione tra le cellule microchimeriche e questa patologia (Johnson KL et al., 2001).

#### *Lichen sclerosus (LS) e Lichen planus (LP)*

La LS è una malattia cronica mediata da linfociti, che colpisce principalmente le donne di mezza età, si presenta in associazione a patologie autoimmuni classiche (es. tiroiditi) e mostra caratteristiche cliniche simili a quelle osservate in corso di sclerosi sistemica. È

stata evidenziata la presenza di DNA maschile nei tessuti di donne affette da LS, ma anche nei tessuti vulvari normali o coinvolti in altre patologie. Questi risultati non sembrerebbero indicare quindi un ruolo del microchimerismo nella patogenesi della LS (Regauer S et al., 2004).

La LP è una patologia papulo-squamosa cronica di eziologia ignota che colpisce soprattutto le donne di mezza età. Si presenta a livello cutaneo con papule poligonali eritematose e prurito soprattutto nelle giunture di braccia e gambe. Viene colpita la cavità orale nel 60-70% dei casi, nel restante 30% le lesioni orali rappresentano l'unica manifestazione della patologia. Dal punto di vista istologico, la LP è caratterizzata da un'infiltrazione di linfociti T a basso livello nell'epitelio, che causa la distruzione delle cellule basali, apoptosi e cambiamenti secondari nello spessore e nella maturazione dell'epitelio stesso. Tale patologia ha delle caratteristiche istologiche e immunologiche simili alla LP cutanea e orale che si sviluppa nella cGvHD. Tuttavia non è stata riscontrata la presenza di DNA maschile in nessuna lesione presa in esame (Tanei R et al., 2000; Lombardi T et al., 2001; Weger W et al., 2006).

#### **1.2.4 Malattie autoimmunitarie della tiroide**

Le tiroiditi sono patologie autoimmunitarie della tiroide, che si presentano con un'elevata incidenza nel periodo post-gravidico. Le donne affette da AITD mostrano generalmente un miglioramento o addirittura una remissione della malattia nel corso della gravidanza, seguito da un peggioramento o comparsa dopo il parto.

Queste osservazioni, insieme ad un effettivo aumento del flusso sanguigno verso la ghiandola tiroidea nel corso della gravidanza, hanno portato diversi autori ad ipotizzare

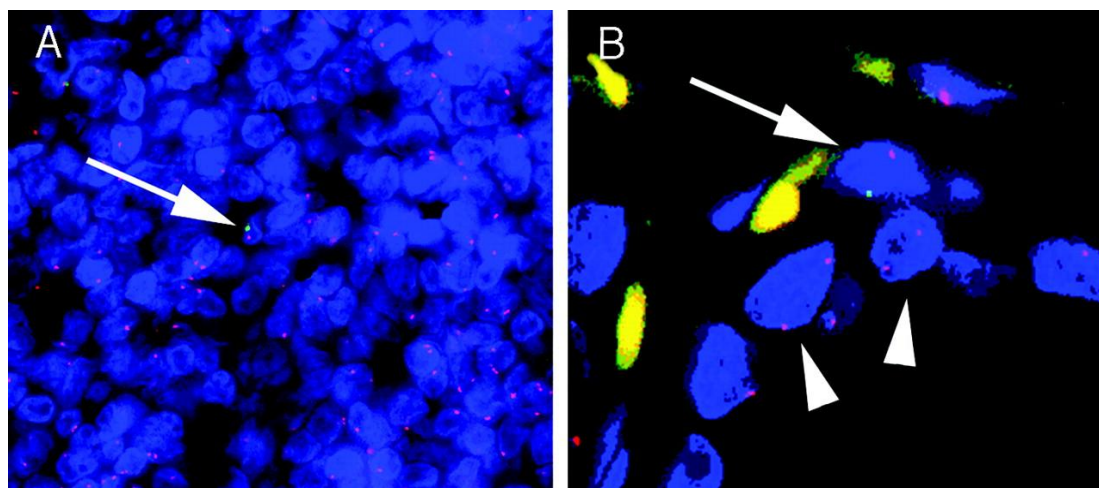
che la presenza di cellule fetali nel circolo e nei tessuti materni possa essere in qualche modo correlata allo sviluppo delle AITD.

La tiroidite di Hashimoto è una malattia autoimmune cronica, con progressiva distruzione del parenchima tiroideo ad opera di autoanticorpi e conseguente ipotiroidismo. Il MCF è stato rilevato con maggiore frequenza in donne con tiroidite autoimmune (Fig. 1.2 A) rispetto a donne con gozzi nodulari senza autoimmunità associata

Come per la SSc, i meccanismi eziopatologici proposti sono diversi. Le cellule fetali potrebbero essere sequestrate nei tessuti affetti e agire come effettori diretti di danno nei tessuti dell'ospite iniziando una GvHD. Tuttavia questa ipotesi non è supportata dal fatto che le cellule fetali sono state riscontrate a bassa concentrazione nel circolo materno. Un'altra possibilità è che le cellule fetali possano iniziare un processo il cui conseguente danno è causato dalle cellule della madre (reazione autoimmune) o ancora è possibile che cellule fetali possano *down*-regolare le cellule immuno-regolatorie dell'ospite, con conseguente danno da cellule *self* autoreattive. Queste ultime ipotesi sono quelle più accreditate per spiegare un possibile coinvolgimento del microchimerismo nello sviluppo della tiroidite di Hashimoto (Greer et al., 2011).

Un dato interessante è che le donne affette da questa patologia con MCF avevano avuto più figli (sia maschi che femmine) rispetto a quelle affette da tiroidite senza microchimerismo. Ciò nonostante non è stata riscontrata alcuna differenza significativa tra numero e sesso della prole tra casi e controlli.

Inoltre è possibile che la differenza nel microchimerismo tra casi e controlli possa derivare da un difetto autoimmunitario subclinico della placenta, anche se al momento non ci sono dati che confermino tale ipotesi.



**Figura 1.2** MCF in linfociti infiltranti la tiroide di donne con disturbi tiroidei autoimmuni. A) Linfocita maschile microchimerico con il cromosoma X in rosso e quello Y in verde nel tessuto tiroideo affetto da tiroidite di Hashimoto B) Linfocita maschile microchimerico con il cromosoma X in rosso e quello Y in verde nel tessuto tiroideo affetto da Malattia di Graves.

Tuttavia il ruolo patogenetico del MCF nella tiroidite di Hashimoto è messo in dubbio da alcuni rilievi: il rilievo di MCF in patologie nodulari benigne non autoimmuni (Klitschar M et al., 2001) e il rilievo di MCF in una tiroidite di Hashimoto con distribuzione in tutto il parenchima e non solamente nelle aree di infiltrazione linfocitaria (Srivatsa et al., 2001).

La malattia di Graves è causata da autoanticorpi diretti contro il recettore del TSH, con conseguente iper-stimolazione dei tireociti ed eccessiva produzione di ormoni tiroidei. Spesso durante la gravidanza si assiste alla attenuazione o alla scomparsa del processo autoimmune sotteso a tale patologia con netto miglioramento del quadro di ipertiroidismo. La presenza di DNA maschile nel sangue è stato rilevato nel 47% delle donne affette da Graves con almeno un figlio maschio e nel 30% di donne sane con almeno un figlio maschio, mentre non è stato rilevato in nessun campione proveniente da donne senza figli.

Per quanto riguarda l'analisi condotta sui tessuti, il MCF è risultato essere più frequente nelle donne affette (Fig. 1.2 B) rispetto a controlli sani (adenomi benigni), senza tuttavia differenze statisticamente significative (Imaizumi M et al., 2002).

Questi risultati dimostrano che il MCF non è un evento unico delle patologie autoimmuni, ma che è comune anche nelle donne sane in età riproduttiva.

Il microchimerismo fetale nella ghiandola tiroidea affetta da patologie immunitarie potrebbe coinvolgere un tipo cellulare differente da quello presente nelle patologie non autoimmunitarie.

Il meccanismo proposto per spiegare la modulazione della risposta immunitaria materna da parte delle cellule fetali prevede l'espressione di antigeni MHC di classe II, a cui vengono presentati gli alloantigeni fetali.

Durante il periodo post-parto viene meno la soppressione immunitaria operata dall'unità feto-placentare e ciò potrebbe portare all'attivazione delle cellule del sistema immunitario della tiroide materna e quindi anche di quelle fetali.

Tali cellule attivate secernono citochine, che potrebbero determinare l'attivazione di cellule T materne auto-reattive in tiroide tramite un effetto *bystander* e iniziare e/o esacerbare la patologia tiroidea autoimmunitaria nel periodo post-gravidico (Ando T et al., 2002).

Alcuni risultati ottenuti su un modello murino di tiroidite autoimmune supportano l'ipotesi che le cellule fetali siano in grado di migrare alle aree di infiammazione senza tuttavia causare la malattia.

È stato inoltre utilizzato negli incroci un topo maschio transgenico per il gene reporter GFP, in modo da potere rilevare la presenza di cellule fetali nei tessuti materni.

Le cellule fetali fluorescenti sono state osservate solo in tiroide, dimostrando che tali cellule migrano alla ghiandola tiroidea infiammata e sono in grado di modulare le tiroiditi autoimmuni durante la gravidanza e nel periodo post-parto (Fig. 1.3).

Le cellule fetali murine sono state rilevate nel sangue materno non solo durante la gravidanza, ma anche nel periodo post-parto. La maggior parte sono state riscontrate nel sangue e solo una piccola frazione nella milza e nel midollo osseo.

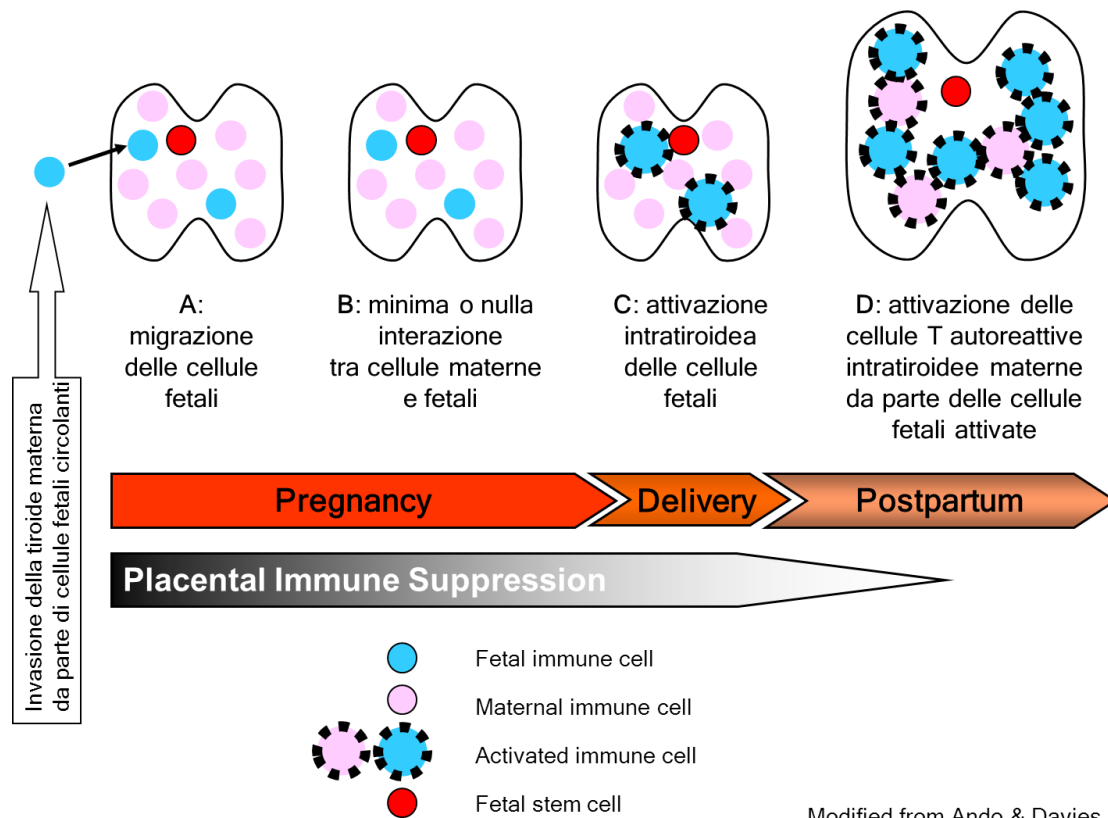
Ciò significa che in condizioni normali la maggior parte delle cellule fetali viene distrutta ed eliminata dal circolo.

È stata inoltre documentata la presenza di linee cellulari T fetali CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e dendritiche nella tiroide materna, in grado di influenzare la risposta immunitaria. Non è ancora noto il meccanismo tramite cui queste cellule fetali riescano a raggiungere la tiroide, anche se si pensa che siano coinvolte chemochine (Imaizumi M et al., 2002).

In conclusione, la tiroide mostra un'elevata frequenza di MCF se affetta da AITD e una più bassa frequenza in corso di patologie non autoimmunitarie (es. gozzo nodulare).

Tuttavia un'associazione tra presenza di microchimerismo e patologie autoimmunitarie è stata dimostrata solo per la SSc. Numerosi dati mostrano come un certo grado di cellule microchimeriche sia presente nel sangue, ma raramente nei tessuti di donne sane.

Potrebbe esserci quindi un'ipotesi alternativa per spiegare la presenza delle cellule microchimeriche nei tessuti e organi delle donne dopo la gravidanza (Khosrotehrani K et al., 2003).



**Figura 1.3** Meccanismo ipotetico tramite il quale le cellule fetali potrebbero modulare le AITD nel periodo post-parto. A) MCF si stabilisce durante la gravidanza tramite la soppressione immunitaria operata dalla placenta B) Durante la gravidanza le interazioni tra cellule fetali e materne è minima o nulla C) Immediatamente dopo il parto si ha ancora una parziale soppressione del sistema immunitario, che facilita la sopravvivenza delle cellule fetali e l'attivazione delle cellule fetali immunitarie in tiroide D) Le cellule fetali immunitarie attivate iniziano una GvHD contro gli antigeni materni, secernendo citochine e/o esprimendo molecole immuno-modulatorie, che attivano le cellule T materne auto-reattive in tiroide e iniziano e/o aggravano le AITD nel periodo post-parto.

## 1.3 MICROCHIMERISMO CELLULARE FETALE E PATOLOGIE NON AUTOIMMUNITARIE

### 1.3.1 Malattie tiroidee non autoimmunitarie

È stata evidenziata la presenza di microchimerismo cellulare fetale in patologie tiroidee di tipo non autoimmunitario (adenomi benigni, gozzi multinodulari tossici e carcinomi associati a tiroiditi di Hashimoto), ma non nella ghiandola tiroidea sana ottenuta all'autopsia di donne decedute per altre cause. Le cellule maschili microchimeriche erano presenti in numero variabile, sia in *cluster* che singolarmente, distribuite in modo casuale nelle sezioni analizzate e non erano concentrate in aree di infiltrazione linfocitaria o di neoplasia (Fugazzola et al., 2010).

Il più alto numero di cellule microchimeriche è stato osservato in una donna con gozzo multinodulare ed evidenza di tiroidite autoimmunitaria. Tali cellule facevano parte di follicoli tiroidei differenziati e indistinguibili dal resto della tiroide materna come mostrato in Fig. 1.4.

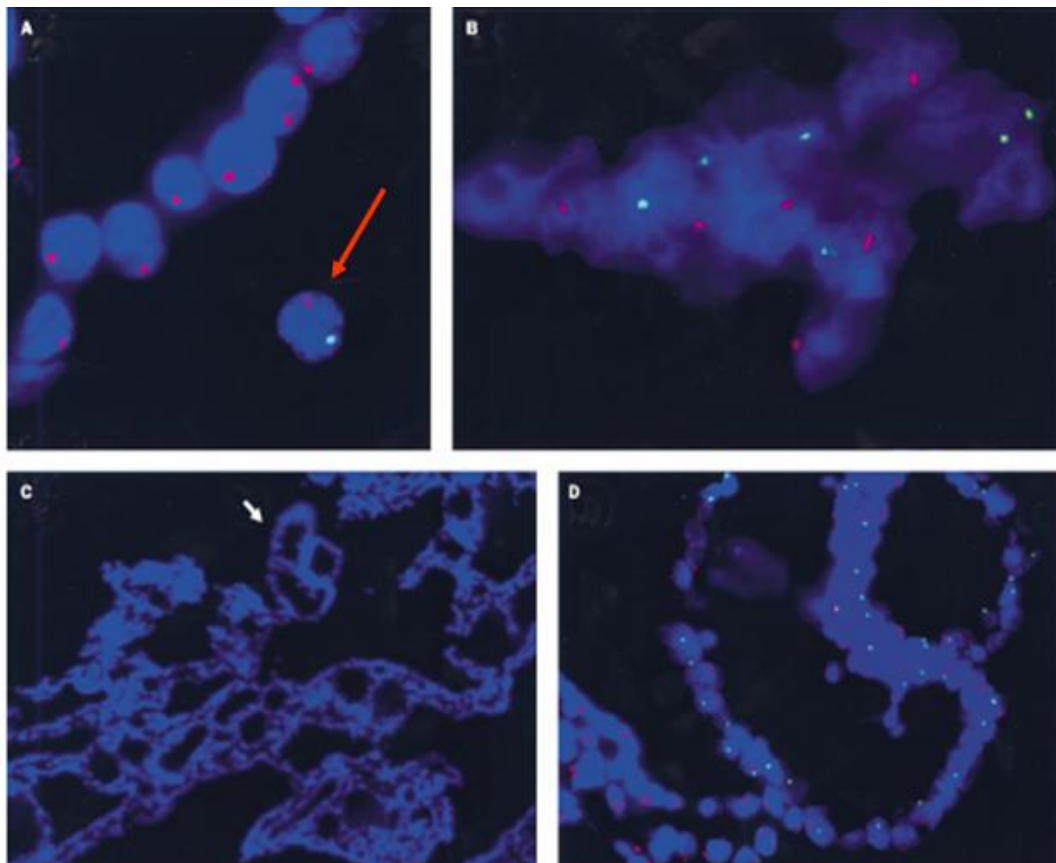
In questo studio, per la prima volta, è stato dimostrato che le cellule fetali microchimeriche possono assumere il fenotipo del tessuto ospite. È stato così ipotizzato che cellule staminali di origine fetale possono differenziarsi in cellule follicolari tiroidee in presenza di fattori ambientali e di sviluppo favorevoli nella madre.

Non è stata riscontrata alcuna correlazione significativa tra la presenza di microchimerismo e la diagnosi di malattia, la dimensione del gozzo o la funzione tiroidea al momento della diagnosi. L'analisi su un campione di sangue era risultata negativa, escludendo quindi la presenza di microchimerismo periferico o di mosaicismo dei cromosomi sessuali. La presenza di MCF sia in patologie nodulari benigne che



maligne della tiroide potrebbe essere dovuta a cambiamenti anatomici o all'espressione locale di fattori di crescita e processi di riparo associati alle tiroiditi autoimmunitarie (Srivatsa B et al., 2001).

Se l'accumulo di cellule microchimeriche in tiroide sia un evento secondario ad un minor grado di infiltrazione linfocitaria non è chiaro. Comunque è stato ritrovato un basso numero di cellule maschili anche nella tiroide di topi femmine normali durante la gravidanza mostrando quindi un basso livello di accumulo non specifico (Ando T et al., 2003).

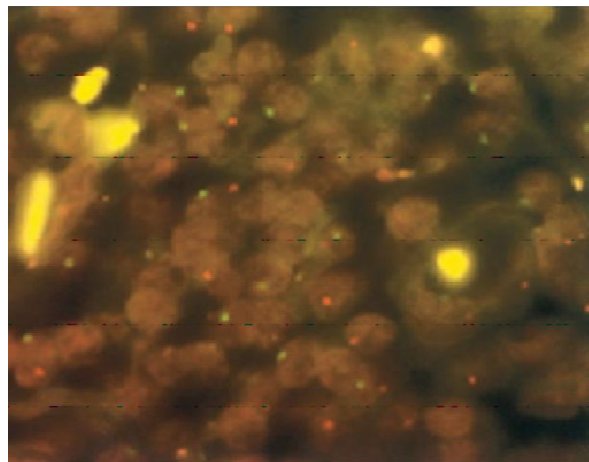


**Figura 1.4** Nuclei maschili evidenziati nel tessuto tiroideo. A) Cellula maschile singola con il cromosoma X in rosso e quello Y in verde (ingrandimento 1000X) B) Cluster di cellule maschili (ingrandimento 1000X) C) Sezione di un gozzo multinodulare con nuclei di cellule follicolari tiroidee. La freccia indica l'area con follicoli tiroidei maschili connessi al resto della tiroide D) Mostra la stessa sezione di C con i nuclei maschili ben visibili misti a quelli femminili (ingrandimento 400X).

### 1.3.2 Malattie epatiche non autoimmunitarie

Il microchimerismo fetale è stato inoltre descritto in diverse patologie del fegato non autoimmunitarie con una frequenza variabile dal 30 al 70% (epatite C virale, deficienza  $\alpha$ -antitripsina e altre) (Tanaka A et al., 1999).

Un elevato numero di cellule maschili microchimeriche è stato riscontrato nel fegato di una donna affetta da epatite C (circa 400 nuclei/cm<sup>2</sup> di tessuto) (Fig. 1.5). I risultati dell'analisi molecolare, condotta amplificando le sequenze polimorfiche STR, hanno suggerito che le cellule maschili riscontrate derivavano da una gravidanza interrotta 20 anni prima.



**Figura 1.5** Cellule maschili microchimeriche evidenziate tramite FISH nella biopsia epatica ottenuta da una donna affetta da epatite C virale. I nuclei maschili sono stati identificati dalla presenza del cromosoma X in rosso e quello Y in verde (ingrandimento 1000X).

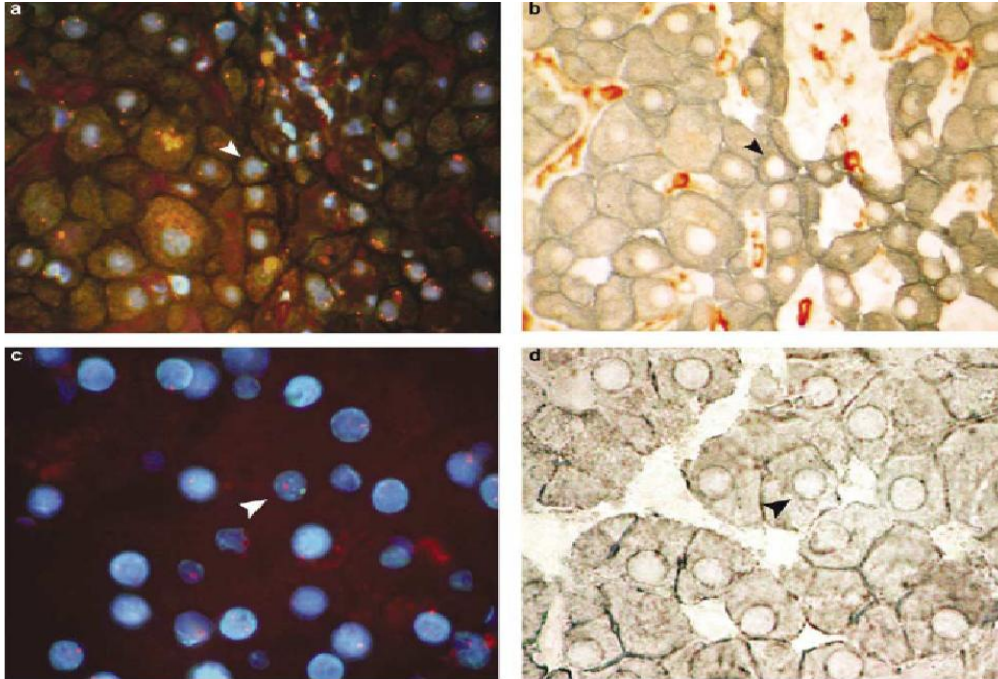
È stato ipotizzato che le cellule fetali siano in grado di attraversare la placenta, rimanere nel circolo o in qualche nicchia e migrare al fegato in seguito ad un insulto. Queste cellule microchimeriche erano indistinguibili dal punto di vista morfologico dagli epatociti materni, supportando quindi l'ipotesi che le cellule staminali fetali siano in grado di differenziarsi in cellule epatiche (Johnson et al., 2002).

È stato stabilito che il microchimerismo fetale è un evento frequente nel fegato di donne adulte (60% circa), sia gravide che non gravide, affette da patologie acute e croniche ma anche sane, così come nel tessuto epatico di bambine e di feti femmine. In questi ultimi due casi è possibile che ci sia stata una trasmissione trans-placentare di cellule fetali maschili pre-esistenti nella madre e acquisite durante una precedente gravidanza o addirittura durante la vita fetale della madre stessa.

Ad ogni modo il contributo delle cellule staminali fetali alla rigenerazione epatica sembrerebbe basso o nullo in patologie acute e croniche che si sviluppano al di fuori della gravidanza, mentre il periodo gestazionale sembrerebbe favorire il trans-differenziamento di queste cellule in epatociti. Infatti sono stati riscontrati epatociti di origine fetale solo nei feti o in donne in gravidanza con patologie epatiche acute (Guettier C et al., 2005).

Studi successivi hanno caratterizzato, dal punto di vista fenotipico, le cellule microchimeriche maschili presenti nel fegato di donne affette da diverse patologie (es. PBC, epatite C). Nessuna cellula maschile identificata esprimeva il marcatore CD45, mentre alcune esprimevano il marcatore epatico CAM 5.2 (25%) (Fig. 1.6).

È interessante notare che nessuna cellula maschile era stata ritrovata nell'epitelio dei dotti biliari o nelle aree di infiammazione in donne affette da PBC. Tuttavia la maggior parte delle cellule maschili identificate (60% circa) non esprimeva né CD45 o CAM 5.2 né fattori endoteliali e la loro morfologia non richiamava quella di epatociti o cellule ematopoietiche. È stato ipotizzato che queste cellule fossero cellule stellate (miofibroblasti specializzati) o un altro tipo cellulare non noto.



**Figura 1.6** Epatociti maschili di presunta origine fetale nel fegato di donne con figli maschi A) Microscopia a fluorescenza: la freccia indica un nucleo maschile con il cromosoma X in rosso e quello Y in verde presente nel fegato di una donna con PBC; B) Microscopia ottica: lo stesso nucleo in A positivo per CAM 5.2 (precipitato grigio). I precipitati marroni identificano cellule femminili esprimenti CD45; C) Microscopia a fluorescenza: la freccia indica un nucleo maschile presente nel fegato di un controllo; D) Microscopia ottica: lo stesso nucleo in C morfologicamente indistinguibile dagli epatociti femminili circostanti. (Ingrandimento 100X).

Oltre al fenomeno del trans-differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche in cellule somatiche, è possibile che avvenga anche la fusione tra cellule fetali ed epatociti, un fenomeno sottovalutato per la presenza di nuclei parziali nelle sezioni analizzate (Stevens AM et al., 2004).

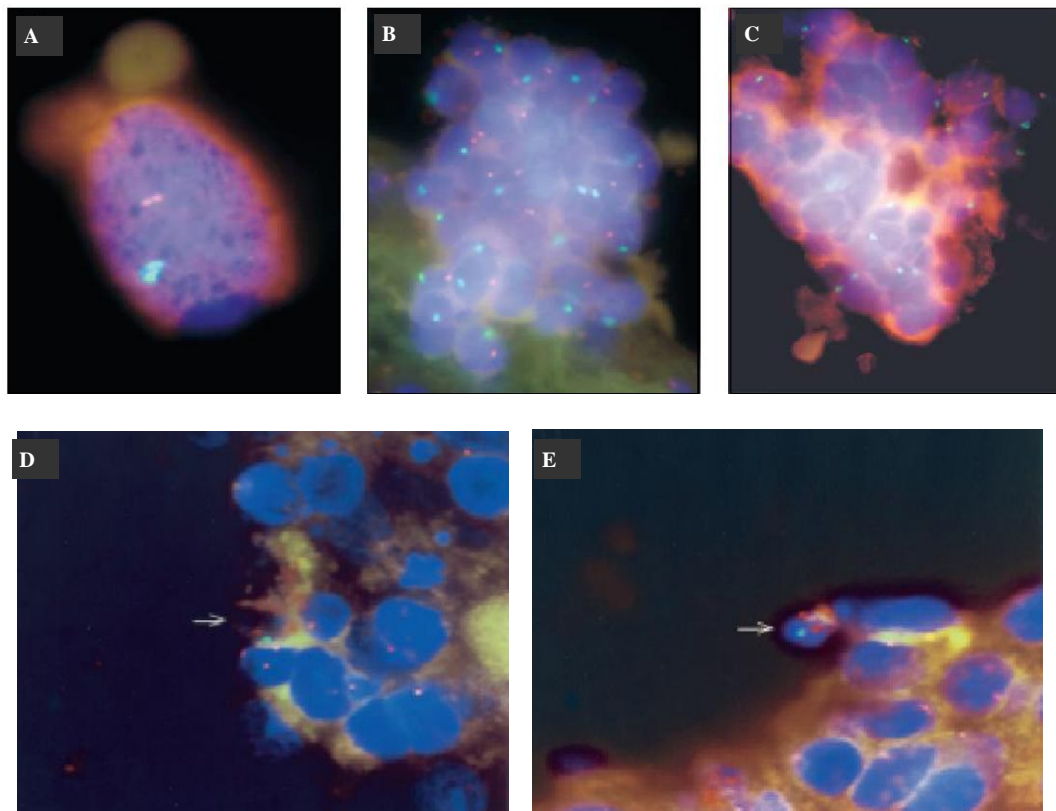
È stata riscontrata inoltre la presenza di microchimerismo materno nel tessuto epatico dei pazienti con atresia biliare postnatale, ipotizzando che la patologia sia dovuta a una relazione simil-GVH.

### 1.3.3 Carcinoma della cervice

L'unico tumore maligno in cui è stato studiato il MCF è il carcinoma della cervice. I risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza di cellule fetali maschili solo nelle

pazienti con carcinoma della cervice e non nei controlli, suggerendo che il MCF possa essere coinvolto nella patogenesi o nella progressione di questo tipo di tumore.

Gli studi di immunoFISH condotti al fine di determinare l'origine di queste cellule microchimeriche hanno dimostrato che il 44% di queste cellule esprimeva l'antigene leucocitario comune CD45 e il 24% le citocheratine come mostrato in Fig. 1.7.



**Figura 1.7** Espressione delle citocheratine e di CD45 in cellule microchimeriche maschili in tiroide A) Cellula maschile microchimerica con 1 cromosoma Y (verde) e 1 cromosoma X (rosso), positiva per la presenza di citocheratine nel citoplasma (rosso) (ingrandimento 1000X). B) Gruppo di cellule maschili microchimeriche negative per le citocheratine (ingrandimento 400X). C) Gruppo di cellule maschili microchimeriche positive per la presenza di citocheratine (ingrandimento 400X). D,E) Cellule maschili positive per la presenza dell'antigene CD45 sulla superficie cellulare (rosso) (ingrandimento 1000X).

È possibile quindi che precursori circolanti, probabilmente di origine fetale, siano in grado di migrare nello strato cellulare squamoso della cervice e di differenziarsi. La persistenza di tali cellule potrebbe avere un ruolo nella carcinogenesi, inducendo

un'alterazione del sistema immunitario nella donna. In alternativa, la loro presenza potrebbe essere il risultato di una soppressione del sistema immunitario. Tali cellule potrebbero inoltre rendere la cervice più suscettibile all'infezione da papilloma virus (HPV) o provvedere ad un giusto ambiente per la crescita tumorale (Sarkar et Miller FW, 2004).

Tuttavia non è da escludere che la presenza di tali cellule microchimeriche possa invece essere coinvolta in una risposta alla tumorigenesi, infatti i precursori fetali potrebbero essere in grado di differenziarsi per ripopolare o riparare il tessuto danneggiato (Cha D et al., 2003).

## 1.4 MICROCHIMERISMO CELLULARE MATERNO E PATOLOGIE AUTOIMMUNITARIE

Il microchimerismo cellulare materno (MCM) è stato apprezzato a partire dal 1960, quando la cariotipizzazione di bambini maschi ha evidenziato la presenza di mosaicismo dei cromosomi sessuali.

È stato osservato un passaggio di cellule materne nel circolo fetale in utero, oltre che nell'uomo, in tutte quelle specie con placentazione emocoriale, come ad esempio il topo. Infatti in questo modello animale le cellule microchimeriche materne sono state riscontrate in diversi tessuti, tra cui il timo, il fegato, i polmoni e il cuore.

Nell'uomo si osserva un passaggio di cellule materne nel circolo fetale a partire dalla 13<sup>a</sup> settimana di gestazione e possono persistere anche nell'età adulta. In alcuni casi è stato ipotizzato che il MCM possa indurre una risposta allo-immunitaria con inizio della malattia.

È stata riportata la persistenza di linfociti materni nel sangue di bambini con sindrome di immunodeficienza severa combinata, ma anche in bambini immunocompetenti (Maloney S et al., 1999; Srivatsa B et al., 2003).

Sono state riscontrate cellule materne, sia singole che in *cluster*, anche nel timo, nella tiroide, nel fegato e nella pelle ottenuti all'autopsia di neonati deceduti per diverse cause nella prima settimana di vita. Il più alto numero di cellule materne è stato riscontrato nel timo di un neonato con trisomia 21 e idrope fetale, confermando quindi l'osservazione di un incrementato traffico cellulare in gravidanze complicate da aneuploidie, dovuto a cambiamenti strutturali e idropici della placenta in caso di trisomia 21. È noto che bambini affetti da Sindrome di Down hanno una più alta incidenza di patologie

autoimmunitarie ed ematologiche rispetto alla popolazione generale. Per avere però conferma di questo dato bisognerebbe stabilire se il MCM sia presente anche in neonati sani (Srivatsa B et al., 2003).

Il microchimerismo cellulare materno è stato riscontrato anche nel compartimento linfoide e mieloide del sangue periferico in donne adulte sane, seppure a più bassa frequenza rispetto al microchimerismo cellulare fetale (25% linfociti T, 14% linfociti B, 16% monoliti/macrofagi, 28% cellule NK rispetto a 58% linfociti T, 75% linfociti B, 50% monoliti/macrofagi, 62% cellule NK) (Loubiere LS et al., 2006).

Le cellule materne e quelle fetali, come precedentemente accennato, sono semi-allogeniche e quindi potrebbero avere un ruolo nello sviluppo di patologie autoimmunitarie, agendo come effettori o target.

Sono state formulate due diverse ipotesi circa il ruolo del MCM nei bambini:

- cellule materne microchimeriche potrebbero indurre una reazione immunitaria contro diversi tessuti del bambino, con conseguente sviluppo di una patologia autoimmunitaria. Infatti è stata riscontrata la presenza di cellule materne nelle lesioni muscolari e cutanee, così come nel compartimento CD4+ del sangue periferico, di bambini affetti da dermatomiositi giovanili ed assenza in controlli sani (Arlett CM et al., 2000; Arlett CM et al., 2001). Inoltre anche pazienti adulti con SSc mostravano più frequentemente MCM in circolo (Maloney S et al., 1999);
- cellule staminali materne potrebbero migrare al tessuto danneggiato, acquisendo il fenotipo delle cellule che lo compongono, partecipando alla rigenerazione tissutale. Sono stati identificati infatti cardiomiociti di origine materna nel cuore di feti affetti da lupus neonatale con blocco cardiaco congenito (Stevens AM et al., 2003) e nel pancreas di soggetti con diabete di tipo 1 (Nelson JL et al., 2007).



Recentemente è stato ipotizzato che il MCM possa contribuire alla crescita e allo sviluppo dell'individuo, fornendo dei vantaggi educazionali (Rinkevich B., 2001).

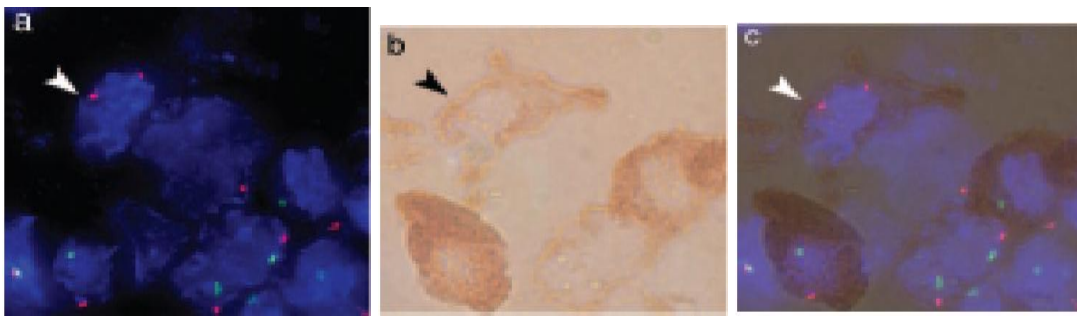
#### **1.4.1 Diabete mellito di tipo 1**

Il diabete di tipo 1 è una patologia autoimmune che colpisce principalmente i giovani. È stata riscontrata la presenza di geni HLA specifici materni nel DNA estratto dal sangue di soggetti maschi affetti da tale patologia. È stato inoltre dimostrato che livelli elevati di MCM erano presenti nei probandi rispetto ai fratelli non affetti e ai controlli sani. I risultati di ImmunoFISH, su sezioni di tessuto pancreatico, mostravano che circa l'1% delle cellule  $\beta$  erano di origine materna (Fig. 1.8), mentre pochissime cellule erano marcate per CD45 (0.07%). Inoltre recentemente è stata riscontrata una concentrazione di cellule microchimeriche materne maggiore in isole pancreatiche di soggetti maschili affetti da DM1 rispetto ai controlli (Van Zyl et al., 2010) senza correlazione con l'età o il periodo dalla diagnosi.

Sono state formulate diverse ipotesi:

- le cellule microchimeriche materne potrebbero agire da effettori della risposta autoimmunitaria, tuttavia pochissime cellule ematopoietiche di origine materna sono state riscontrate nel pancreas e quindi si esclude tale ipotesi;
- le cellule microchimeriche materne differenziate in modo tessuto-specifico potrebbero essere il target di una risposta immune ed effettivamente sono state identificate cellule  $\beta$  pancreatiche materne;
- infine il MCM potrebbe agire in modo benefico, collaborando ai processi di riparo tissutale. Le osservazioni erano più che altro a favore di questa ultima ipotesi, infatti l'elevato numero di cellule  $\beta$  pancreatiche materne riscontrate indicava un'attiva

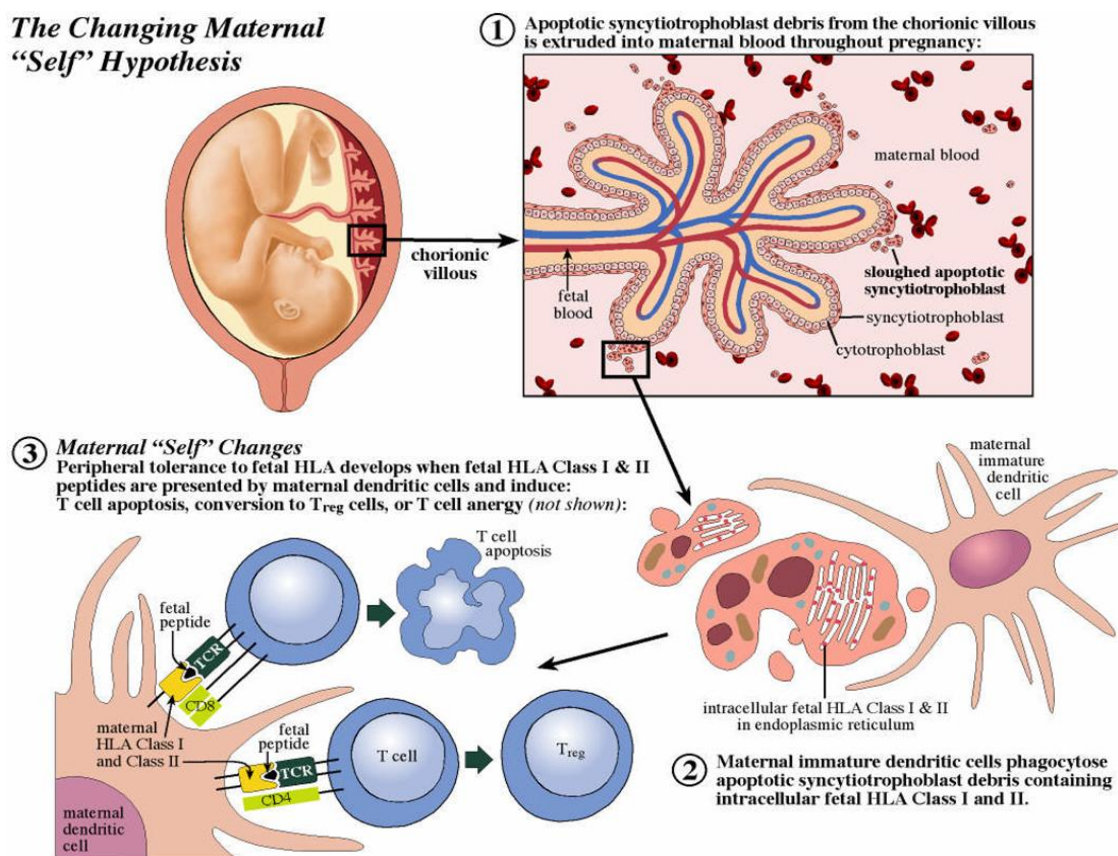
replicazione, probabilmente coinvolta nel tentativo di riparare i tessuti danneggiati. Inoltre non è mai stato riscontrato MCM ad alti livelli nei pazienti in cui l'analisi era stata condotta a breve distanza dal momento della diagnosi. Se le cellule  $\beta$  materne fossero il target della risposta immunitaria il loro numero dovrebbe essere molto più elevato all'esordio della malattia, mentre ciò non è stato osservato.



**Figura 1.8** Cellule femminili nel tessuto pancreatico di un soggetto maschile con diabete di tipo 1 A) Microscopia a fluorescenza: la freccia indica una cellula femminile con 2 cromosomi X in rosso in mezzo a nuclei maschili con il cromosoma X in rosso e quello Y in verde B) Microscopia ottica: la stessa cellula in A positiva per la presenza di insulina (marrone) C) Immagine A sovrapposta a quella B: mostra la stessa cellula identificata con la tecnica FISH e con l'immunohistochimica (ingrandimento 100 X).

Il MCM riscontrato in soggetti con diabete di tipo 1 non è riconducibile ad un arricchimento di particolari genotipi HLA, anche se tali soggetti sembrerebbero avere più frequentemente MCM in presenza dell'aplotipo DQB1\*0302-DRB\*04 (che si sa essere associato al diabete) trasmesso dal padre. Sono necessari ulteriori studi in merito (Nelson JL et al., 2007; Adams et al., 2007, Fig. 1.9).

## The Changing Maternal "Self" Hypothesis



**Figura 1.9.** Proposta di un nuovo meccanismo di tolleranza materna innescata dalle cellule fetali che potrebbe spiegare gli effetti benefici della gravidanza sull'artrite reumatoide (modified by Adams et al., 2007)

### 1.4.2 Malattie infiammatorie cutanee

La pitiriasi lichenoida (PL) è una patologia infiammatoria cutanea, che colpisce i bambini ed è mediata dai linfociti T.

È stata evidenziata la presenza di cellule materne nelle lesioni cutanee di bambini affetti da PL e da dermatiti, ma anche nella cute sana di controlli. Il numero di cellule microchimeriche era significativamente maggiore nei casi rispetto ai controlli.

La maggior parte delle cellule microchimeriche materne riscontrate nell'epidermide interfollicolare e follicolare erano differenziate in cheratinociti, in quanto positive per la

presenza di citocheratine citoplasmatiche. Al contrario, le poche cellule microchimeriche trovate nel derma non esprimevano questi antigeni.

Queste cellule potrebbero intervenire nei processi di riparo dei tessuti in seguito a danno o potrebbero avere un ruolo patogenetico. In questo ultimo caso è possibile che queste cellule si trovino normalmente nella cute sana, come dimostrato dalla loro presenza in soggetti sani, ma che siano in grado di iniziare una risposta infiammatoria in determinate condizioni, come mostrato dall'elevato numero di cellule riscontrate nei pazienti affetti da PL rispetto ai controlli.

È quindi evidente che in presenza di condizioni favorevoli le cellule microchimeriche materne possono adottare il fenotipo del tessuto neuroectodermico e mesodermico del bambino (Khosrotehrani K et al., 2006).

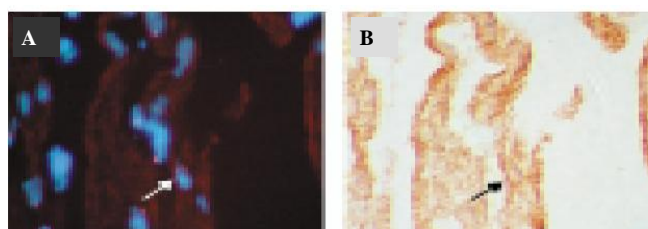
### **1.4.3 Lupus neonatale con blocco cardiaco congenito**

Il lupus neonatale è un disordine autoimmune acquisito in utero, le cui caratteristiche peculiari includono un blocco cardiaco congenito, miocardite, rash, epatite, trombocitopenia e neutropenia. È associato alla presenza di specifici anticorpi anti-Ro e anti-La di origine materna.

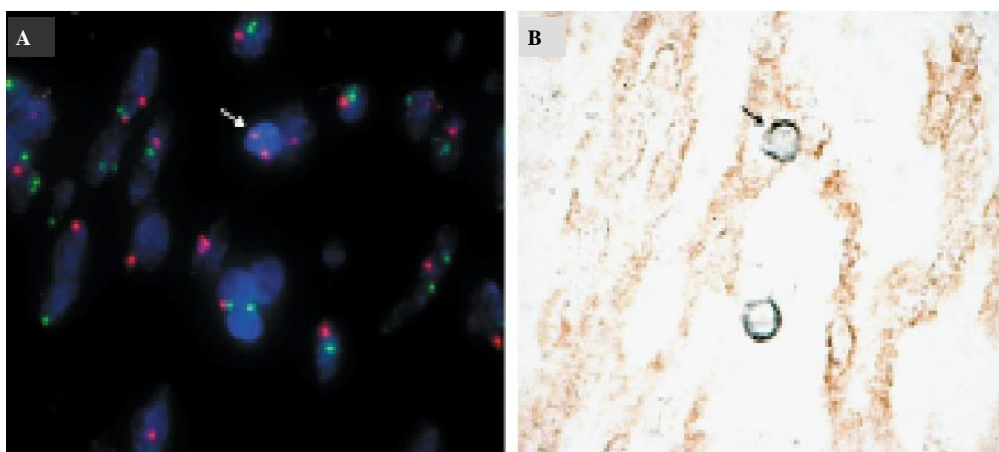
Numerose cellule materne sono state identificate negli organi coinvolti in questa sindrome: nel miocardio, incluso il nodo atrio-ventricolare, nel fegato e nella cute. Tuttavia alcune cellule microchimeriche sono state riscontrate anche nei controlli, ossia neonati morti per cause non autoimmunitarie.

La maggior parte delle cellule materne evidenziate nel cuore esprimeva uno specifico marker dei cardiomiociti, la  $\alpha$ -actina sarcomerica (Fig. 1.10), e solo una piccola parte esprimeva l'antigene leucocitario comune CD45 (Fig. 1.11). Circa il 20% delle cellule

microchimeriche non esprimeva né l' $\alpha$ -actina sarcomerica né l'antigene CD45; è possibile che tali cellule siano precursori di miociti o cellule endoteliali o ancora fibroblasti.



**Figura 1.10** Cellula miocardica materna nel tessuto cardiaco di un neonato affetto da lupus neonatale esprime l' $\alpha$ -actina sarcomerica A) Microscopia a fluorescenza: la freccia indica una cellula materna con i 2 cromosomi X in rosso B) Microscopia ottica: mostra la stessa cellula di A positiva per la presenza della  $\alpha$ -actina sarcomerica citoplasmatica (marrone).



**Figura 1.11** Cellula ematopoietica materna nel tessuto cardiaco di un neonato affetto da lupus neonatale esprime CD45. A) Microscopia a fluorescenza: cellula materna con i 2 cromosomi X in rosso. B) Microscopia ottica: mostra la stessa cellula di A positiva per la presenza di CD45 sulla superficie cellulare (grigio).

Oltre al tessuto miocardico, al fegato e alla cute, le cellule microchimeriche sono state evidenziate anche in organi non target, quali la milza, il pancreas e il timo.

La presenza di cellule e di DNA di origine materna era stata descritta, precedentemente, nel sangue del cordone ombelicale e nel circolo fetale di soggetti sani e sembrerebbe quindi un evento normale. Tuttavia l'elevato numero di cellule riscontrate nel miocardio

dei neonati di questo studio potrebbe essere dovuto ad un reclutamento e/o ad un'amplificazione cellulare nel miocardio e in altri tessuti in condizioni patologiche.

È possibile che le cellule microchimeriche materne, essendo differenziate in cardiomiociti, diventino un *target* di risposta immune. In alternativa, queste cellule microchimeriche potrebbero essere reclutate in seguito ad un processo patogenetico ed intervenire nella rigenerazione del muscolo cardiaco danneggiato.

È inoltre possibile che le cellule materne riscontrate non siano in realtà miociti veri e propri, ma piuttosto cellule ematopoietiche materne fuse con miociti fetali (Stevens AM et al., 2003).

#### **1.4.4 Sclerosi sistemica (SSc) e lupus eritematoso sistemico (SLE)**

È stata dimostrata la persistenza di microchimerismo cellulare materno nel sangue periferico di pazienti con SSc, ma anche in controlli sani. Per quanto riguarda il lupus eritematoso, il MCM è stato proposto come spiegazione dello sviluppo di SLE in una paziente che aveva ricevuto una trasfusione in utero (Maloney S et al., 1999).

#### **1.4.5 Miopatie infiammatorie giovanili**

Le miopatie infiammatorie giovanili sono un gruppo eterogeneo di malattie sistemiche del tessuto connettivo, che includono le dermatomiositi e le polimiositi.

La presenza di MCM è stata investigata in queste patologie tramite l'utilizzo di diverse metodiche e i risultati sono concordi nell'affermare che cellule microchimeriche materne erano presenti più frequentemente nei pazienti con malattia rispetto a controlli sani sia nel sangue che nei tessuti (Arlett CM et al., 2000; Arlett CM et al., 2001).

## 1.5 MECCANISMI DEL MICROCHIMERISMO NELL'ORGANISMO

Come accennato le cellule microchimeriche possono essere coinvolte sia in una risposta infiammatoria con conseguente danno tissutale sia in processi di riparo dei tessuti, probabilmente in base allo stato immunologico e di salute complessivo dell'individuo (Sarkar K et al., 2004).

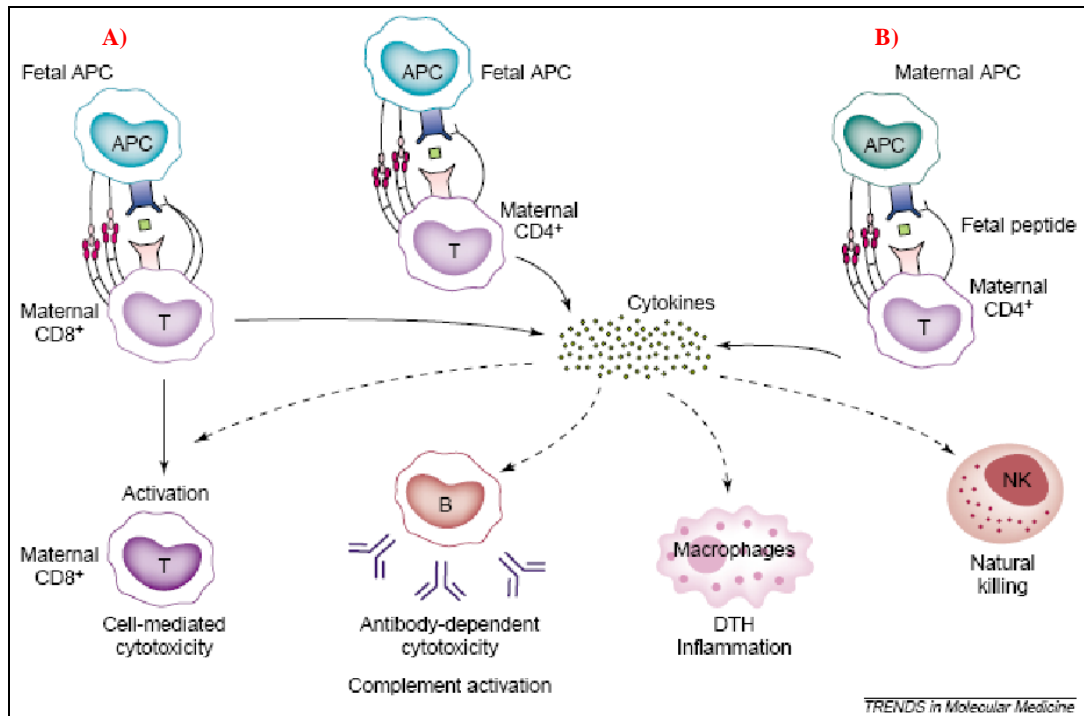
### 1.5.1 Coinvolgimento del microchimerismo nello sviluppo di patologie

È noto che la cGvHD è causata dalle cellule T del donatore che, non essendo aggredite, ma tollerate dall'ospite, danneggiano il timo tramite una reazione acuta con conseguente self-reattività dei linfociti T maturi dell'ospite e cambio del profilo delle citochine da Th1 a Th2.

Tuttavia sussiste una differenza quantitativa di chimerismo le patologie immunitarie prese in studio e la cGvHD. Ad esempio, nella SSc il rapporto tra cellule non-host ed host è stimato essere meno di 1/1000000 globuli bianchi o 1/500000 linfociti. Questo dato è in forte contrasto con la cGvHD che si sviluppa in seguito a trapianto di midollo osseo, perché in questo caso le cellule del donatore vanno a rimpiazzare totalmente quelle circolanti dell'ospite.

Invece un piccolo numero di cellule non-host potrebbe avere un effetto devastante se causasse una de-regolazione delle cellule host, con conseguente danno ad opera delle cellule ospite divenute auto-reattive, e/o inducendo uno shift nel repertorio delle citochine.

Per quanto riguarda il MCF, è stato proposto che la presentazione di peptidi fetali possa avvenire tramite un pathway indiretto o uno diretto (Fig. 1.12).



**Figura 1.12** Meccanismi tramite cui il microchimerismo potrebbe contribuire alla patogenesi di patologie autoimmunitarie. A) Pathway diretto B) Pathway indiretto.

Nel primo caso la presentazione dell'antigene fetale alle cellule CD4<sup>+</sup> self avviene ad opera delle APC materne; in questo modo si otterrebbe un effetto amplificato a partire da un basso livello di microchimerismo. Invece nel pathway diretto le cellule CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> dell'ospite riconoscono molecole HLA intatte col peptide sulla superficie di APC fetali (Nelson JL, 2002).

Tuttavia l'osservazione del microchimerismo nei tessuti patologici affetti e nel circolo potrebbe essere interpretato come un evento secondario al processo patogenico.

### 1.5.2 Coinvolgimento del microchimerismo nei processi di riparo tissutale

Durante la gravidanza le cellule fetali che entrano nel circolo materno sono prevalentemente di origine ematopoietica, ad esempio globuli rossi, linfociti, trofoblasti,



cellule staminali ematopoietiche (HSC), ma anche cellule staminali mesenchimali (MSC).

Le HSC sono in grado di impiantarsi e di differenziarsi lungo la linea ematopoietica, infatti cellule fetali maschili sono state riscontrate anche nel compartimento delle cellule CD34<sup>+</sup> e nella popolazione delle cellule mononucleari periferiche del sangue (cellule T e B, NK). Anche esperimenti di colture a lungo termine hanno dimostrato che progenitori ematopoietici fetali vengono trasferiti nel circolo materno durante la gravidanza (Osada H et al., 2001).

Poche informazioni si hanno invece circa il fenotipo delle cellule fetali microchimeriche in tessuti non ematopoietici; si pensa che ci siano progenitori cellulari associati alla gravidanza (PAPCs) in grado di differenziarsi nei tessuti materni affetti, ma la loro origine rimane tuttora ignota (potrebbero essere HSC o MSC o un nuovo tipo di cellule staminali). È possibile che tali cellule PAPCs persistano in nicchie di cellule staminali materne (ad es. midollo osseo) e che in caso di insulto, siano in grado di migrare al tessuto coinvolto e di differenziarsi. (Khosrotehrani K et al., 2005).

Ci sono ormai forti evidenze che mostrano come la presenza di cellule microchimeriche non sia solo associata a patologie autoimmunitarie, ma anche a patologie non autoimmuni con un probabile effetto protettivo.

La SSc è stata la prima patologia ad essere stata associata al microchimerismo e alcuni autori hanno quindi voluto studiare l'influenza della gravidanza sulla gravità di questa malattia. Ci si aspettava che donne multipare avessero un alto rischio di sviluppare la patologia in forma grave. Invece è stato dimostrato che donne nullipare avevano un esordio di malattia più precoce, con coinvolgimento polmonare seguito da decesso, rispetto alle donne con uno o più figli. Questi risultati supportano quindi l'ipotesi di un

effetto protettivo a lungo termine della gravidanza, e quindi delle cellule microchimeriche, nel corso di SSc (Arlett CM et al., 2002).

È stato ipotizzato che le cellule microchimeriche siano in grado di intervenire nei processi di riparo dei tessuti danneggiati (Khosrotehrani K et al., 2003).

Altri studi confermano questa ipotesi: in una donna affetta da gozzo multinodulare è stato dimostrato che cellule maschili, di presunta origine fetale, sono in grado di differenziarsi in tireociti formando un follicolo (Fig. 1.13). Questo dato dimostra come tra le cellule microchimeriche che entrano nel circolo materno siano presenti anche cellule staminali in grado di differenziarsi in base al fenotipo del tessuto ospite.

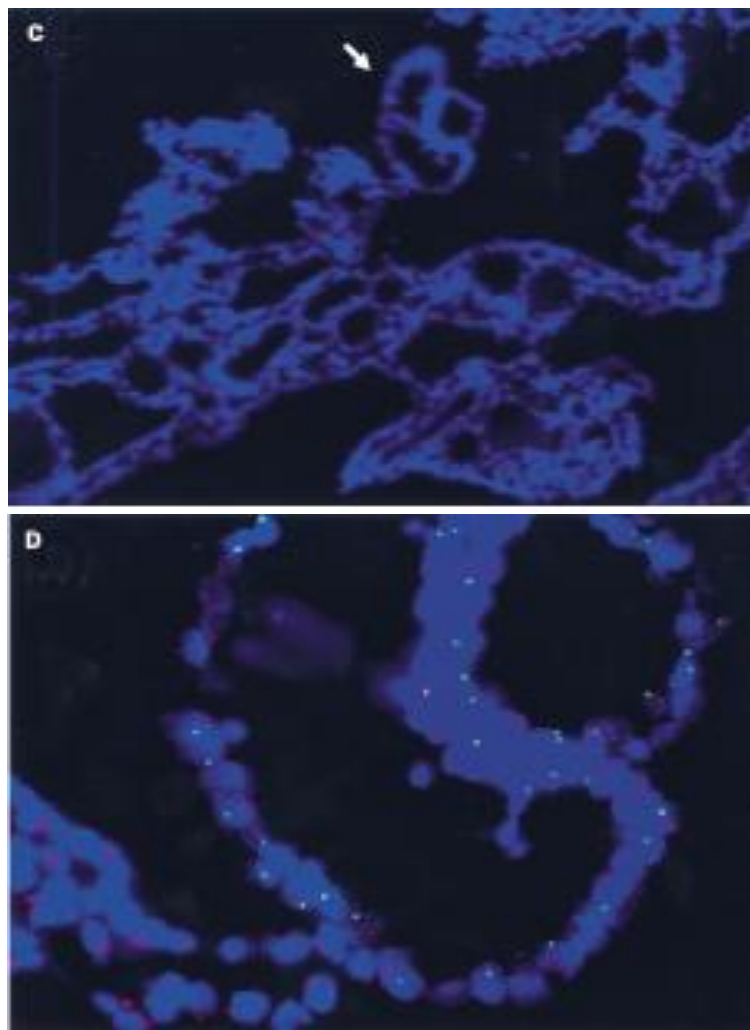
In un altro studio sono state riscontrate numerose cellule maschili nella biopsia epatica di una donna affetta da epatite C. Queste cellule, identificate tramite FISH, erano indistinguibili morfologicamente dagli epatociti. Ulteriori studi, basati sull'analisi dei polimorfismi sia nelle cellule maschili che in quelle femminili riscontrate nel fegato, hanno dimostrato che le cellule microchimeriche derivavano da un feto abortito più di 20 anni prima dell'esecuzione della biopsia (Johnson KL et al., 2002 ). Infine un recente modello murino di diabete mellito tipo 1 suggerisce l'idea che le cellule microchimeriche giochino un ruolo fondamentale nel riparo tissutale.

Quindi è possibile che le cellule staminali microchimeriche si accumulino nei tessuti danneggiati, espandendosi e differenziandosi in modo specifico, anche se non è ancora stato chiarito se tali cellule abbiano un qualche vantaggio sulle staminali materne.

In conclusione, diversi lavori hanno dimostrato che cellule microchimeriche maschili, riscontrate in vari tessuti materni, esprimono markers epiteliali, leucocitari ed epatici.

Il fenotipo e la morfologia delle cellule fetali non ematopoietiche potrebbero risultare da diversi meccanismi: i progenitori fetali potrebbero trans-differenziare in cellule

ematopoietiche, epatiche o epiteliali o potrebbero adottare il fenotipo del tessuto ospite fondendosi con epatociti o cellule epiteliali, anche se questo evento non è stato chiaramente dimostrato (Khosrotehrani K et al., 2004).



**Figura 1.13** cellule fetali maschili differenziate in follicoli strettamente associati ed indistinguibili dalle cellule follicolari dell'ospite (da Srivatsa et al., 2001).

### 1.5.3 Microchimerismo e trapianto d'organo

Studi di trapianto d'organo condotti sui topi hanno dimostrato che i leucociti chimerici svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo e nel mantenimento della tolleranza all'organo trapiantato.

È stato infatti ipotizzato che i leucociti microchimerici in circolo rappresentano una continua fonte di antigeni e allo stesso tempo, possedendo una capacità immunologica, introducono complessi meccanismi di induzione di tolleranza periferica. Ad avvalorare questa tesi c'è il riscontro frequente di questo tipo di cellule dopo un trapianto di fegato e cuore.

In particolare nei primi giorni successivi al trapianto d'organo i leucociti circolanti derivanti dall'organo rappresentano il 1-20% delle cellule mononucleate dell'ospite. Il numero di leucociti circolanti dipende dall'organo che è stato trapiantato: il numero più elevato nel caso di intestino e fegato e il numero minore nel caso di cuore e rene.

Durante le settimane successive avviene uno scambio tra leucociti del donatore e leucociti del ricevente: i leucociti del donatore migrano negli organi linfoidi del ricevente e vengono riscontrati successivamente anche in altri tessuti non linfoidi. È stato ipotizzato che i linfociti presenti nei tessuti linfoidi periferici e non quelli nel circolo periferico siano associati con la tolleranza acquisita. I leucociti del ricevente migrano invece nell'organo trapiantato.

Il reciproco effetto delle popolazioni cellulari del donatore e del ricevente spiegherebbe la rarità della GVHD nei riceventi di fegato e intestino.

Cellule microchimeriche sono state riscontrate fino a 30 anni dopo il trapianto a livello tissutale e in circolo nei soggetti trapiantati di rene, fegato e altri organi (Starzl T E et al., 1992; Starzl T E et al., 1993)

#### **1.5.4 Microchimerismo e trasfusioni**

Varie linee cellulari maschili (CD4, CD8, CD15, CD19) sono state riscontrate nel sangue di donne riceventi trasfusioni, anche dopo 18 mesi dall'evento. Questo riscontro

potrebbe essere causato dall'azione delle cellule staminali del soggetto donatore e dalla reciproca tolleranza immunologica tra leucociti del ricevente e del donatore.

È stato dimostrato che le trasfusioni rappresentano un beneficio nella stabilizzazione di un organo trapiantato. Il ruolo principale della trasfusione è quello di immunizzare il paziente verosimilmente attraverso vari meccanismi fra cui la delezione clonale, l'anergia clonale e la soppressione specifica.

Tuttavia GVHD può essere associata con le trasfusioni in alcuni riceventi. L'incompetenza immunologica del ricevente verso i linfociti del donatore durante la trasfusione potrebbe essere dovuta a una tolleranza creata già in utero (Matsushita H et al., 1988; Tanei R et al., 1997; Ohto H and Anderson KC, 1996).

## **SCOPO DELLA RICERCA**

Il carcinoma papillare della tiroide risulta essere da due a quattro volte più frequente nel sesso femminile rispetto a quello maschile (F:M = 4:1), ma le ragioni alla base di tale differenza non sono note ad oggi. Al fine di valutare se l' aumentata prevalenza nel sesso femminile potesse essere correlata alla gravidanza, sono stati valutati l'eventuale presenza e il ruolo del microchimerismo cellulare fetale nel carcinoma papillare della tiroide (PTC).

Per far questo abbiamo inizialmente analizzato tessuti sani e tessuti neoplastici di pazienti affette da PTC con precedente gravidanza maschile. Successivamente per estendere a livello del sangue periferico la nostra conoscenza sul FMC nel carcinoma della tiroide, abbiamo analizzato un gruppo di pazienti con gravidanza maschile affette da carcinoma della tiroide e un gruppo di controlli sani. Inoltre per confrontare lo stato di microchimerismo nel sangue e nei tumori, i tessuti neoplastici di numerose donne sono stati analizzati tramite analisi con PCR e FISH.

## **CAPITOLO 2**

# **MATERIALI E METODI**

## 2.1 STUDIO EFFETTUATO SU TESSUTI NEOPLASTICI E TESSUTI SANI

Per effettuare questo studio è stato estratto il DNA somatico dal tessuto tumorale di 62 donne affette da carcinoma papillare della tiroide (PTC), di cui 48 tessuti congelati (immediatamente congelati a -80°C dopo l'intervento chirurgico) e 14 tessuti inclusi in paraffina (Cirello et al., 2008). Queste donne sono state a loro volta suddivise in 2 gruppi:

- 1) Gruppo 1(casi): comprendente 41 donne con PTC e almeno un figlio maschio avuto precedentemente alla diagnosi di tumore. Nessuna di queste donne ha mai ricevuto una trasfusione di sangue o un trapianto d'organo.
- 2) Gruppo 2 (controlli negativi): costituito da 21 donne affette da PTC di cui 17 nullipare e 4 che hanno avuto solo figlie femmine. In tutti i casi l'anamnesi è risultata negativa per aborti, trasfusioni di sangue o trapianti d'organo.

È stato possibile estrarre il DNA anche dal tessuto controlaterale sano rispetto al tumore di 7 donne e dal sangue intero di 6 donne appartenenti al gruppo 1.

Come controlli positivi per questo studio, quindi soggetti esprimenti il gene SRY, sono stati utilizzati 11 maschi ed in particolare è stato estratto il DNA somatico da 10 tessuti patologici congelati e quello genomico da 1 campione di sangue intero.

Il DNA somatico è stato estratto da tessuto congelato seguendo il protocollo fornito dal kit utilizzato (Puregene™, DNA isolation tissue kit, Gentra Systems). Mentre per l'estrazione di DNA da tessuto incluso in paraffina sono state ricavate fettine di tessuto incluso in un blocchetto di paraffina tramite taglio al microtomo (5 µm di spessore) ed il



DNA è stato estratto seguendo le istruzioni fornite dal kit per i tessuti congelati (Puregene™, DNA isolation tissue kit, Gentra Systems).

Infine il DNA genomico è stato estratto da sangue intero in EDTA, secondo le istruzioni fornite dal kit utilizzato (Nucleon extraction and purification protocols, Amersham Biosciences).

Per identificare la presenza di cellule fetali maschili tramite amplificazione del gene SRY (*Sex-determining Region on Y chromosome*), che mappa sul braccio corto del cromosoma Y è stato eseguito un saggio di PCR-ELISA.

Questo sistema ha un'elevata sensibilità (circa 100 volte più sensibile nel rilevare i prodotti di PCR dell'elettroforesi su gel d'agarosio colorato con Etidio Bromuro) ed è quindi adatto a rilevare amplificati di DNA a partire da un ridotto numero di cellule. Mostra inoltre un'elevata specificità, infatti è in grado di rilevare in modo selettivo i prodotti di PCR tramite una *capture probe* complementare ad una sequenza interna al prodotto di PCR. Questa tecnica consiste in due fasi:

- 1) amplificazione della sequenza target posta al 5' UTR del gene SRY tramite PCR in modo tale da ottenere un amplificato marcato con digoxigenina (DIG);
- 2) rilevamento del prodotto di PCR tramite saggio ELISA

Successivamente per confermare i risultati ottenuti con il saggio di PCR-ELISA è stata eseguita un'analisi FISH su sezioni di tessuto tiroideo incluso in paraffina di 5 µm di spessore.

In particolare al fine di identificare e caratterizzare le cellule fetali maschili riscontrate nella tiroide delle donne affette da PTC, è stata messa a punto una metodica che combina la tecnica FISH con quella di immunohistochimica (Khosrotehrani K, 2003).

Le sezioni di tessuto sono state sottoposte ad una doppia immunocolorazione con anticorpi anti-CD45 (anticorpo monoclonale di topo, Dako) e anti-Tg (anticorpo policlonale di coniglio, Biogenex Laboratories Inc.) al fine di determinare se le cellule fetali maschili riscontrate fossero di origine ematopoietica o cellule differenziate in tireociti.

Per avere un controllo negativo della reazione, il protocollo è stato eseguito escludendo l'incubazione con i 2 anticorpi primari. In questo caso nessun segnale è stato rilevato nei vetrini analizzati. Il segnale ottenuto per CD45 è servito invece come controllo interno della reazione, mostrando come i nuclei maschili positivi per Tg non fossero in realtà cellule ematopoietiche sovrapposte a quelle follicolari e viceversa.

Di seguito le stesse sezioni sono state sottoposte ad incubazione con le sonde specifiche per i cromosomi X e Y e contro-colorate con DAPI. I nuclei sono stati osservati con un microscopio ad epifluorescenza tramite l'utilizzo di filtri a singola banda, come descritto precedentemente.

La formazione di un precipitato marrone sulla superficie cellulare, visibile in trasmissione, indicava la presenza dell'antigene leucocitario comune CD45. Al contrario la formazione di un precipitato rosso era indicativo della presenza di Tg nel citoplasma dei tireociti, visibile anche come fluorescenza rossa se osservato con il filtro rosso specifico a singola banda.

## 2.2 STUDIO EFFETTUATO SU SANGUE PERIFERICO DI PAZIENTI AFFETTE DA PTC E DI CONTROLLI SANI

Per estendere le conoscenze del FMC anche a livello del sangue periferico sono state arruolate altre 106 donne con una gravidanza maschile in anamnesi (Cirello et al., 2010) e in particolare:

- 1) un gruppo costituito da 57 pazienti affette da PTC con almeno una gravidanza maschile prima della diagnosi di carcinoma della tiroide (Gruppo “pazienti”; età media 54 aa, range 37-77)
- 2) un gruppo composto da 49 donne sane (non affette da alcuna malattia neoplastica e/o autoimmune nota) con almeno una gravidanza maschile in anamnesi (Gruppo “controlli”; età media: 46 aa; range 29-60). Inoltre nessuno dei soggetti appartenenti a questo gruppo era affetto da malattie tiroidee (quadro ecografico e funzione tiroidea nella norma; negatività autoanticorpale)

Anche in questo caso nessun soggetto incluso nello studio presentava in anamnesi altri eventi potenzialmente fonte di microchimerismo (es. trasfusione sanguigna, trapianto d'organo, fratello gemello o aborto).

Sono stati ricercati markers genetici maschili specifici in donne con precedente gravidanza maschile. Per far questo dai campioni di sangue periferico sono state isolate cellule mononucleari circolanti (PBMC) usando un kit specifico (Lymphoprep kit, AXIS-SHIELD). È stata effettuata una conta cellulare utilizzando una camera specifica (Bright-Line Hemacytometer, SIGMA-ALDER-ICH CHEMIE GmbH).

La quantità media totale di PBMCs/ml risultava simile per i due gruppi,  $5.1 \times 10^6$  e  $4.9 \times 10^6$  rispettivamente. Successivamente il DNA genomico è stato estratto dalle PBMC utilizzando il metodo Illustra (Nucleon Bacc, GE Healthcare).

Per quanto riguarda l'estrazione di DNA da tessuti neoplastici è stata seguita la stessa tecnica utilizzata per lo studio precedente (Puregene™, DNA isolation tissue kit, Gentra Systems). In particolare sono stati analizzati i tessuti di 19 donne appartenenti al gruppo pazienti.

Anche per la ricerca del cromosoma Y tramite amplificazione del gene SRY (*Sex-determining Region on Y chromosome*) è stato eseguito sempre un saggio di PCR-ELISA e per confermare tali dati è stata eseguita anche in questo studio un'analisi FISH nelle pazienti risultate positive all'amplificazione SRY-PCR.

## 2.3 SCORING E ANALISI STATISTICA

Le sezioni di tiroide ottenute dalle pazienti affette da PTC sono state analizzate in cieco per la ricerca di cellule maschili di presunta origine fetale. L'analisi è stata condotta solo in presenza di una minima perdita di cellule in seguito alla procedura di ibridazione e se oltre il 70% dei nuclei mostrava almeno un segnale FISH. Per potere effettuare un conteggio dei nuclei maschili, era richiesta la presenza di 1 cromosoma X (verde) e di 1 cromosoma Y (rosso) all'interno di un nucleo (blu) con i bordi ben definiti.

La possibile correlazione tra il numero di cellule maschili microchimeriche riscontrate e il tipo di tessuto tiroideo analizzato (tumorale o controlaterale sano) è stata stabilita tramite l'utilizzo del test esatto di Fisher nei singoli casi e tramite il test  $\chi^2$  in totale.

La possibile correlazione tra la percentuale di cellule maschili microchimeriche identificate nell'intero tessuto patologico o normale e il fenotipo osservato (positività per Tg, positività per CD45 o negatività per entrambi gli antigeni) è stata studiata utilizzando il test esatto di Fisher nei singoli casi e tramite il test  $\chi^2$  in totale.

Le differenze tra 2 valori erano considerate statisticamente significative se la probabilità  $p < 0.05$ .

Nello studio su sangue periferico per riscontrare possibili differenze tra i due gruppi in oggetto è stata condotta un'analisi tramite *t*-test e Chi-square. Sono stati considerati Odds ratio con un intervallo di confidenza del 95% per valutare l'associazione tra la presenza di MCF e la presenza di PTC nelle pazienti e nel gruppo controllo.

Inoltre è stata eseguita un'analisi di regressione logistica per ridurre al minimo il bias dovuto a fattori confondenti quali l'età alla prima gravidanza maschile, il numero di figli e il periodo tra la nascita del primo figlio maschio e la diagnosi/reclutamento.

Modelli di regressione logistica sono stati utilizzati per valutare una possibile associazione tra numerose caratteristiche cliniche e il MCF all'interno del gruppo pazienti. Le differenze tra i valori erano considerate statisticamente significative se la probabilità  $p < 0.05$ . Le analisi sono state condotte utilizzando il software statistico SPSS 13.0.

## **CAPITOLO 3**

# **RISULTATI**

### 3.1 RISULTATI PRELIMINARI DALL'ANALISI EFFETTUATA SU TESSUTI NEOPLASTICI E TESSUTI SANI APPARTENENTI A PAZIENTI AFFETTE DA PTC CON O SENZA GRAVIDANZE MASCHILI

Gli studi preliminari condotti su pazienti affette da PTC con gravidanze maschili o no tramite saggio di PCR-ELISA hanno evidenziato la presenza della sequenza maschile SRY nel tessuto patologico di 7/41 (17%) donne con PTC, che avevano avuto almeno un figlio maschio precedentemente alla diagnosi di tumore; nei 7 tumori positivi per MCF non è stata riscontrata alcuna associazione con lo stadio o l'outcome della malattia (classificazione TNM), né con la presenza di tiroidite associata. È interessante notare come queste cellule fetali microchimeriche si stabiliscano in tiroide poco tempo dopo il parto di un figlio maschio e come in alcune di questi pazienti tali cellule persistano addirittura 30-40 anni dopo la gravidanza, in accordo con i dati riportati in letteratura (Tabella 3.1).

Al contrario, il MCF è risultato essere assente nel tessuto tumorale di tutte le donne (0/21) appartenenti al gruppo di controllo.

La presenza di bassi livelli di MCF è stata riscontrata nel tessuto controlaterale sano di 3/7 donne appartenenti al gruppo di pazienti con PTC, che avevano avuto almeno un figlio maschio precedentemente alla diagnosi di tumore; mentre il MCF è risultato essere assente in tutti i campioni di sangue analizzati.



#	Età alla diagnosi	Anni dal parto dell'ultimo figlio maschio	pTNM	Malattie benigne associate	Outcome
1	65	35	pT1mN0	gozzo non tossico	remissione
2	69	40	pT3N0	nessuna	remissione
3	42	13	pT1mN0	resistenza agli ormoni tiroidei	remissione
4	49	30	pT1mN0	gozzo non tossico	remissione
5	68	42	pT3mN1b	gozzo non tossico	remissione
6	41	7	pT2N0	nessuna	remissione
7	34	2	pT3mN1b	nessuna	persistenza

**Tabella 3.1** Caratteristiche cliniche delle pazienti risultate positive per la presenza di microchimerismo cellulare fetale tramite saggio di PCR-ELISA.

Al fine di confermare i risultati ottenuti tramite la metodica di PCR-ELISA è stata eseguita un'analisi FISH su 3 pazienti risultate positive per la presenza di MCF. Tale metodica permette di distinguere i nuclei maschili, di presunta origine fetale, da quelli femminili materni, tramite il rilevamento di segnali fluorescenti provenienti dai cromosomi X (verde) ed Y (rosso). L'analisi è stata condotta su diverse sezioni di tessuto tumorale e sul controlaterale sano inclusi in paraffina. I risultati ottenuti sono stati riportati nella Tabella 3.2.

Il numero di cellule microchimeriche variava da 1-4/cm<sup>2</sup> di tessuto tumorale e 0-0.4/cm<sup>2</sup> di tessuto normale. Il numero totale di cellule maschili microchimeriche è risultato essere statisticamente più frequente ( $p < 0.0001$ , test  $\chi^2$ ) nel tessuto tumorale (64 cellule maschili con cariotipo XY) rispetto al controlaterale sano (9 cellule maschili con cariotipo XY) a parità di area analizzata (27 cm<sup>2</sup>).

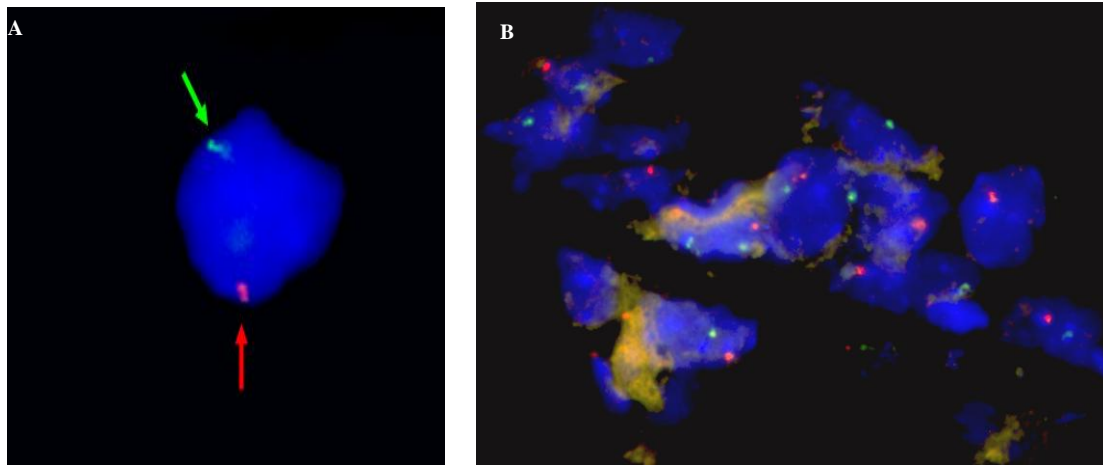
#		N° cellule XY microchimeriche	Area totale analizzata (cm <sup>2</sup> )	N° cellule microchimeriche /cm <sup>2</sup>	
<b>1</b>	<b>tumore</b>	<b>14</b>	<b>8</b>	<b>1.8</b>	
	sano	6	14	0.4	
<b>3</b>	<b>tumore</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>1.1</b>	
	sano	3	11	0.3	
<b>5</b>	<b>tumore</b>	<b>39</b>	<b>9</b>	<b>4.3</b>	
	sano	0	2	0	
<b>tot</b>	<b>tumore</b>	<b>64</b>	<b>27</b>	<b>2.4</b>	<b><i>p</i>&lt;0.0001</b>
	sano	9	27	0.3	

**Tabella 3.2** Numero di cellule maschili microchimeriche identificate nel tessuto tiroideo tumorale e sano tramite l'analisi FISH in 3 pazienti con MCF.

Le cellule fetali maschili identificate nei tessuti analizzati erano presenti sia come singole cellule che in cluster (più cellule maschili con cariotipo XY poste una vicina all'altra) e distribuite in modo casuale all'interno del tessuto (Fig. 3.1).

È stata in seguito effettuata una caratterizzazione fenotipica al fine di identificare l'origine delle cellule maschili microchimeriche riscontrate nei PTC e nei tessuti normali controlaterali ed in particolare per vedere se tali cellule erano di origine ematopoietica esprimenti l'antigene leucocitario comune CD45 o se erano cellule differenziate in tireociti, esprimenti quindi tireoglobulina (Tg).

Le cellule fetali maschili esprimenti Tg sono state riscontrate sia nel tumore che nel tessuto sano (65 vs 50,  $p=0.0449$  con il test esatto di Fisher), mentre quelle CD45 positive sono state identificate in minore quantità ed esclusivamente nelle sezioni di tessuto neoplastiche (14 vs 0,  $p<0.0001$  con il test esatto di Fisher) (Tab. 3.3).



**Figura 3.1** Cellule maschili presenti in una sezione di tiroide femminile e rilevate tramite FISH. I nuclei appaiono di colore blu, mentre le ibridazioni ai cromosomi X e Y sono visibili come segnali verdi e rossi rispettivamente. A) Nucleo maschile singolo (ingrandimento 100X); B) Cluster di nuclei maschili rilevati nella sezione patologica ottenuta da una donna affetta da PTC (ingrandimento 100X). L'assenza di 2 segnali/nucleo in alcuni nuclei è dovuta al fatto che alcuni segnali non sono sullo stesso piano di fuoco.

<b>Fenotipo</b>	<b>% cellule XY nel tessuto patologico totale</b>	<b>% cellule XY nel tessuto sano totale</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Tg positive</b>	65	50	<b><i>p=0.0449</i></b>
<b>CD45 positive</b>	14	0	<b><i>p&lt;0.0001</i></b>
<b>Tg negative CD45 negative</b>	22	50	<b><i>p&lt;0.0001</i></b>
			<b><i>p&lt;0.0001</i></b>

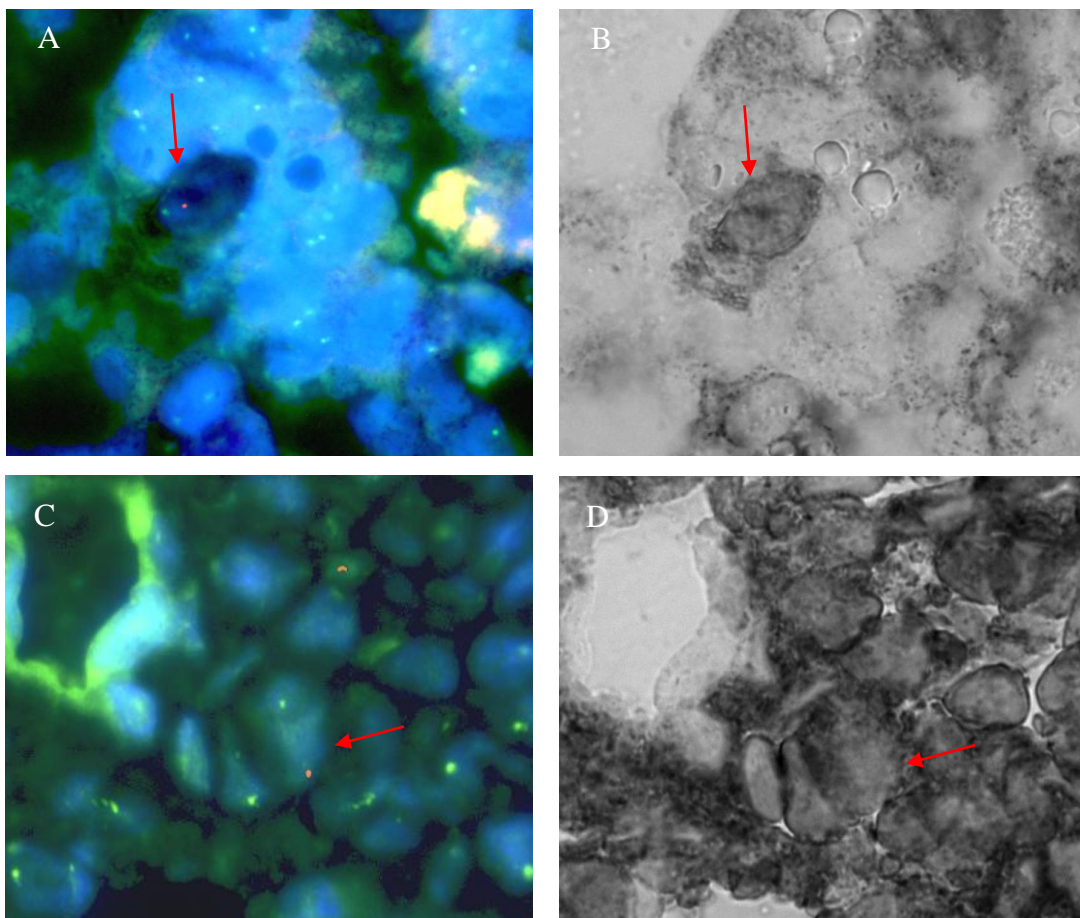
**Tabella 3.3** Fenotipo delle cellule maschili microchimeriche ottenuto tramite l'analisi di ImmunoFISH in 3 pazienti con MCF.

Infine cellule maschili microchimeriche negative per entrambi gli antigeni sono state trovate sia nei tessuti tumorali che sani, ma erano statisticamente più frequenti nel tessuto normale (50 vs 22,  $p<0.0001$  con il test esatto di Fisher).

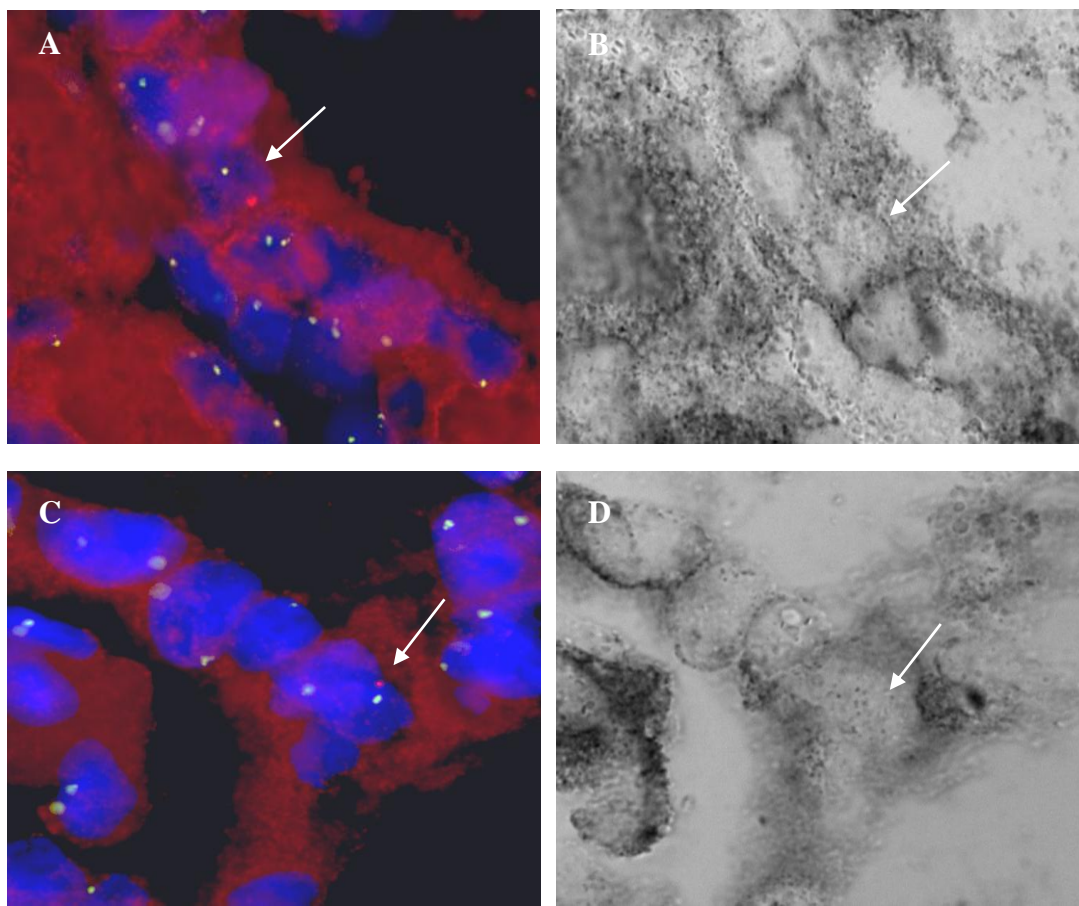
Sembrerebbe quindi che alcune cellule fetali siano precursori della linea ematopoietica in grado di dare origine a cellule leucocitarie, come dimostrato dall'espressione dell'antigene CD45 (Fig. 3.2), o che siano cellule staminali ematopoietiche o

mesenchimali o di un altro tipo non noto con elevata plasticità e in grado quindi di differenziare in diverse linee cellulari acquisendo il fenotipo del tessuto ospite, come dimostrato dall'espressione di Tg (Fig. 3.3).

È interessante notare che, in alcune sezioni, le cellule maschili microchimeriche Tg positive sono state trovate interposte a cellule follicolari materne in un follicolo tiroideo (Fig. 3.3).



**Figura 3.2** Cellule maschili differenziate in leucociti positivi per CD45. A, C) La freccia rossa indica una nucleo maschile (blu) con 1 cromosoma Y (rosso) e 1 cromosoma X (verde) circondata da cellule femminili con 2 cromosomi X (ingrandimento 100X). B, D) Microscopia ottica, la freccia rossa indica le stesse cellule maschili mostrate in A e C rispettivamente. Il precipitato scuro sulla superficie cellulare di queste cellule indica la presenza di CD45 (ingrandimento 100X).



**Figura 3.3** Cellule maschili differenziate in tireociti esprimenti Tg. A, C) Microscopia a fluorescenza, la freccia bianca indica una cellula maschile (di presunta origine fetale) con 1 cromosoma Y (rosso) e 1 cromosoma X (verde) circondata da cellule femminili con 2 cromosomi X. La fluorescenza rossa attorno al nucleo maschile (blu) indica la presenza di Tg citoplasmatica (ingrandimento 100X). B, D) Microscopia ottica, la freccia bianca indica le stesse cellule maschili mostrate in A e B rispettivamente. Il precipitato scuro citoplasmatico intorno al nucleo maschile indica la presenza di Tg (ingrandimento 100X).

## 3.2 IDENTIFICAZIONE DI DNA MASCHILE IN CAMPIONI DI SANGUE PERIFERICO

Non sono state riscontrate differenze significative tra il gruppo delle pazienti (pazienti affette da PTC con almeno una gravidanza maschile prima della diagnosi di carcinoma della tiroide) e il gruppo controllo (donne sane ossia non affette da alcuna malattia neoplastica e/o autoimmune nota, con almeno una gravidanza maschile in anamnesi) in termini di età alla nascita del primo figlio maschio ( $< 30$  o  $\geq 30$  aa,  $p = 0.15$ ; con una mediana di 27 e 30 aa per le pazienti e i controlli rispettivamente,  $p = 0.13$ ), di numero di figli maschi (1 o  $\geq 2$ ,  $p = 0.63$ ; con una mediana di 1 figlio per entrambi i gruppi,  $p = 0.53$ ) o di periodo di tempo intercorso tra la nascita del primo figlio maschio e la diagnosi/arruolamento ( $\leq 20$  o  $\geq 20$  aa,  $p = 0.43$ ; con una mediana di 23 e 17 aa per le pazienti e i controlli rispettivamente,  $p = 0.06$ ) (Tab. 3.4).

La presenza di DNA maschile di presunta origine fetale è stata riscontrata in 28/57 pazienti (49.1%) ed in 38/49 controlli (77.6%); questa differenza risulta essere statisticamente significativa sia attraverso l'analisi con Chi-square ( $p = 0.002$ , OR: 3.58) sia attraverso l'analisi di regressione logistica ( $p = 0.009$ , OR: 3.21). (Tab. 3.5).

Come nel lavoro precedente (eseguito solo su campioni tissutali) anche in questo caso nel gruppo delle pazienti affette da PTC non sono state riscontrate differenze statisticamente significative in termini di stadio del tumore, outcome clinico, età alla nascita del primo figlio maschio, il numero di figli maschi, il periodo tra la nascita del primo figlio maschio e la diagnosi di carcinoma e la presenza/assenza di MCF nel sangue periferico (Tab. 3.6).

È stato dimostrato in letteratura (Koopmans 2008) che anche all'interno della tiroide normale, come nel polmone, nella cute, nei linfonodi esiste un piccolo numero di cellule microchimeriche. Per questo, poiché teoricamente l'asportazione della ghiandola porterebbe alla scomparsa di cellule fetali in circolo, abbiamo calcolato l'intervallo di tempo tra tiroidectomia e reclutamento ma non sono state riscontrate differenze significative tra pazienti affette da PTC con o senza cellule microchimeriche fetali circolanti. In particolare l'intervallo medio era di 5.46 aa (range 0.5-19) per pazienti positive per la presenza di MCF e di 5.03 aa (range 0.5-18) per pazienti negative per MCF ( $p = 0.7$  by  $t$ -test).

<b>Caratteristiche cliniche</b>	<b>Pazienti con PTC n (%)</b>	<b>Controlli sani n (%)</b>	<b><i>p</i></b>
<i>Età alla nascita del primo figlio maschio (aa)</i>			
<30	40 (70.1)	27 (55.1)	0.15 (NS)
≥30	17 (29.9)	22 (48.9)	
<i>Numero di figli maschi</i>			
1	44 (77.2)	40 (81.6)	0.63 (NS)
≥2	13 (22.8)	9 (18.4)	
<i>Periodo di tempo intercorso tra la nascita del primo figlio maschio e la diagnosi/arruolamento</i>			
≤ 20	27 (47.3)	27 (55.1)	0.43 (NS)
> 20	30 (52.7)	22 (44.9)	

**Tabella 3.4** Confronto tra pazienti affette da PTC e controlli sani in termini di caratteristiche cliniche.

	<b>Pazienti n (%)</b>	<b>Controlli n (%)</b>
<b>Presenza di MCF</b>	29 (50.9)	11 (22.4)
<b>Assenza di MCF</b>	28 (49.1)	38 (77.6)

	<b>OR (95% CI)</b>	<b>p</b>
<b>Chi-square</b>	3.58 (1.53-8.36)	0.002
<b>Regressione logistica</b>	3.21 (1.34-7.67)	0.009

**Tabella 3.5** Analisi statistiche della prevalenza del microchimerismo cellulare fetale in pazienti affette da PTC e in controlli sani.

<b>Caratteristiche cliniche</b>	<b>Casi positivi per MCF n (%)</b>	<b>Casi negativi per MCF n (%)</b>	<b>OR (95 % CI)</b>	<b>p</b>
<b><i>Età alla diagnosi (aa)</i></b>				
<45	7 (25)	8 (27.6)	3.04 (0.39-23.82)	0.29 (NS)
≥45	21 (75)	21 (72.4)		
<b><i>Stadio tumorale</i></b>				
I-II	16 (57.1)	16 (55.2)	0.73 (0.21-2.54)	0.62 (NS)
III-IV	12 (42.9)	13 (44.8)		
<b><i>Outcome</i></b>				
Remissione	26 (92.9)	24 (82.8)	0.45 (0.07-2.81)	0.39 (NS)
Persistenza	2 (7.1)	5 (17.2)		
<b><i>Età alla nascita del primo figlio maschio (aa)</i></b>				
<30	19 (67.9)	20 (69)	0.67 (0.11-4.32)	0.68 (NS)
≥30	9 (32.1)	9 (31)		
<b><i>Numero di figli</i></b>				
1	20 (71.4)	24 (82.8)	2.28 (0.58-9)	0.24 (NS)
≥2	8 (28.6)	5 (17.2)		
<b><i>Periodo tra la nascita del primo figlio maschio e la diagnosi di PTC (aa)</i></b>				
≤20	15 (92.9)	11 (86.2)	0.22 (0.02-2.07)	0.18 (NS)
>20	13 (7.1)	18 (13.8)		

**Tabella 3.6** Analisi di regressione logistica delle caratteristiche cliniche delle pazienti affette da PTC in relazione alla presenza o assenza di MCF.



### 3.3 IDENTIFICAZIONE DI DNA MASCHILE IN TESSUTI NEOPLASTICI TRAMITE ANALISI PCR E ANALISI FISH

La presenza di DNA maschile è stata riscontrata tramite PCR in 6 casi/19 tessuti neoplastici analizzati. Per ampliare questi dati è stata effettuata un'analisi FISH sui campioni tissutali risultati positivi all'amplificazione PCR. La presenza di un cromosoma Y (corrispondente al segnale rosso) e di un cromosoma X (corrispondente al segnale verde) ha permesso di identificare le cellule maschili.

Le cellule microchimeriche sono state riscontrate in tutti i 6 casi positivi all'amplificazione PCR, come cellule singole o in cluster (in modo simile allo studio precedente). La quantità di cellule microchimeriche riscontrata variava da 2.1 a 6.9/sezione.

Confrontando i risultati ottenuti su campioni di sangue periferico e su campioni tissutali si evidenzia (Tab. 3.7):

- 6 pazienti risultate negative per MCF sia a livello tissutale che di sangue periferico;
- 1 paziente risultata positiva per MCF sia a livello tissutale che di sangue periferico;
- 5 pazienti risultate negative per MCF a livello di sangue periferico ma positive sul campione tissutale;
- infine 7 casi risultati positivi per MCF a livello del sangue periferico e non a livello tissutale.

In accordo coi dati preliminari mostrati sopra, anche in questa casistica non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa in termini di stadio tumorale e di outcome clinico tra le pazienti positive per la ricerca di MCF nei tessuti neoplastici e quelle negative per tale ricerca.

#	MCF nel sangue periferico	MCF nel tessuto neoplastico	Età alla diagnosi (aa)	TNM	Outcome
1	no	no	75	T1N0	remissione
2	no	no	49	T3N1a	persistenza
3	no	no	45	T3N0	remissione
4	no	no	66	T4N1b	remissione
5	no	no	48	T1NX	remissione
6	no	no	36	T1N0	remissione
7	sì	no	37	T3N1b	remissione
8	sì	no	50	T3N0	remissione
9	sì	no	55	T3NX	remissione
10	sì	no	52	T1N0	remissione
11	sì	no	60	T3N1a	remissione
12	sì	no	50	T1N0	remissione
13	sì	no	47	T1NX	remissione
14	no	sì	44	T3N1b	persistenza
15	no	sì	50	T4N1b	remissione
16	no	sì	45	T3N1b	remissione
17	no	sì	45	T3NX	remissione
18	no	sì	74	T3N1	remissione
19	sì	sì	69	T3NX	remissione

**Tabella 3.7** Confronto dell'analisi su sangue periferico e su tessuti effettuata su 19 pazienti.

## **CAPITOLO 3**

# **DISCUSSIONE**

In conclusione il presente studio ha dimostrato, per la prima volta, la presenza di microchimerismo cellulare fetale (MCF), derivante dal traffico di cellule durante la gravidanza, nel carcinoma papillare della tiroide (PTC).

Gli studi condotti tramite saggio di PCR-ELISA hanno evidenziato la presenza della sequenza maschile SRY nel tessuto patologico di 7/41 (17%) donne con PTC, che avevano avuto almeno un figlio maschio precedentemente alla diagnosi di tumore, suggerendo che le cellule fetali microchimeriche vadano a localizzarsi nei tessuti in condizioni patologiche. Dal momento che il MCF è stato dimostrato in letteratura essere presente con una frequenza pari al 40-50% nei tessuti tiroidei affetti da tiroidite di Hashimoto o da Malattia di Graves, è importante sottolineare che i 7 PTC risultati positivi per MCF non erano associati a tiroiditi.

Inoltre la presenza di MCF è risultata essere indipendente dal numero di gravidanze di feti maschi e dall'intervallo di tempo intercorso tra il parto e la diagnosi di malattia. Infatti, il MCF è stato riscontrato in alcuni casi addirittura 40 anni dopo la gravidanza del figlio maschio, confermando quindi che le cellule fetali persistono per decenni nel circolo e nei tessuti materni dopo il parto.

L'analisi FISH ha permesso di confermare ed estendere i dati PCR: le cellule maschili, di presunta origine fetale, sono state osservate più frequentemente nel tessuto patologico rispetto al controlaterale sano (64% vs. 9%,  $p < 0,0001$ ).

Questi risultati sono in accordo con i dati riportati precedentemente per il tumore della cervice, in cui le cellule microchimeriche erano risultate essere significativamente più abbondanti nel tessuto neoplastico rispetto alla sezione normale adiacente.

Questo dato sembrerebbe quindi contrastare con l'ipotesi che considera le cellule fetali microchimeriche come "*innocent bystanders*", quindi come cellule che accidentalmente

si trovano nei tessuti affetti senza alcun ruolo biologico e sembra invece avvalorare l'ipotesi che queste cellule svolgano un ruolo fondamentale nei processi di riparo.

Nel primo studio in oggetto svolto su campioni di tessuto neoplastico e di tessuto sano, per identificare l'origine delle cellule microchimeriche maschili riscontrate, è stata utilizzata una metodica che combina la tecnica FISH con l'immunoistochimica (ImmunoFISH), permettendo il rilevamento simultaneo dei cromosomi X e Y e dei marker proteici CD45 (indica la presenza di leucociti) e Tg (espressa dai tireociti).

È stato quindi possibile identificare cellule maschili (cariotipo XY) positive per la presenza della proteina Tg nell'ambiente citoplasmatico sia nel tessuto tiroideo tumorale (65%) che nel controlaterale sano (50%) senza alcuna differenza statisticamente significativa; tali cellule potrebbero giocare un ruolo fondamentale nel rimpiazzare le cellule danneggiate e nel riparo del tessuto tiroideo sano. Invece le cellule maschili microchimeriche marcate in superficie per l'antigene leucocitario comune CD45 sono state rilevate solo nelle sezioni di tessuto tumorale e a più bassa frequenza (14%) a suggerire che queste potrebbero agire come macrofagi o cellule natural killer distruggendo le cellule tumorali.

Tuttavia, non è possibile escludere completamente l'ipotesi del "*bad microchimerism*", come ipotizzato per le patologie autoimmunitarie, secondo la quale le cellule microchimeriche potrebbero svolgere un ruolo patogenetico nello sviluppo e nella crescita neoplastica per esempio inducendo un'alterazione del sistema immunitario o rendendo il tessuto tiroideo più suscettibile a fattori genetici e ambientali.

È interessante notare che le poche cellule maschili non esprimenti i marker di differenziamento CD45 e Tg sono state identificate più frequentemente nel tessuto controlaterale sano (50%) rispetto a quello patologico (22%).

Una possibile spiegazione per questa osservazione è che queste cellule microchimeriche siano in realtà precursori di tireociti, fibroblasti o cellule staminali in grado di, in presenza di fattori ambientali e di sviluppo favorevoli, migrare verso tessuti materni normali o neoplastici per poi differenziarsi in cellule ematopoietiche o epiteliali.

Il fenomeno del trans-differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche in cellule somatiche è ben documentato in letteratura, anche se i dati sono contrastanti (Herzog EL et al., 2003).

È inoltre stato ipotizzato il fenomeno della fusione tra cellule staminali ematopoietiche e cellule somatiche. In tale caso è possibile riscontrare la presenza di nuclei tetraploidi con cariotipo XXXY derivanti dalla fusione di cellule maschili microchimeriche e tireociti o leucociti materni nelle sezioni tissutali analizzate.

Nel nostro studio tuttavia non sono stati riscontrati nuclei maschili polipoidi e il meccanismo della fusione sembrerebbe pertanto improbabile. Ciò nonostante è possibile che prodotti di fusione tra cellule fetali e materne non siano stati rilevati a causa della presenza di nuclei parziali nelle sezioni tissutali analizzate.

Sempre dagli studi condotti sui campioni tissutali è stata riscontrata la presenza di MCF in tessuto tiroideo normale a differenza dei precedenti lavori (Klintshar M, 2001).

Questa discrepanza potrebbe essere spiegata in parte dal fatto che nella nostra casistica i tessuti analizzati erano tessuti sani controlaterali al tumore, mentre nelle altre casistiche i tessuti analizzati appartenevano a tiroidi normali autoptiche.

Il nostro riscontro potrebbe sostenere l'ipotesi che le cellule microchimeriche, in presenza di un processo neoplastico, potrebbero migrare verso la tiroide e prendere parte ai processi di riparo.

Tuttavia è necessario sottolineare che il MCF non è stato riscontrato nel 53% circa delle pazienti affette da PTC e con la presenza in anamnesi di almeno un figlio maschio. Quest'osservazione potrebbe essere conseguenza di vari processi fra cui l'analisi incompleta dei campioni chirurgici, la rimozione delle cellule fetali da parte del sistema immunitario materno o dall'influenza, in alcune pazienti, della presenza di cellule fetali femminili derivanti da un'ulteriore gravidanza.

Nel complesso i dati ricavati dalle analisi su campioni tissutali depongono per un ruolo protettivo del microchimerismo nei confronti del carcinoma della tiroide, nonostante non sia possibile escludere il ruolo patogenetico.

Anche gli studi successivi da noi condotti a livello di sangue periferico depongono per un verosimile ruolo protettivo delle cellule fetali microchimeriche nello sviluppo e crescita del carcinoma tiroideo in quanto la prevalenza del MCF nel sangue periferico è risultata significativamente minore in pazienti affette da PTC che in controlli sani (49.1 vs 77.6%,  $p = 0.002$ ).

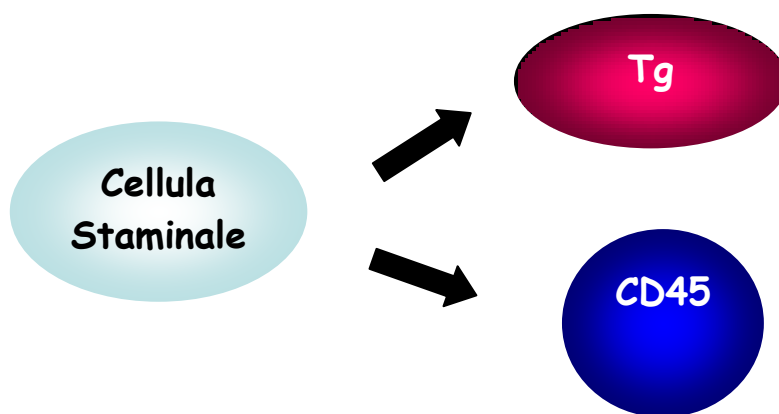
È importante ricordare che, nonostante la tecnica utilizzata possieda una elevata sensibilità (1 cellula maschile per 106 cellule femminili), non è possibile escludere totalmente la presenza di casi falsi negativi.

Questi dati concordano con altri studi condotti sia a livello tissutale che di sangue periferico riguardanti il carcinoma della mammella, il carcinoma della cervice e altre neoplasie solide o ematologiche. (Gadi et al., 2007; Gadi et al., 2008).

Le cellule microchimeriche riscontrate nel sangue periferico, come suggerito anche da studi precedenti, potrebbero non possedere alcuna azione biologica a livello periferico mentre potrebbero essere in grado di migrare verso aree di tessuto patologico, differenziarsi in cellule ospiti per il riparo tissutale (Fig.4.1).

Quest'ipotesi verrebbe confermata anche dal riscontro nella nostra analisi di cellule microchimeriche nel tessuto neoplastico di 5 casi risultati negativi per MCF a livello periferico. Questo dato avvalorerebbe inoltre l'ipotesi che le cellule fetali potrebbero migrare e stabilizzarsi in organi linfoidi materni e nel midollo osseo per poi risultare disponibili a livello del tessuto danneggiato in caso di necessità.

In merito a questo possibile ruolo delle cellule microchimeriche sono stati ipotizzati vari meccanismi: le cellule T fetali potrebbero distruggere cellule neoplastiche materne esprimendo ex novo antigeni neoplastici specifici oppure cellule APC fetali (cellule presentanti l'antigene) potrebbero favorire un processo di sorveglianza immunitaria presentando gli antigeni materni neoplastici alle cellule immunitarie effettrici materne ed infine cellule fetali natural killer potrebbero innescare un'azione citotossica nei confronti delle cellule materne neoplastiche.



**Figura 4.1** Rappresentazione grafica dell'ipotesi del fenomeno del trans-differenziamento di cellule staminali di origine fetale in tireociti o leucociti.

Infine nella nostra casistica non sono state riscontrate differenze significative in termini di outcome clinico tra pazienti negative o positive per il MCF a livello periferico e/o tissutale, probabilmente per la prognosi molto buona della maggior parte dei PTC.



Tuttavia la determinazione della presenza o assenza del microchimerismo in un paziente affetto da carcinoma risulta importante soprattutto alla luce di future procedure terapeutiche mirate. In merito è stata dimostrata recentemente la remissione di un carcinoma del timo in una paziente positiva per cellule fetali microchimeriche circolanti attraverso la trasfusione di linfociti e cellule staminali appartenenti alla figlia (Tokita et al., 2001).

In conclusione, il presente studio mostra per la prima volta la presenza di microchimerismo cellulare fetale in donne affette dal carcinoma papillare della tiroide non associato a tiroiditi. Gli studi di ImmunoFISH hanno permesso di assegnare un fenotipo alle cellule microchimeriche riscontrate. Tali cellule esprimevano o l'antigene CD45, dimostrando così una differenziazione in leucociti, o la tireoglobulina, indicando una differenziazione in tireociti.

La presenza del microchimerismo cellulare fetale potrebbe quindi essere una risposta alla carcinogenesi, in quanto alcuni precursori cellulari fetali potrebbero essere in grado di differenziare in cellule leucocitarie per danneggiare il tessuto tumorale e altri di differenziare in tireociti nel tentativo di ripopolare o riparare il tessuto danneggiato (*good microchimerism*). Tuttavia non si può escludere che la persistenza di queste cellule microchimeriche in tiroide possa avere un ruolo nella carcinogenesi: queste cellule potrebbero infatti indurre un'alterazione del sistema immunitario materno o la loro presenza potrebbe anche essere il risultato di una soppressione del sistema immunitario da parte del tumore (*bad microchimerism*). Il meccanismo tramite il quale cellule fetali circolanti acquisiscono la capacità di differenziarsi in base al tessuto ospite è tuttora ignoto, così come il preciso ruolo del microchimerismo cellulare fetale nel carcinoma papillare della tiroide (Fugazzola et al., 2011).

Si rende necessario effettuare ulteriori studi al fine di comprendere meglio il ruolo del microchimerismo cellulare fetale nella patogenesi del PTC.

Inoltre sarebbe nostra intenzione in futuro approfondire il ruolo del microchimerismo anche in patologie benigne della tiroide analizzando donne affette da tiroidite di Hashimoto e morbo di Graves per confermare i dati riportati in letteratura di un possibile coinvolgimento del MCF nella patogenesi di queste malattie.

## Bibliografia

- 1) Adams KM, Yan Z, Stevens AM, Nelson JL. The Changing Maternal “Self” Hypothesis: A mechanism for maternal tolerance of the fetus. *Placenta* 2007; 28:378- 382.
- 2) Ando T, Imaizumi M, Graves PN, Unger P, Davies TF. Intrathyroidal fetal microchimerism in Graves’ Disease. *The journal of endocrinology & metabolism* 2002; 87:3315-3320.
- 3) Ando T, Davies TF. Postpartum autoimmune thyroid disease: the potential role of fetal microchimerism. *The journal of clinical endocrinology & metabolism* 2003; 88(7):2965-2971.
- 4) Aractingi S, Berkane N, Bertheau P, Le Goue C, Dausset J, Uzan S, Carosella ED. Fetal DNA in skin of polymorphic eruptions of pregnancy. *Lancet* 1999; 352:1898-1901.
- 5) Aractingi S, Sibilia J, Meiginin V, Launay D, Hachulla E, Le Danff C, Janin A, Mariette X. Presence of microchimerism in labial salivary glands in systemic sclerosis but not in Sjogren’s syndrome. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1039-1043.
- 6) Arlett CM, Smith JB, Jimenez SA. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338:1186-1191.
- 7) Arlett CM, Ramos R, Jiminez SA, Patterson K, Miller FW, Rider LG. Chimeric cells of maternal origin in juvenile idiopathic inflammatory miopathies Childhood Myositis Heterogeneity Collaborative Group. *Lancet* 2000; 356:2155-2156.

- 8) Arlett CM, Miller FW, Rider LG. Persistent maternally derived peripheral microchimerism is associated with the juvenile idiopathic inflammatory miopathies. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40:1279-1284.
- 9) Arlett CM, Cox LA, Ramos RC, Dennis TN, Fortunato RA, Hummers LK, Jimenez SA, Smith JB. Increased microchimeric CD4+ T lymphocytes in peripheral blood from women with systemic sclerosis. *Clin Immunol* 2002; 103:303-308.
- 10) Arlett CM, Rasheed M, Russo-Stieglitz KE, Sawaya HH, Jimenez SA. Influence of prior pregnancies on disease course and cause of death in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:346-350.
- 11) Arlett CM. Pathophysiology of fetal microchimeric cells. *Clinica Chimica Acta* 2005;360: 1-8.
- 12) Badenhoop K. Intrathyroidal microchimerism in Graves' disease or Hashimoto's thyroiditis: regulation of tolerance or alloimmunity by fetal-maternal immune interactions? *European Journal of endocrinology* 2004; 150:421-423.
- 13) Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:705-708.
- 14) Bianchi DW. Fetomaternal cell trafficking: a story that begins with prenatal diagnosis and may end with stem cell therapy. *Journal of pediatric surgery* 2007; 42:12-18.
- 15) Cha D, Khosrotehrani K, Kim Y, Stroh H, Biancje DW, Johnson KL. Cervical cancer and microchimerism. *The American College of Obstetricians and Gynaecologists* 2003; 102:774-781.

- 16) Christner PJ, Arlett CM, Conway RF, Jimenez SA. Increased numbers of microchimeric cells of fetal origin are associated with dermal fibrosis in mice following injection of vinyl chloride. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2598-2605.
- 17) Cirello V, Recalcati MP, Muzza M, Rossi S, Perrino M, Vicentini L, Beck-Peccoz P, Finelli P, Fugazzola L. Fetal cell microchimerism in papillary thyroid cancer: a possible role in tumor damage and tissue repair. *Cancer Res.* 2008; 68(20):8482-8
- 18) Cirello V, Perrino M, Colombo C, Muzza M, Filopanti M, Vicentini L, Beck-Peccoz P, Fugazzola L. Fetal cell microchimerism in papillary thyroid cancer: studies in peripheral blood and tissues. *Int J Cancer.* 2010; 126(12):2874-8.
- 19) Corpechot C, Barbu V, Chazouilleres O, Poupon RE, Poupon R. Fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33:696-700.
- 20) Endo Y, Negishi I, Ishikawa O. Possible contribution of microchimerism to the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41:490-495.
- 21) Evans PC, Lambert N, Maloney S, Furst DE, Moore JM, Nelson JL. Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood* 1999; 93:1-6.
- 22) Fanning PA, Jonsson JR, Clouston AD, Edwards-Smith C, Balderson GA, Macdonald GA, Crawford DH, Kerlin P, Powell LW, Powell EE. Detection of male DNA in the liver of female patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33:690-695.
- 23) Fugazzola L, Cirello V, Beck-Peccoz P. Fetal microchimerism as an explanation of disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2011; 7 (2): 89-97.

- 24) Fugazzola L, Cirello V, Beck-Peccoz P. Fetal cell microchimerism in human cancers. *Cancer Lett.* 2010; 287 (2): 136-41
- 25) Gadi VK, Nelson JL. Fetal microchimerism in women with breast cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 9035-38
- 26) Gadi VK, Malone KE, Guthrie KA, Porter PL, Nelson JL. Case-control study of fetal microchimerism and breast cancer. *PLoS One* 2008; 3:1-5.
- 27) Gannage M, Amoura Z, Lantz O, Piette JC, Zucman SC. Feto-maternal microchimerism in connective tissue disease. *Eur J Immunol* 2002; 32: 3405-3413.
- 28) Greer LG, Casey BM, Halvorson LM, Spong CY, McIntire DD, Cunningham FG. Antithyroid antibodies and parity: further evidence for microchimerism in autoimmune thyroid disease. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 205(5): 471- 474.  
Epub 2011 Jun 24.
- 29) Guettier C, Sebah M, Buard J, Feneux D, Ortin-Serrano M, Gigou M, Tricottet V, Reynes M, Samuel D, Feray C. Male cell microchimerism in normal and diseased female livers from fetal life to adulthood. *Hepatology* 2005; 42:35-43.
- 30) Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102(10): 3483-3483.
- 31) Imaizumi M, Pritsker A, Unger P, Davies TF. Intrathyroidal fetal microchimerism in pregnancy and postpartum. *Endocrinology* 2002; 143 :247-253.
- 32) Invernizzi P, De Andreis C, Sirchia SM, Battezzati PM, Zuin M, Maggioni M, Meroni PL, Penner E, Wiesierska-Gadek J. Blood fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 2000; 122:418-422.

- 33) Johnson KL, Zhen DK, Bianchi DW. The use of fluorescence in situ hybridization (FISH) on paraffin-embedded tissue sections for the study of microchimerism. *Biotechniques* 2000; 29:1220-1224.
- 34) Johnson KL, McAlindon TE, Mulcahy E, Bianchi DW. Microchimerism in a female patient with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001; 44:2107-2111.
- 35) Johnson KL, Nelson JL, Furst DE, McSweeney PA, Roberts DJ, Zhen DK, Bianchi DW. Fetal cell microchimerism in tissue from multiple sites in women with systemic sclerosis. *Arthritis rheum* 2001; 44:1848-1854.
- 36) Johnson KL, Samura O, Nelson JL, McDonnell WM, Bianchi DW. Significant fetal cell microchimerism in a non-transfused woman with hepatitis C: evidence of long-term survival and expansion. *Hepatology* 2002; 36:1295-1297.
- 37) Johnson KL, Bianchi DW. Fetal cells in maternal tissue following pregnancy: what are the consequences? *Human reproduction update* 2004; 10(6):497-502.
- 38) Khosrotehrani K, Bianchi DW. Fetal cell microchimerism: helpful or harmful to the parous woman? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003; 15:195-199.
- 39) Khosrotehrani K, Bianchi DW, Johnson KL. Combined FISH and Immunolabelling on paraffin-embedded tissue sections for the study of microchimerism. *Biotechniques* 2003; 34:242-244.
- 40) Khosrotehrani K, Johnson KL, Cha DH, Salomon RN, Bianchi DW. Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *Jama* 2004; 292:75-80.
- 41) Khosrotehrani K, Bianchi DW. Multi-lineage potential of fetal cells in maternal tissue: a legacy in reverse. *Journal of Cell Science* 2005; 118:1559-1563.

- 42) Khosrotehrani K, Guegan S, Fraitag S, Oster M, de Prost Y, Bodemer C, Aractingi S. Presence of chimeric maternally derived keratinocytes in cutaneous inflammatory disease of children: the example of pityriasis lichenoides. *Journal of investigative dermatology* 2006; 126:345-348.
- 43) Klintschar M, Schwaiger P, Mannweiler S, Regauer S, Kleiber M. Evidence of fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis. *The Journal of Endocrinology & Metabolism* 2001; 86:2494-2498.
- 44) Kuroki M, Okayama A, Nakamura S, Sasaki T, Murai K, Shiba R, Shinohara M, Tsubouchi H. Detection of maternal-fetal microchimerism in the inflammatory lesions of patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:1041-1046.
- 45) Lambert NC, Lo YM, Erickson TD, Tylee TS, Guthrie KA, Furst DE, Nelson JL. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA ? A quantitative answer. *Blood* 2002; 100:2845-2851.
- 46) Lambert N, Nelson JL. Microchimerism in autoimmune disease: more question than answers ? *Autoimmunity reviews* 2003; 2:133-139
- 47) Lo YM, Lau TK, Chan LY, Leung TN, Chang AM. Quantitative analyses of the bi-directional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem* 2000; 46(9):1301-1309.
- 48) Lombardi T, Philippeaux MM, Hadengue A, Samson J, Borisch B, Rubbia-Brandt L. Absence of leukocyte microchimerism in oral lichen planus (OLP): an in situ hybridization study. *J Oral Pathol Med* 2001; 30:398-401.



- 49) Loubiere LS, Lambert NC, Flinn LJ, Erickson TD, Yan Z, Guthrie KA, Vickers KT, Nelson JL. Maternal microchimerism in healthy adults in lymphocytes, monocytes/macrophages and NK cells. *Lab Invest* 2006; 86(11):1185-1192.
- 50) Maloney S, Smith A, Furst DE, Myerson D, Rupert K, Evans PC, Nelson JL. Microchimerism of maternal origin persists in adult life. *J Clin Invest* 1999; 104:41-47.
- 51) Matsushita H, Shibata Y, Fuse K, Kimura M, Iinuma K. Sex chromatin analysis of lymphocytes invading host organs in transfusion-associated graft-versus-host disease. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1988; 55(4): 237-9.
- 52) Miyashita Y, Ono M, Ueki H, Kurasawa K. Y chromosome microchimerism in rheumatic autoimmune disease. *Ann Rheum Dis* 2000; 59:655-656.
- 53) Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A, Bean MA, Ober C, Bianchi DW. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 1998; 351:559-562.
- 54) Nelson JL. Microchimerism: expanding new horizon in human health or incidental remnant of pregnancy? *Lancet* 2001; 358:2011-2012.
- 55) Nelson JL, Gillespie KM, Lambert NC, Stevens AM, Loubiere LS, Rutledge JC, Leisenring WM, Erickson TD, Yan Z, Mullarkey ME, Boespflug ND, Bingley PJ, Gale EAM. Maternal microchimerism in peripheral blood in type 1 diabetes and pancreatic islet  $\beta$  cell microchimerism. *PNAS* 2007; 104:1637-1642.
- 56) Nelson JL. Microchimerism: incidental byproduct of pregnancy or active participant in human health? *Trends in molecular medicine* 2002; 8(3): 109-113.
- 57) Ohto H, Anderson KC. Posttransfusion graft-versus-host disease in Japanese newborns. *Transfusion*. 1996; 36 (2): 117-23.

- 58) Ohtsuka T, Miyamoto Y, Yamakage A, Yamazaki S. Quantitative analysis of microchimerism in systemic sclerosis skin tissue. *Arch Dermatol Res* 2002; 293:387-391.
- 59) O'Donoghue K, Chan J, de la Fuente J, Kennea N, Sandison A, Anderson JR, Roberts IA, Fisk NM. Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy. *Lancet* 2004; 364:179-182.
- 60) Osada H, Doi S, Fukushima T, Nakauchi H, Seki K, Sekiya S. Detection of fetal HPCs in maternal circulation after delivery. *Transfusion* 2001; 41:499-503.
- 61) Renné C, Ramos Lopez E, Steimle-Grauer SA, Ziolkowski P, Pani MA, Luther C, Holzer K, Encke A, Wahl RA, Bechstein WO, Usadel KH, Hansmann ML, Badenhoop K. Thyroid fetal male microchimerism in mothers with thyroid disorders: presence of Y-chromosomal immunofluorescence in thyroid-infiltrating lymphocytes is more prevalent in Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease than in follicular adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89(11):5810-5814.
- 62) Regauer S, Schwaiger P, Liegl B, Klintschar M. Fetal microchimerism is common in normal and diseased vulvar skin. *The Journal of Investigative Dermatology* 2004; 122(4): 1059-1060.
- 63) Rinkevich B. Human Natural Chimerism: an acquired character or a vestige of evolution? *Human Immunology* 2001; 62:651-657.
- 64) Rubbia-Brandt L, Philippeaux MM, Chavez s, Mentha G, Borisch G, Hadengue A. FISH for Y chromosome in women with primary biliary cirrhosis : lack of evidence for leukocyte microchimerism. *Hepatology* 1999; 30:821-822.

- 65) Sakar K, Miller FW. Possible roles and determinants of microchimerism in autoimmune and other disorders. *Autoimmunity Reviews* 2004; 3:454-463.
- 66) Sawaya HHB, Jimenez SA, Arlett CM. Quantification of fetal microchimeric cells in clinically affected and unaffected skin of patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* 2004; 43:965-968.
- 67) Scaletti C, Vultaggio A, Bonifacio S, Emmi L, Torricelli F, Maggi E, Romagnani S, Piccinni MP. Th2-oriented profile of male offspring T cells present in women with systemic sclerosis and reactive with maternal major histocompatibility complex antigen. *Arthritis Rheum* 2002; 46:445-450.
- 68) Srivatsa B, Srivatsa S, Johnson KL, Samura O, Lee SL, Bianchi DW. Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case-control study. *Lancet* 2001; 358: 2034-2038.
- 69) Srivatsa B, Srivatsa S, Johnson KL, Bianchi DW. Maternal cell microchimerism in newborn tissues. *The Journal of Pediatrics* 2003; 142(1): 31-35.
- 70) Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Ramos H, Zeevi A, Rudert WA, Kocova M, Ricordi C, Ildstad S, Murase N. Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet*. 1992; 340 (8824): 876-7.
- 71) Starzl TE, Fung J, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Marino IR, Doyle H, Zeevi A, Warty V, Michaels M, et al. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet*. 1993; 341 (8837): 65-71.
- 72) Stevens AM, Hermes HM, Rutledge JC, Buyon JP, Nelson JL. Myocardial-tissue-specific phenotype of maternal microchimerism in neonatal lupus congenital heart block. *Lancet* 2003; 362:1617-1623.

- 73) Stevens AM, McDonnell WM, Mullarkey ME, Pang JM, Leisenring W, Nelson JL. Liver biopsies from human females contain male hepatocytes in the absence of transplantation. *Laboratory Investigation* 2004; 84:1603-1609.
- 74) Tanei R, Yamamoto T, Yokono H, Motoori T. Scaling lichenoid eruptions and Sjögren-like syndrome: manifestations of nonfatal postoperative transfusion-associated graft-versus-host disease? *J Dermatol.* 1997; 24 (8):514-21.
- 75) Tanai R, Yokono H, Motoori T, Katsuoka K. Microchimerism seems uninvolved in the pathogenesis of lichen planus. *Dermatology* 2000; 201:373-374.
- 76) Tanaka A, Lindor K, Gish R, Batts K, Shiratori Y, Omata M, Nelson JL, Ansari A, Coppel R, Newsome M, Gershwin ME Fetal microchimerism alone does not contribute to the induction of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999; 30:833-838.
- 77) Toda I, Kuwana M, Kawakami Y. Lack of evidence for increased microchimerism in the circulation of patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:248-253.
- 78) Tokita K, Terasaki P, Maruya E, Saji H. Tumour regression following stem cell infusion from daughter to microchimeric mother. *Lancet* 2001; 358: 2047-48.
- 79) Vanzyl B, Planas R, Ye Y, Foulis A, de Krijger RR, Vives-Pi M, Gillespie KM. Why are levels of maternal microchimerism higher in type 1 diabetes pancreas? *Chimerism* 2010;1(2):45-50.
- 80) Weger W, Bauer M, Odell E, Pertl B, Cerroni L, Kerl H, Jakse N, Pertl C. Role of microchimerism in the pathogenesis of oral lichen planus. *Experimental Dermatology* 2006; 15: 125-129.