

Dipartimento di Scienze Ginecologiche e
della Riproduzione Umana
Scuola di Specializzazione in Ginecologia ed
Ostetricia

Direttore: Ch. mo Prof. Antonio Ambrosini

**Studio preliminare: la
ricerca di
cellule fetali nel sangue
materno ed
impiego del DEP-array**

Relatore: Dott. Erich Cosmi

Correlatore: Dott. Lamberto Camurri

Specializzanda: Dott.ssa Alessandra del Campo

Anno Accademico 2007/2008

Studio preliminare: la ricerca di cellule fetali nel sangue materno ed impiego del DEP-ARRAY

Indice

Riassunto	pag 1
Abstract	pag 3
Introduzione	pag 5
Biologia fondamentale. Relazioni anatomiche tra feto e madre:	
Lo sviluppo della placenta umana	pag 9
La barriera placentare	pag 13
La base biologica del passaggio di materiale cellulare fetale nella circolazione materna	pag 17
Le cellule fetali nel sangue materno. La linea eritroide:	
Biologia dell'eritropoiesi	pag 19
Gli eritroblasti nucleati	pag 24
Approccio generale all'isolamento di cellule fetali dal sangue materno	pag 27
Scopo dello studio	pag 31
Materiali e Metodi	pag 33
Risultati	pag 41
Discussione	pag 45
Conclusioni	pag 49
Bibliografia	pag 51

Riassunto

Le aneuploidie fetali e le aberrazioni cromosomiche interessano nove neonati ogni 1.000 nati vivi. Il gold standard per la diagnosi di anomalie cromosomiche è il cariotipo di cellule fetali, ottenute tramite procedure invasive come la villocentesi o l'amniocentesi. Queste procedure portano con sé un rischio piccolo ma pur sempre significativo per la madre ed il feto. Lo screening non-invasivo con markers sierici materni e l'ecografia esiste, ma manca della sensibilità e specificità che caratterizzano le tecniche di diagnosi prenatale invasive. Vi è quindi il desiderio di sviluppare test genetici non invasivi per la diagnosi prenatale di anomalie cromosomiche fetali. Da quando è stata accertata la presenza di cellule fetali nel sangue periferico materno, vi è un grande interesse per utilizzarle come strumento diagnostico.

Il presente lavoro si propone di ricercare cellule fetali nel sangue periferico di gravide, che si sono sottoposte a procedure classiche di diagnosi prenatale invasiva quali villocentesi ed amniocentesi. Alle pazienti che hanno aderito al progetto sono stati fatti prelievi di sangue, successivamente analizzati, utilizzando quale metodo di isolamento e purificazione cellulare il selezionamento elettronico dielettroforetico o DEP-array.

Scopo del lavoro, è quello di valutare l'efficacia del DEP-array nel purificare le poche cellule fetali presenti in ciascun campione di sangue, e stabilire se in futuro il selezionamento elettronico dielettroforetico possa essere utilizzato per costruire un nuovo test prenatale non-invasivo da

offrire a tutta la popolazione di gravide.

Abstract

Fetal aneuploidy and other chromosomal aberrations affect 9 of 1.000 live births. The gold standard for diagnosing chromosomal abnormalities is karyotyping of fetal cells obtained via invasive procedures such as chorionic villus sampling and amniocentesis. These procedures impose small but potentially significant risks to both the fetus and the mother. Noninvasive screening of fetal aneuploidy using maternal serum markers and ultrasound are available but have limited reliability. There is therefore a desire to develop non-invasive genetic tests for fetal chromosomal abnormalities. Since the discovery of intact fetal cells in maternal blood, there has been intense interest in trying to use them as a diagnostic window into fetal genetics.

The aim of this work is to search for fetal cells in the peripheral blood of pregnant women who have undergone classical procedures of prenatal invasive diagnosis such as villus sampling and amniocentesis. Blood draws were performed on those patients that agreed to take part in this project and the blood was subsequently analysed in the above-mentioned laboratory using electronic dielectrophoretic selection or DEP-array as method of isolation and purification of the cells.

The target of this work, still ongoing in its preliminary part, is to evaluate the effectiveness of DEP-array in purifying the small amount of fetal cells present in each blood sample and to clarify if electronic dielectrophoretic selection can be used in the future for a new non-invasive prenatal test to be offered to the whole community of pregnant women.

Introduzione

La diagnosi prenatale di anomalie cromosomiche e malattie genetiche richiede necessariamente una fonte di cromosomi o DNA fetali; considerando che gran parte delle anomalie fetali sono cromosomiche e si verificano in gravidanze classificate in partenza come “non a maggior rischio”, un test non invasivo da offrire a tutte le donne gravide rappresenterebbe una vera e propria rivoluzione in ambito medico. In generale, le aneuploidie fetali colpiscono 9 ogni 1000 nati vivi [1]

Passi enormi sono stati fatti in questo campo nell’arco degli ultimi decenni. Negli anni ’50 infatti l’unica arma disponibile nella “diagnosi prenatale” era il consulto genetico: le coppie potevano essere informate circa il rischio di ricorrenza per le poche malattie ad ereditarietà mendeliana conosciute, ma nessun tipo di diagnosi poteva essere fatto, alcun tipo di intervento poteva essere messo in atto. Questa situazione cambiò drasticamente quando nel 1968 la *diagnosi in utero* divenne possibile tramite amniocentesi al secondo trimestre. Dal 1982 al 1984 divenne attuabile anche la diagnosi invasiva al primo trimestre tramite il prelievo di villi coriali, una procedura più tardi dimostrata sovrapponibile all’amniocentesi per sicurezza e risultati.

A dispetto di questi notevoli progressi, numerose lacune rimasero e persistono tuttora nel campo della diagnosi prenatale genetica. Nello specifico, sia amnio che villocentesi sono procedure invasive che comportano un rischio basso ma definito di perdita della gravidanza; ecco che esse non possono essere proposte come screening all’intera popolazione di gravide, ma soltanto a quelle pazienti che presentano un

aumentato rischio per anomalie cromosomiche o genetiche.

Per questo motivo le tecniche di diagnosi prenatale non invasive sono oggetto di grande attenzione: fino ad oggi sono stati messi a punto e applicati test probabilistici, indiretti, primo fra tutti l'ultrascreen o duo test combinato, purtroppo privi della sensibilità caratteristica delle tecniche invasive, a tutt'oggi necessarie per ottenere una diagnosi definitiva.

La possibilità di uno screening da somministrare all'intera popolazione di gravide è allettante. Come conseguenza, l'interesse della comunità scientifica negli ultimi anni si è nuovamente concentrato su un'idea "vecchia": la ricerca e l'analisi di cellule fetali nel sangue materno.

Già negli anni '60 e '70 i ricercatori tentarono l'isolamento di cellule fetali dal sangue materno, ma dalla metà degli anni '80 seguì un consensus di frustrazione dovuto ai fallimenti nel confermare gli esiti positivi che avevano dato i primi esperimenti. Vennero tratte conclusioni pessimistiche secondo cui le cellule fetali non esistevano nel sangue materno.

In realtà, evidenze circa la presenza di cellule fetali nel sangue materno esistono da molto tempo. La prima dimostrazione tramite visualizzazione istologica di trofoblasto risale a più di cento anni fa ed appartiene a Schmorl, un patologo tedesco, che nel 1893 visualizzò trofoblasto nel sangue periferico di donne decedute per preeclampsia [2].

Altre evidenze includono studi come quello di Clayton *et al.* [3] i quali nel 1964 cercarono cellule contenenti emoglobina fetale (Hb F) in colture materne. In questo lavoro, di 627 gravidanze tra le 16 e 28 settimane gestazionali, 129 dimostrarono cellule contenenti emoglobina fetale: le percentuali erano del 5-10% alle epoche gestazionali più precoci e

crescevano all'aumentare delle settimane di gravidanza.

Sebbene la presenza di emoglobina fetale non necessariamente caratterizzi esclusivamente cellule fetali, questi dati sollevavano l'ipotesi che la circolazione materna potesse davvero contenere cellule fetali. Questo lavoro è uno dei tanti eseguiti in una era in cui gli ostetrici trattavano gravide con incompatibilità Rh (e, ovviamente, le cellule fetali devono raggiungere il sangue materno per produrre una isoimmunizzazione Rh).

Sulla base delle suddette evidenze, i citogenetisti iniziarono a ricercare le cellule fetali nel sangue materno utilizzando tecniche convenzionali che tuttavia si dimostrarono inadatte. Successivamente si cercò sia di isolare linfociti od altre cellule del sangue periferico, sia di identificare anticorpi trofoblasto-specifici. Un esempio ne è il lavoro di Covone *et al* del gruppo del Prof. Adinolfi [4,5]. Si pensò inizialmente che l'anticorpo monoclonale H315 fosse trofoblasto-specifico e dunque in grado di identificare trofoblasto fetale nel sangue materno; soltanto in un secondo momento divenne evidente che questo anticorpo aderiva ai linfociti materni.

Per questo motivo nacque grande scetticismo negli anni '80 circa un approccio immunologico per l'isolamento di cellule fetali dal sangue materno.

Verso la fine degli anni '80 ed i primi anni '90, le tecnologie molecolari portarono nuove conferme alle ipotesi che cellule fetali esistessero nel sangue materno. La *Polymerase Chain Reaction (PCR)* venne usata per dimostrare la presenza di sequenza Y nel sangue di donne gravide con feto maschio. Successivamente, la *Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)* con sonde cromosoma-specifiche venne impiegata per individuare

trisomie fetali in donne gravide con feti affetti da trisomia 18 e 21.

Lo *et al.* [6,7] furono i primi ad utilizzare la PCR per verificare la presenza del cromosoma Y nel sangue di donne gravide con feto maschio. Nel loro studio, la sequenza Y era presente in tutte le 12 donne che ebbero un neonato maschio ma in nessuna di quelle che diedero alla luce un neonato femmina.

Nel complesso, l'utilizzo della PCR per individuare una sequenza Y portò alla convinzione che cellule fetali, o comunque DNA specificatamente fetale, fossero certamente presenti nel sangue materno. Il passo successivo fu quello di elaborare tecniche di marcatura e di selezione delle cellule; quelle selezionate venivano poi sottoposte a Fluorescent In Situ Hybridization (FISH).

Concludendo, coloro che hanno lavorato in questo ambito hanno sperimentato parecchie “false partenze” negli ultimi decenni. Tuttavia, l'insistenza sembra avere dato i suoi frutti e solidi studi supportano la oramai certezza, che le cellule fetali esistano davvero nel sangue materno e che possano essere isolate per essere analizzate.

Biologia Fondamentale

Relazioni anatomiche tra feto e madre

Lo sviluppo della placenta umana

La placenta umana è un organo emocoriale, di forma discoide, dove il sangue materno viene in contatto diretto con le cellule trofoblastiche fetali che ricoprono i villi placentari.

Lo sviluppo della placenta stessa inizia non appena si verifica l'impianto della blastocisti nell'endometrio, approssimativamente da sei e sette giorni dopo l'ovulazione e la fecondazione.

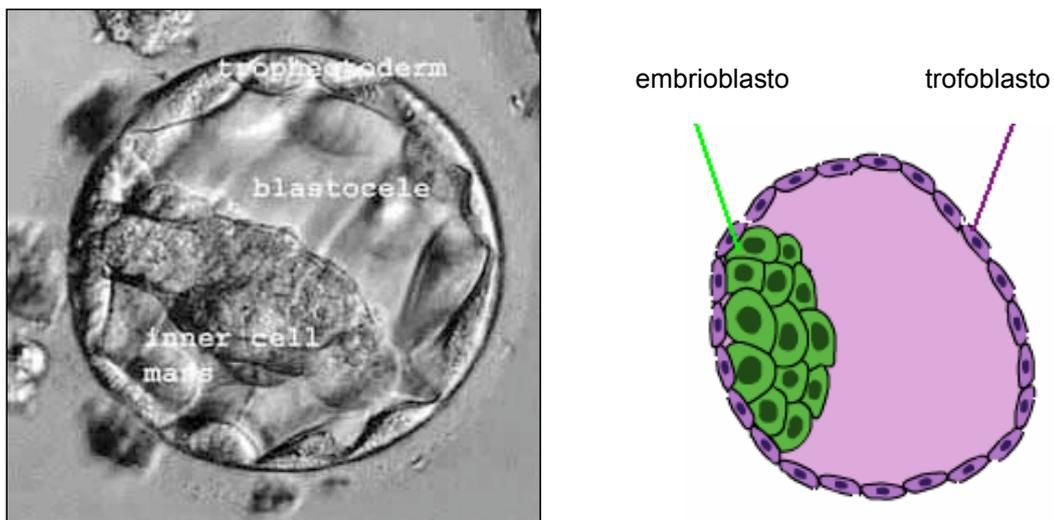


Figura 1: Foto al microscopio elettronico di blastocisti e disegno semplificato

La blastocisti assomiglia ad una vescicola appiattita; la maggior parte delle cellule formano il guscio esterno (trofoblasto) che delimita la cavità della blastocisti stessa, ed adiacente alla sua superficie interna si trova un piccolo gruppo di cellule che forma l'embrioblasto. Il polo embrionario o di impianto della blastocisti prende per primo contatto con l'endometrio, ed il sito di impianto più comune è la parte superiore della parete uterina

posteriore, in corrispondenza del piano medio-sagittale.

Durante la fase di attacco e successivo impianto nell'epitelio endometriale, le cellule del polo embrionario di impianto proliferano a formare un trofoblasto bi-stratificato. Lo strato più esterno, in diretto contatto con i tessuti materni, si trasforma in sinciziotrofoblasto attraverso la fusione di cellule trofoblastiche vicine. I rimanenti componenti cellulari della parete della blastocisti, che non prendono contatto con i tessuti materni, rimangono distinte e separate e prendono il nome di citotrofoblasto.

Il sinciziotrofoblasto non ha potenzialità rigenerative. Al contrario il citotrofoblasto funge da fonte di "cellule staminali" che garantiscono la crescita del trofoblasto stesso grazie ad una proliferazione continua, e successiva fusione a formare il sinciziotrofoblasto. Quest'ultimo si presenta come un sistema acellulare, senza spazi intercellulari, non composto da unità sinciziali individuali.

Nei giorni successivi, al procedere dell'invasione, nuove aree della superficie del trofoblasto vengono in contatto stretto con i tessuti materni ed a questo processo seguono quelli di proliferazione trofoblastica e successiva fusione sinciziale. Il polo di impianto non si presenta come una superficie liscia, ma come una massa coperta da digitazioni ramificate che invadono in profondità l'endometrio. Questo primo stadio che dura fino al giorno 7-8 dopo il concepimento è stato definito come **stadio prelacunare**.

Al giorno 8 post-concepimento, piccoli vacuoli compaiono al polo di impianto nella massa allargantesi di sinciziotrofoblasto: essi si allargano e confluiscono tra loro a formare il cosiddetto **sistema lacunare**.

Al giorno 12 post-concepimento la blastocisti è così profondamente impiantata che l'epitelio uterino la ricopre interamente. Dal momento in cui hanno avuto inizio la proliferazione trofoblastica e la fusione sinciziale al polo di impianto, la parete del trofoblasto è considerevolmente più spessa in questo punto che non al polo opposto (anti-impianto). Il trofoblasto più spesso al polo di impianto viene più tardi trasformato in placenta, mentre la circonferenza più sottile di trofoblasto rimanente, più tardi vede una trasformazione regressiva nel corion liscio, "le membrane".

La formazione delle lacune suddivide il trofoblasto che ricopre la blastocisti in tre strati:

- Il piatto corionico primario, che si affaccia sulla cavità della blastocisti
- Il sistema lacunare
- Il guscio trofoblastico che prende contatto con l'endometrio.

Negli stadi precoci dell'impianto, l'erosione dei tessuti materni si verifica tramite l'azione litica del sinciziotrofoblasto. In un secondo momento, l'attività proliferativa del citotrofoblasto e la sua rapida migrazione nella profondità dell'endometrio, sembrano essere responsabili dell'invasione successiva e dunque, dell'ulteriore espansione dell'area di impianto. Nel corso di questo processo lo stroma endometriale subisce notevoli trasformazioni: la presenza del trofoblasto che erode, induce le cellule stromali endometriali a proliferare ed allargarsi, dando così origine alle cellule deciduali.

L'attività di invasione del sinciziotrofoblasto basale causa la

disintegrazione delle pareti dei vasi endometriali materni a partire dal 12° giorno post-concepimento. La successiva invasione del trofoblasto forma poi la base anatomica per la creazione finale di inlets arteriolari come di outlets venosi dal sistema lacunare.

Studi morfologici (Hustin *et al* 1988), e clinici con l'uso dell'ecografia e del Doppler (Schaaps & Hustin 1988), suggeriscono che un **vero flusso di sangue materno nella placenta umana normale si stabilisca dopo la 12° settimana gestazionale**. Nelle settimane precedenti soltanto plasma materno perfonde gli spazi intervillosi, le prime cellule a comparirvi sono leucociti polimorfonucleati, mentre l'ingresso degli eritrociti viene bloccato da aggregati di citotrofoblasto nel lume delle arterie spirali. La maggior parte dei placentologi è d'accordo nell'affermare che una vera e propria circolazione intervillosa si stabilisca soltanto dal secondo trimestre in poi (Bernischke & Kaufmann 2000).

A partire dal giorno 13 post-concepimento con il loro accrescimento in lunghezza e diametro, i cosiddetti villi primari vengono invasi da citotrofoblasto, segnando l'inizio dello **stadio villosa** della placentazione. Con il ramificarsi dei villi primari, comincia lo sviluppo dell'albero villosa, contemporaneamente, il sistema lacunare si trasforma nello spazio intervilloso.

Solo due giorni più tardi (giorno 15), le cellule mesenchimali che derivano dal mesenchima extraembrionario del piatto corionico primitivo, iniziano ad invadere i villi, trasformandoli in villi secondari.

A partire dai giorni 18-20 post-concepimento possono essere osservati nel contesto del mesenchima i primi capillari fetali, i quali derivano da cellule progenitrici emangioblastiche differenziantesi localmente dal mesenchima (King 1987; Demir *et al* 1989). La comparsa di capillari nel contesto dello stroma villosa segna l'inizio dello sviluppo dei primi villi terziari. Fino al termine, tutti i villi fetali vascolarizzati possono essere chiamati con questo nome, essi cioè rappresentano la stragrande maggioranza dei villi.

L'espansione, l'accrescimento del precoce albero villosa avviene poi nel seguente modo (Castellucci *et al* 1990): alla superficie dei villi più grandi la proliferazione locale di citotrofoblasto, con susseguente fusione sinciziale, causa la produzione di gemme sinciziali. Esse sono strutturalmente compatibili con i villi primari precoci e sono formate soltanto da trofoblasto. La maggior parte delle gemme sinciziali degenera, probabilmente per condizioni locali sfavorevoli, e soltanto una piccola parte viene invasa dal mesenchima villosa. La formazione di vasi fetali all'interno dello stroma, con successivo accrescimento in lunghezza e larghezza dello stesso, è caratteristico della trasformazione in nuovi villi mesenchimali. Lungo la loro superficie, nuove gemme vengono prodotte.

La barriera placentare

Le circolazioni materna e fetale vengono tra loro in stretto contatto non appena una circolazione intravillosa venga a stabilirsi. Entrambi i flussi sono sempre separati dalla **barriera placentare**, formata dai seguenti strati:

- uno strato continuo, ininterrotto di sinciziotrofoblasto che ricopre la

- superficie villosa e delimita lo spazio intervilloso,
- uno strato di citotrofoblasto (cellule di Langhans) dapprima completo, poi al secondo e terzo trimestre discontinuo,
 - la membrana basale trofoblastica,
 - tessuto connettivo,
 - endotelio fetale (circondato da una membrana basale ultrastrutturalmente evidente soltanto nell'ultimo trimestre).

La barriera placentare è una delle strutture più importanti, in quanto assicura il transfer materno-fetale di nutrienti necessari alla crescita fetale. Lo spessore di suddetta barriera si assottiglia con il procedere della gravidanza, e contemporaneamente il flusso sanguigno fetale e la pressione sanguigna aumentano.

Un possibile sito di aumentato scambio di nutrienti e gas è la membrana vasculo-sinciziale: a questo livello i capillari fetali sono estremamente vicini alla superficie del villo, il citotrofoblasto è o estremamente sottile o assente, e la "membrana" è costituita da endotelio, membrana basale e sincizio; essa è l'aspetto più sottile della barriera tra globuli rossi materni e fetali, e costituisce il sito preferenziale per l'interscambio cellulare.

E' intuitivo immaginare che la rottura di questa sottile membrana comporti emorragia fetale nello spazio intervilloso. Rotture della superficie dei capillari fetali si verificano di frequente: esse risultano in piccole emorragie fetali negli spazi intervillosi. Vi è abbondante letteratura circa la frequenza ed entità di questi sanguinamenti fetali [8]. Trombi intervillosi si formano più comunemente in placentate con alterata circolazione intervillosa, come nel caso di idrope fetale, pazienti preeclampatiche ed altre condizioni

ancora. Quando vengono utilizzati metodi immunologici per distinguere le cellule fetali dalle materne nel contesto di questi trombi intervillosi, una grande percentuale di cellule fetali viene individuata. **Ciò suggerisce che questo possa essere un punto di ingresso delle cellule fetali nel sangue materno.**

Durante i successivi periodi di sviluppo, i villi terziari sono oggetto di un complesso processo di differenziazione, che risulta in villi di vario tipo che tra loro si distinguono in termini di struttura e differenziazione. Questo processo, è in parallelo con modificazioni quali e quantitative della barriera placentare. Il sinciziotrofoblasto si riduce in spessore da più di 20 μm a mediamente 3.5 μm . La quantità di citotrofoblasto diminuisce e, a termine, può essere rinvenuto soltanto nel 20% della superficie villosa. Il diametro medio dei villi diminuisce, cosicché i villi nuovamente formati sono più piccoli di quelli precedenti. A causa di questo processo maturativo, la posizione dei capillari fetali nel contesto dello stroma villosa si avvicina sempre più alla superficie del villo stesso. In numerosi punti inoltre, la lamina basale dei capillari si fonde con quella del trofoblasto, riducendo ulteriormente la barriera placentare in termini di spessore e numero di strati.

In conclusione, tutti questi fattori risultano in una riduzione della distanza di diffusione media materno-fetale da circa 50-100 μm al secondo mese a 4-5 μm a termine.

week post conception (p.c.)	week post menstruation (p.m.)	month post menstruation (p.m.)	crowm-rump length (Kaufmann, 1981)	embryonic/fetal weight (Kaufmann, 1981)	placental weight (Kaufmann, 1981)	placental weight per fetal weight (Kaufmann, 1981)	mean length of umbilical cord (Winckel, 1893)	mean placental diameter (Boyd & Hamilton, 1970)	placental thickness postpartum (Boyd & Hamilton, 1970)	placental thickness, incl. uterine wall by ultrasound (Johannigmann et al, 1972)	villous volume per placenta (Knopp, 1960)	villous surface per placenta (Knopp, 1960)	mean trophoblastic thickness (Benirschke & Kaufmann, 2000)	volume of fetal vessel lumina per villous volume (Kaufmann, 1981)	percentage of villous surface covered by Langhans cells (Kaufmann, 1972)	mean maternofetal diffusion distance (Kaufmann & Scheffen, 1992)
			mm	g	g	g/g	mm	mm	mm	mm	g (%)	cm ²	µm	%	%	µm
1																
2		1														
3	1															
4	2															
5	3		2.5													
6	4															
7	5	2	5				5									
8	6		9										18.9	2.7		55.9
9	7		14	1.1	6	5.5					5 (83%)	830	19.1	3.0	85	
10	8		20	2									21.6	4.0		
11	9	3	26	5	14	2.8										
12	10		33	11												
13	11		40	17	26	1.5					18 (29%)	3020			80	
14	12	4	48	23			160	50								
15	13		56	30	42	1.4			10							
16	14		65	40												
17	15		75	60	65	1.1	180	75	12		28 (43%)	5440		6.0	80	40.2
18	16		88	90			220	75								
19	17	5	99	130	90	0.69							11.6	6.3		
20	18		112	180												
21	19		125	250	115	0.46	300	100	15	28	63 (55%)	14 800		6.6	60	22.4
22	20		137	320			330	100								
23	21	6	150	400	150	0.38										
24	22		163	480												
25	23		176	560	185	0.33	350	125	18	34	102 (55%)	28 100			55	21.6
26	24		188	650			370	125								
27	25	7	200	750	210	0.28										
28	26		213	870												
29	27		226	1000	250	0.25	400	150	20	33	135 (54%)	42 200	9.7	9.1	45	
30	28		236	1130			420	150								
31	29	8	250	1260	285	0.23										
32	30		263	1400												
33	31		276	1550	315	0.20	450	170	22	43	191 (61%)	72 200			35	20.6
34	32		289	1700			460	170								
35	33	9	302	1900	355	0.19										
36	34		315	2100												
37	35		328	2300	390	0.17	490	200	24	45	234 (50%)	101 000	5.2	21.3	25	11.7
38	36		341	2500			500	200								
39	37	10	354	2750	425	0.15										
40	38		367	3000												
	39		380	3400	470	0.14	520	220	25	45	273 (58%)	125 000	4.1	28.4	23	4.8

Tabella 1: Tabella riassuntiva delle principali caratteristiche dello sviluppo placentare. Tutti i dati si riferiscono al termine della corrispondente settimana/mese di gravidanza (tratto da "Haines & Taylor, *Obstetrical and Gynaecological Pathology*", Fifth Edition, Churchill Livingstone, 2003).

Base biologica del passaggio di materiale cellulare fetale nella circolazione materna

Il sangue materno nello spazio intervilloso è in diretto contatto con il sinciziotrofoblasto, uno strato sinciziale continuo, il più superficiale dei villi placentari.

Tuttavia, con il procedere della gravidanza può verificarsi una degenerazione focale del sinciziotrofoblasto, una locale interruzione che viene chiusa nell'arco di alcuni giorni con materiale fibrinoso derivante dal processo di coagulazione (Frank *et al*, 1994).

Infatti, nel corso di studi istologici placentari di routine, è comune trovare difetti nella continuità trofoblastica dei villi, colmati da piccoli depositi di fibrina o fibrinoidi. Questo materiale eosinofilo si accumula nel corso della gestazione e in un secondo momento può calcificare. Kline ha descritto queste aree per primo come siti di possibile "sanguinamento e coagulazione fetali", a volte anche chiamate "lesioni di Kline".

I due componenti dello strato trofoblastico sono separati dallo stroma villosa posto al centro, da una membrana basale. Il mantello trofoblastico dei villi è il principale sito dello scambio placentare e delle funzioni secretorie, mentre il sottostante strato di cellule di Langhans funge da fonte di cellule staminali, necessarie alla crescita del sinciziotrofoblasto attraverso la fusione sinciziale. La proliferazione del citotrofoblasto è regolata dalla disponibilità di ossigeno come accade anche per altre popolazioni cellulari.

Alla superficie del sinciziotrofoblasto, in seguito alla continua incorporazione di citotrofoblasto, si accumulano nuclei apoptotici sinciziali e vecchi, detti nodi o gemme sinciziali, che vengono sfaldati nella

circolazione materna nell'arco di 3-4 settimane. Una volta immessi nel circolo materno tuttavia il loro destino rimane incerto: è stato documentato il loro arresto nei capillari polmonari dove vanno incontro a fagocitosi. Mettendo in relazione l'attività proliferativa con l'incidenza di apoptosi nel trofoblasto villosa, Huppertz *et al* (1998) conclusero che durante il terzo trimestre soltanto il 10% di citotrofoblasto incluso per il processo di fusione è necessario per l'accrescimento della superficie villosa, mentre circa l'85% viene sfaldato attraverso l'apoptosi tramite i nodi sinciziali nel circolo materno. Questo corrisponde circa a 3 grammi di trofoblasto al giorno rilasciati nel circolo materno.

Il processo di apoptosi richiede uno substrato energetico (Cotter *et al* 1990); ecco che consensualmente esso si verifica in gravidanze normossiche o solo lievemente ipossiche. In condizioni di ipossia severa, la cascata dell'apoptosi viene interrotta e ciò risulta in un secondario processo di necrosi del sinciziotrofoblasto. Il materiale necrotico fatto di nodi sinciziali e frammenti sinciziali più piccoli viene anch'esso liberato nel sangue materno.

Le cellule fetali nel sangue materno: la linea eritroide

Biologia dell'eritropoiesi

Il prelievo non-invasivo di cellule fetali è di grande interesse nel campo della diagnosi prenatale. Cellule fetali candidate ad essere ricercate nel sangue periferico materno sono leucociti, cellule eritroidi e cellule trofoblastiche.

E' stato calcolato che l'ammontare del passaggio di cellule fetali nel circolo materno nel primo e secondo trimestre è in media di circa 2 μ l al giorno (o un totale di 50-200 μ l per trimestre) [9]. Secondo altre valutazioni 1/50.000 cellule materne è di origine fetale [10]. Uno studio più recente ha evidenziato che questo rapporto aumenta da 1/144.000 a 15 settimane di gravidanza, a 1/4.000 nella gravidanza avanzata [11].

Zirpusky *et al* furono i primi a dimostrare la presenza di eritrociti fetali nel sangue materno (anche se immediatamente dopo il parto), utilizzando la reazione di Kleihauer-Betke per l'emoglobina fetale [12]. Eritroblasti e reticolociti fetali sono stati individuati precocemente nel sangue materno già alla 16^a settimana di gravidanza da Bianchi *et al.* utilizzando *FACS* (*Fluorescence Activated Cell Sorter*), con anticorpi monoclonali per il recettore della transferrina (TfR) [13].

La presenza invece di cellule fetali della linea bianca nel sangue di donne gravide è stata suggerita per primo da Walknowka, basandosi sul rinvenimento del cariotipo XY nello 0.2-1% dei linfociti [14].

L'isolamento di linfociti fetali si basa sulle differenze HLA tra feto e madre e prevede l'utilizzo di anticorpi contro alcuni determinanti HLA, ereditati dal

padre ed assenti nella madre. Questo metodo non è tuttavia applicabile in ambito clinico: è molto difficile prevedere l'aplotipo del concepito, anticorpi materni possono in parte distruggere i linfociti fetali circolanti influenzando la detection rate, i linfociti fetali persistono per molto tempo nel sangue materno rendendo difficile stabilire se quelli isolati appartengano alla gravidanza in corso, ed infine, è da tenere presente la variabile della non-paternità.

Per quanto riguarda le cellule trofoblastiche, sebbene circa 100.000 cellule vengano rilasciate ogni giorno, sono solo poche quelle che raggiungono il circolo materno (probabilmente perché la maggior parte rimane intrappolata nel filtro polmonare), e gli studi fatti in merito non hanno riportato risultati soddisfacenti.

Dei tre tipi di cellule fetali rinvenuti nel sangue materno, gli eritroblasti nucleati sembrano i più idonei per i tests prenatali. Essi rappresentano una ottima popolazione di cellule fetali da selezionare, sono presenti in numero significativo nel sangue fetale fin dall'8^a settimana di gravidanza mentre è altamente improbabile circolino nel sangue periferico di un adulto normale. Differenze tra gli antigeni di superficie ed il tipo di emoglobina in essi contenuto (Hb F), rappresentano la base per l'isolamento di eritrociti fetali dal circolo materno.

L'eritropoiesi è un processo complesso e dinamico la cui unità anatomico-funzionale è definita col termine di "eritrone": questo comprende l'intera popolazione cellulare che va dalle cellule staminali orientate in senso eritroide fino agli eritrociti circolanti. L'eritrone midollare comprende i progenitori eritroidi (BFU-E, CFU-E) ed i precursori eritroidi (o eritroblasti).

I “progenitori” eritroidi costituiscono un compartimento di cellule che si situa a metà strada tra le cellule staminali multipotenti ed i precursori eritroidi od eritroblasti; mentre questi ultimi sono riconoscibili al microscopio in base alla loro morfologia, i progenitori eritroidi sono cellule mononucleate identificabili solo sulla base di test funzionali, cioè in rapporto alla loro capacità di generare in vitro una progenie di cellule eritroidi. Il termine “progenitore” dunque è utilizzato per cellule che sono destinate ad una determinata linea cellulare, non sono individuabili morfologicamente, ma sono identificate dalla loro progenie.

Progenitori:	Cellula staminale → BFU-E → CFU-E →
Precursori:	Proeritroblasti → Eritroblasti Basofili → Eritroblasti Policromatofili → Eritroblasti Ortocromatici →
Progenie:	Reticolociti → Eritrociti

Tabella 2: Schema dell'eritropoiesi

La più precoce cellula eritroide è chiamata BFU-E (burst forming unit erythroid) [15]. Essa è in grado di dare origine, in terreno di coltura semisolido (es. metilcellulosa), ad aggregati cellulari che dopo 14-16 giorni di incubazione danno origine a macrocolonie (burst), di 30.000-40.000 cellule: eritroblasti (ortocromatici e policromatofili) ed eritrociti maturi ricchi di emoglobina.

Un progenitore più maturo è il CFU-E (colony forming unit erythroid), che genera in coltura dopo 7 giorni aggregati più piccoli di cellule emoglobinizzate (8-65 cellule).

I “precursori” sono più maturi dei progenitori e sono identificabili senza

essere messi in coltura. Nella serie eritroide essi comprendono proeritroblasti, eritroblasti basofili, policromatofili ed ortocromatici. Questi perdono il nucleo e non contengono più DNA.

La “progenie” è invece rappresentata dai reticolociti che poi diventano eritrociti.

Vi sono numerose differenze tra l'eritropoiesi dell'adulto e quella embrionale-fetale:

1) Anzitutto, nelle varie fasi di sviluppo embrio-fetale si verificano “shifts anatomici” del sito di eritropoiesi. Durante la fase dell'eritropoiesi embrionale nel sacco vitellino, aggregati di cellule eritroidi immature vanno incontro a maturazione. Prima che il processo maturativo sia completato, esse iniziano a circolare ed alla 5^a settimana di gravidanza si trovano negli spazi vascolari dell'ancora rudimentale fegato. Circa nello stesso momento, foci di cellule immature eritroidi aumentano nel fegato fetale, cioè quando inizia la fase epatica o fetale dell'eritropoiesi. Dalla 7^a settimana in poi, il fegato si arricchisce progressivamente di precursori eritroidi e diventa il principale sito di produzione di cellule eritroidi fino alla 30^a settimana gestazionale. Dopo il sesto mese, tutte le cavità midollari ossee sono coinvolte nella produzione eritroide e la fase epatica (fetale) si avvia verso la sua fine, seguita dalla fase finale (adulta) del processo che si svolge nel midollo osseo.

2) Numerosi studi suggeriscono che i progenitori eritroidi fetali siano differenti da quelli dell'adulto [16,17], ed è possibile utilizzare colture di cellule mononucleate da sangue materno per aumentare la proporzione di cellule progenitrici fetali in relazione a quelle adulte, manipolando la

coltura o le condizioni di coltura.

3) L'eritropoietina è necessaria per la proliferazione di BFU-E adulti e fetali; quelle fetali sono tuttavia molto più sensibili all'eritropoietina rispetto a quelle adulte, con una $Ep^{1/2}$ fetale ($Ep^{1/2}$ = l'eritropoietina necessaria per ottenere il 50% della crescita massimale) di 0.3 U/ml in paragone a quella adulta di 0.4 U/ml. In questo modo la scelta delle concentrazioni di eritropoietina utilizzate per le colture potrebbe essere importante per un selettivo arricchimento in progenie eritroide fetale.

4) Colonie cellulari derivate da BFU-E fetali sono più grandi di quelle derivate da BFU-E adulti, caratterizzate da un maggiore numero di sub-colonie cellulari e da un maggior numero di cellule in totale. Dal momento che le colonie fetali sono più grandi, l'amplificazione relativa è sostanzialmente dieci volte maggiore. Questo significa che colture di cellule mononucleate derivate dal circolo materno, portano ad un relativo arricchimento di progenie fetali in confronto a quelle adulte.

5) Infine, un'altra "ovvia" distinzione tra progenitori materni e fetali è che nelle colonie di eritroblasti fetali venga sintetizzata prevalentemente emoglobina fetale; questo ha un potenziale applicativo in diagnosi prenatale, nel campo delle emoglobinopatie come anche nella identificazione della progenie fetale stessa.

A parte le variazioni in termini di dimensioni e morfologia, cellule embrionali e fetali differiscono dalle loro controparti adulte per molte altre caratteristiche, come la risposta ai fattori di crescita, il potenziale proliferativo. I cambiamenti più ampiamente studiati dell'eritropoiesi fetale sono gli "switches" emoglobinici.

Gli eritroblasti embrionali si caratterizzano per la sintesi delle emoglobine

Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\varepsilon_2$). Le catene globiniche ζ ed ε sono rispettivamente la forma embrionale delle catene α e β .

Lo switch dal gene globinico ζ ad α e da quello ε a γ , inizia già nella fase embrionale dell'eritropoiesi ma si completa nella fase fetale.

Il tipo predominante di emoglobina sintetizzato nel fegato fetale è l'emoglobina fetale, Hb F ($\alpha_2\gamma_2$), caratterizzata da una maggior affinità per l'ossigeno in confronto a quella dell'adulto, necessaria a causa della bassa tensione di ossigeno nel sangue fetale; l'emoglobina dell'adulto, Hb A ($\alpha_2\beta_2$), è presente già alle fasi precoci dell'eritropoiesi fetale epatica. Dalla 30^a settimana gestazionale in poi, aumenta gradualmente la sintesi della β -globina, così a termine il 50-55% dell'emoglobina sintetizzata è Hb A. Dopo 4-5 settimane dalla nascita il 75% dell'emoglobina è Hb A, percentuale che cresce al 95% dopo 4 mesi quando lo switch da fetale ad adulto è completato.

Gli eritroblasti nucleati

Nell'ambito delle ricerche sulla diagnosi prenatale non invasiva l'attenzione si è concentrata sul recupero selettivo di cellule fetali nucleate, ed in particolare sugli eritroblasti nucleati (nRBS).

Con una documentata variabilità biologica tra paziente e paziente, gli eritroblasti nucleati sono molto rari nel sangue periferico delle gravide: ecco che, qualunque eritroblasto individuato nel sangue periferico materno viene considerato di origine fetale. Sebbene il numero preciso di cellule fetali in un campione di sangue vari da persona a persona, è evidente che per ciascun campione vi siano pochissime cellule fetali e moltissime cellule materne.

L'interesse si è sempre più focalizzato sugli eritroblasti nucleati ed i loro precursori per alcune peculiari caratteristiche:

1. hanno ciclo vitale breve,
2. sono relativamente bene differenziati,
3. sono mononucleati (a differenza delle cellule multinucleate del sinciziotrofoblasto),
4. abbondano nel sangue fetale al primo trimestre,
5. contengono emoglobina fetale (Hb F) che ne rappresenta un marker sesso indipendente.

Gli eritroblasti nucleati sono le cellule di scelta, primariamente perché riflettono lo status citogenetico della gravidanza attuale.

Al contrario dei linfociti essi hanno un ciclo vitale piuttosto breve ed in circostanze normali, l'eritroblasto condensa ed espelle il proprio nucleo in circa 90 giorni, perdendo così ogni capacità mitotica [18]. Questo significa che gli eritroblasti nucleati se individuati, contrariamente ai linfociti, necessariamente appartengono alla gravidanza in corso e non possono essere riferiti ad un precedente bambino.

La persistenza postpartum di cellule fetali infatti ha scatenato molte discussioni in merito alla possibilità di errore diagnostico derivante dall'analisi di cellule fetali relative ad una precedente gravidanza.

Schroeder ha descritto la presenza di linfociti con patrimonio genetico maschile, nel sangue materno, fino ad un anno dopo la nascita di un neonato maschio [19]. Ciaranfi ha riportato la circolazione di cellule fetali maschili per cinque anni dopo il parto [20].

In un'altra esperienza sono state studiate otto donne che non erano gravide, ma che avevano partorito un neonato maschio in un periodo

variabile da sei mesi a 27 anni prima: la presenza di una sequenza amplificata del cromosoma Y era considerata prova della presenza di cellule maschili persistentemente circolanti. Delle otto donne, sei avevano DNA maschile nelle cellule CD 34⁺ e CD 38⁺, considerate precursori ematopoietici della linea linfoide. Il fatto che le donne possano diventare permanentemente chimere di basso grado è un'osservazione sorprendente che richiede ulteriori approfondimenti [21].

Proprio perché è importante conoscere per quanto tempo sopravvivano gli eritroblasti nucleati nel sangue materno sono stati confrontati i campioni di sangue prelevati da 59 primigravide, e da 163 donne con una o più gravidanze precedenti: dopo arricchimento e purificazione nei due gruppi non sono state dimostrate differenze in termini di numero di eritroblasti nucleati [22].

Altra peculiarità degli eritroblasti nucleati, dimostrata da numerosi lavori, è che si tratta delle cellule fetali nucleate più rappresentate nella gravidanza precoce [23]. Questo è dovuto al fatto che la precoce formazione del sangue nel sacco vitellino e poi nel fegato fetale è principalmente ematopoietica. Cellule fetali della serie bianca non vengono prodotte in quantità significative al primo trimestre, dunque è improbabile ritrovarle nella circolazione materna in una gravidanza iniziale.

Infine vi sono anche aspetti pratici che fanno prediligere gli eritroblasti alle altre cellule: per esempio non ha grande importanza l'intervallo di tempo che intercorre tra la raccolta del campione di sangue e l'analisi del campione stesso, rendendo il processo un po' più maneggevole.

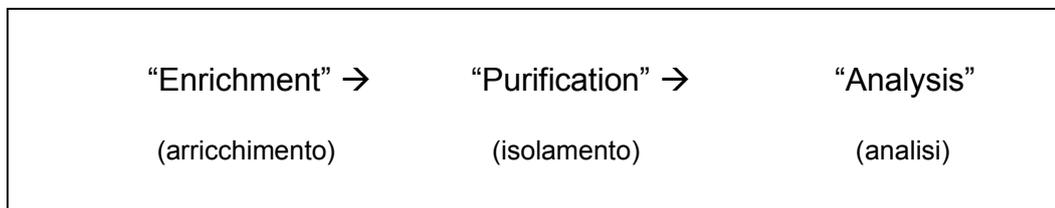
A questo proposito sono stati presi in studio 256 campioni di differente

“età” divisi in tre gruppi (181 con intervallo prelievo-analisi <24 ore, 41 casi tra 24 e 48 ore e 34 casi con un intervallo >48 ore). Non vi erano differenze significative nel numero assoluto di eritroblasti nucleati selezionati nei tre gruppi, vale a dire che la presenza dei nRBC non è influenzata dall’età del campione di sangue [22].

Questo è ancor più importante alla luce del fatto che ogni fase del processo di manipolazione in laboratorio del sangue materno produce una perdita di una parte, delle già poche cellule fetali, in esso contenute. Dovrebbe rimanere almeno un numero minimo di 25 cellule fetali dopo i passaggi di arricchimento e purificazione per permettere una accurata analisi citogenetica.

Approccio generale all’isolamento di cellule fetali dal sangue materno

Tutti gli studi clinici in quest’ambito iniziano con un prelievo di 20 ml di sangue venoso periferico materno, che dovrà essere sottoposto a tre passaggi fondamentali:



La prima fase di arricchimento (“enrichment”), facilita la rimozione di un gran numero di cellule materne, o tramite la centrifugazione per gradiente di densità o mediante la lisi di eritrociti non-nucleati.

La successiva purificazione (“purification”) consiste nella separazione vera e propria delle cellule materne da quelle fetali, arrivando alla

individuazione ed isolamento di queste ultime.

L'identificazione finale delle cellule isolate ("analysis") viene effettuata tramite PCR (Polymerase Chain Reaction) di sequenze geniche fetospecifiche od ibridizzazione in situ per fluorescenza (FISH). Sebbene fino ad oggi numerosi lavori abbiano dimostrato la "fattibilità" di questo percorso diagnostico non-invasivo, le tecniche correnti non sono ancora sufficientemente pratiche ed affidabili per farne un uso clinico su larga scala.

In particolare "l'anello debole" del processo su descritto è senz'altro la seconda fase, quella della "purification", cioè l'isolamento delle cellule fetali. In effetti, mentre le tecniche di arricchimento ed analisi sono di uso comune in laboratorio e dunque bene collaudate, numerosi sono i problemi legati all'isolamento, e, fino ad oggi, non è ancora stato individuato un metodo dotato delle sensibilità e specificità sufficienti.

Le problematiche principali si possono riassumere come segue:

1. grande numero di cellule da processare rapidamente,
2. contaminazione del campione in esame da parte di cellule materne,
3. velocità di lavoro (numero di cellule processate/ora),
4. costi delle attrezzature,
5. necessità di personale specializzato nell'uso delle suddette attrezzature.

Tra le tecniche di purificazione in uso da più tempo si annoverano la FACS, la MACS e la colonna di immunoaffinità biotina-avidina.

La tecnica FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) è uno strumento

sicuramente valido per selezionare cellule quantitativamente rare. Uno dei primi studi che ne hanno fatto uso nella ricerca di cellule fetali nel sangue materno risale addirittura al 1979. In questo lavoro linfociti fetali sono stati individuati nel sangue periferico tramite immunofluorescenza indiretta: prima fu usato un antisiero di coniglio diretto contro antigeni di superficie HLA, ereditati dal padre ed assenti nella madre, poi vennero aggiunte immunoglobuline di scimmia anti-coniglio marcate con fluoresceina [24].

L'applicazione su grande scala di questa tecnica tuttavia, è ostacolata dal fatto che l'attrezzatura necessaria è estremamente costosa, richiede per l'appunto la presenza di personale altamente specializzato e che complessivamente la procedura è molto lenta.

La tecnica MACS (Magnetic Activated Cell Sorting), è anch'essa in grado di selezionare le rare cellule fetali tra le molte cellule materne, con alcuni vantaggi rispetto alla FACS (le strumentazioni meno costose, la procedura più semplice), senza però essere ancora una volta utilizzabile su larga scala in campo clinico.

Lo stesso vale per la colonna di immunoaffinità biotina-avidina: in questo modello, un anticorpo monoclonale anti-antigene fetale e coniugato con biotina, è incubato con una sospensione di cellule provenienti dal sangue periferico di una gravida. La sospensione viene poi filtrata attraverso una colonna che contiene sfere coniugate con avidina. L'affinità biotina-avidina fa sì che le cellule target rivestite da anticorpi biotinati aderiscano alle sfere di supporto con l'avidina. Le cellule così catturate vengono delicatamente rimosse. Questa tecnica permette di aumentare la concentrazione delle cellule fetali nel sangue materno di circa 1000 volte con un singolo passaggio; anche se il processo viene ripetuto utilizzando

veri e propri cocktail di anticorpi, il problema è che ancor oggi non sono stati individuati anticorpi che si leghino ad antigeni fetali, dotati di sufficiente sensibilità e specificità [25].

Tra le tecniche di selezione, "purification", più recenti ed innovative ricordiamo il sequenziamento di DNA fetale libero "cell free" ed il selezionamento elettronico dielettroforetico (DEP-array), le quali rispetto alle precedenti tecniche hanno fatto notevoli passi in avanti.

Il DEP-array in particolare, consiste in una nuova tecnologia basata su un chip microelettronico che integra circa 100.000 elettrodi e sensori tra loro indipendenti, permettendo la manipolazione in contemporanea ed in parallelo di singole cellule, fino a 10.000, mantenendone le caratteristiche principali quali vitalità e capacità proliferative.

Scopo dello studio

Il presente lavoro è parte di uno studio prospettico multicentrico eseguito presso la Silicon Biosystems® di Bologna, in collaborazione con numerosi Centri sia Universitari che Ospedalieri. Esso si propone di ricercare cellule fetali nel sangue periferico di gravide, che si sono sottoposte a procedure classiche di diagnosi prenatale invasiva quali villocentesi ed amniocentesi. Alle pazienti che hanno aderito al progetto sono stati fatti dei prelievi di sangue, successivamente analizzati nel suddetto laboratorio utilizzando quale metodo di isolamento e purificazione cellulare il selezionamento elettronico dielettroforetico o DEP-array.

Scopo del lavoro, tuttora in corso nella sua parte preliminare, è quello di valutare l'efficacia del DEP-array nel purificare le poche cellule fetali presenti in ciascun campione di sangue, e stabilire se in futuro il selezionamento elettronico dielettroforetico possa essere utilizzato per un nuovo test prenatale non-invasivo da offrire a tutta la popolazione di gravide.

Materiali e Metodi

Reclutamento delle pazienti

Sono state reclutate 211 gravide al primo e secondo trimestre, tra un gruppo più ampio di pazienti che nel periodo Marzo 2008 – Dicembre 2008 hanno riferito alla Clinica Ostetrica dell'Università di Padova, chiedendo un consulto per diagnosi prenatale invasiva (villocentesi ed amniocentesi).

Tale colloquio avveniva in genere intorno alla 6[^]-8[^] settimana gestazionale per quelle pazienti inviate per villocentesi, ed intorno alla 10[^]-12[^] settimana gestazionale per quelle che preferivano sottoporsi ad amniocentesi. Sono state escluse a priori dallo studio, le gravide che eseguivano un'amniocentesi su indicazione dell'infettivologo (ad es. sospetto di infezione fetale da rubeovirus o toxoplasma gondii).

In sede di colloquio prenatale veniva spiegata la possibilità di partecipare ad uno studio multicentrico, di cui era parte anche la Clinica Ostetrica, che si stava occupando della ricerca di cellule fetali nel sangue materno: l'eventuale adesione avrebbe comportato per le pazienti stesse un prelievo di sangue periferico venoso, di 20 ml, eseguito pochi minuti prima della procedura di diagnosi prenatale invasiva prescelta. In ambulatorio veniva consegnato alle pazienti interessate il modulo di consenso, che avrebbero dovuto leggere e riportare firmato in caso di partecipazione il giorno fissato per la villo od amniocentesi.

Raccolta dei campioni

Nel periodo Marzo 2008 – Dicembre 2008 sono stati raccolti 211

campioni, 20 ml di sangue venoso periferico ciascuno, tra le pazienti reclutate.

La mattina in cui venivano eseguite o la villocentesi o l'amniocentesi, dopo avere visualizzato il battito cardiaco fetale ed avere verificato la "fattibilità" dell'esame (misure del feto, posizione della placenta, visualizzazione di un sito di ingresso per l'ago ritenuto abbastanza sicuro) e *PRIMA* di procedere alla manovra invasiva stessa, alle pazienti che avevano dato la loro disponibilità venivano prelevati 20 ml di sangue venoso periferico. Per eseguire il prelievo di sangue non era richiesto il digiuno ed il sangue veniva conservato a temperatura ambiente in provette per emocromo fino alla fine della sessione di diagnosi prenatale di quel determinato giorno. Le provette venivano contrassegnate con un numero progressivo su etichetta, che corrispondeva al numero riportato sul consenso della relativa paziente.

Al termine della mattinata le provette venivano inviate tramite corriere alla Silicon Biosystems® di Bologna unitamente alla seconda parte del modulo di consenso, su cui erano riportati il relativo numero del campione ed alcune informazioni cliniche. In questo modo i campioni pervenivano al laboratorio d'analisi in completo anonimato.

Isolamento delle cellule fetali

I campioni ematici una volta giunti al laboratorio di analisi della Silicon Biosystems® di Bologna, sono stati sottoposti ai tre passaggi necessari all'isolamento delle cellule fetali: arricchimento- purificazione- analisi.

1. Arricchimento: tramite centrifugazione con Ficoll.

2. Isolamento: il campione arricchito è stato prelevato con micropipette e

deposto nella “loading chamber” (camera di caricamento) del chip per il DEP-array; le cellule fetali sono state selezionate da quelle materne in base alla presenza di emoglobina fetale (anticorpi fluorescenti anti catene globiniche γ).

Il DEP-array

Il DEP-array è una nuova tecnica di selezione cellulare, che si avvale di un chip microelettronico con più di 100.000 elettrodi e sensori tra loro indipendenti; esso analizza singole cellule, fino ad un massimo di 10.000 contemporaneamente, che vengono manipolate in parallelo ed una per una.

Il dispositivo permette la cattura, manipolazione e movimentazione di una notevole varietà di cellule grazie a “trappole” dinamiche dielettroforetiche, generate dal chip di silicone e controllate da un'interfaccia elettronico. Con lo sviluppo delle “gabbie” dielettroforetiche tridimensionali, singole cellule vive possono essere catturate all'interno di appunto gabbie, potenzialmente chiuse e generate da campi elettrici non-uniformi, senza al contempo comprometterne vitalità e capacità proliferative.

Il Dep-Array è un dispositivo ibrido di silicone-plastica: il “cuore” è un chip di silicone, coperto da un nastro biadesivo resistente all'acqua ed un coperchio di policarbonato (figure 2 e 3). Il chip ha una superficie di 0.64 cm² ed ospita oltre 100.000 micrositi organizzati come un array planare di elettrodi quadrati di 20 μm ciascuno. Su metà chip i sensori sono elettrostatici, sull'altra metà sono ottici.

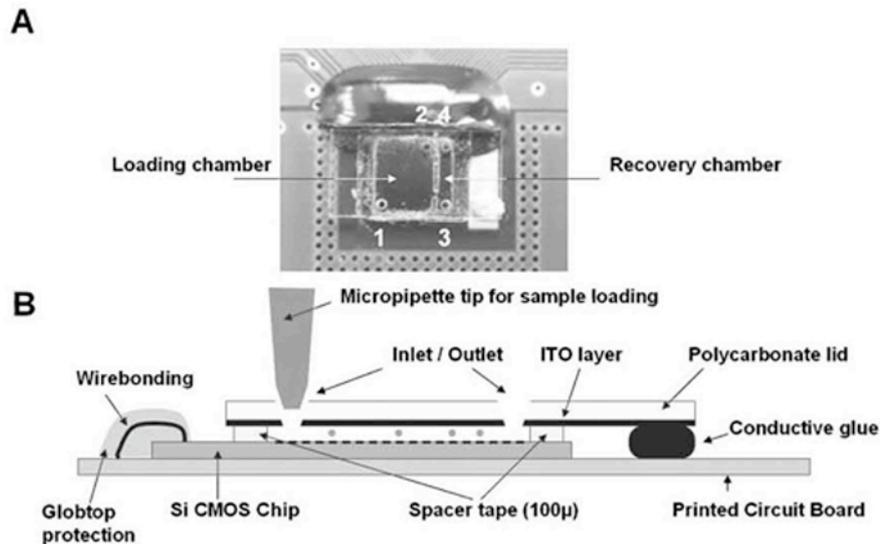


Figura 2: Illustrazione del prototipo DEP-array con un primo piano fotografico **A** ed un disegno della sezione trasversale **B**. Il dispositivo presenta una parte centrale fatta da un chip di silicene di $8 \times 8 \text{ mm}^2$ ed un coperchio di policarbonato con uno strato conduttore (ITO). Questi componenti sono tenuti insieme da un nastro biadesivo spesso $100 \mu\text{m}$ che forma le pareti delle due camere unite da un canale. Le cellule vengono caricate nel dispositivo usando una micropipetta standard **B**.

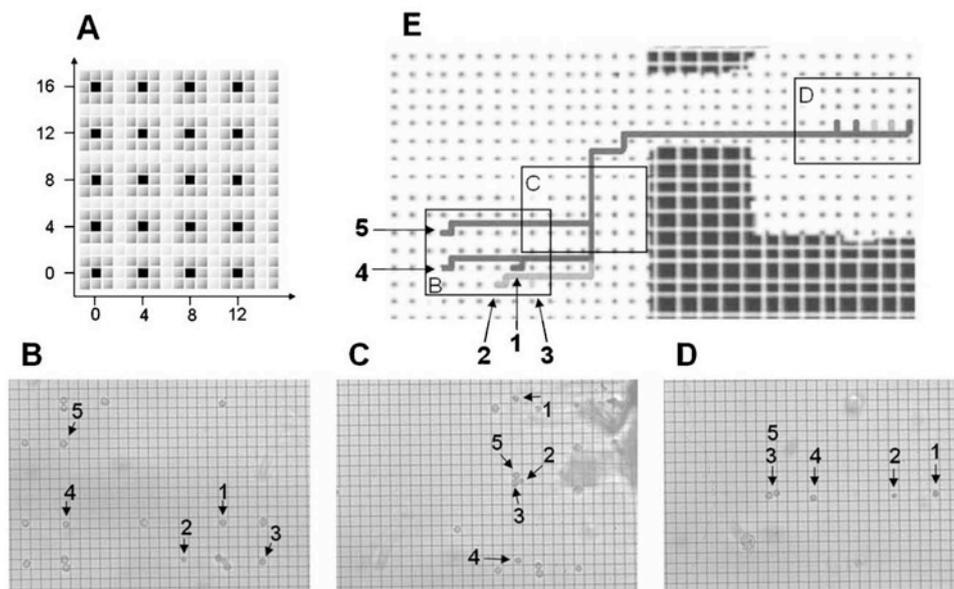


Figura 3: Organizzazione delle cellule nelle gabbie del DEP-array: **A** illustra la griglia di gabbie, dove una gabbia è creata ogni 4 elettrodi. **B** è una fotografia di un'area del dispositivo fatta con un microscopio standard, pochi secondi dopo averlo caricato con cellule K 562. **C,D** mostrano una sequenza di fotografie da un breve filmato al microscopio, dove 5 cellule (indicate dalle frecce) sono fatte viaggiare, indipendentemente e simultaneamente, dalle loro coordinate di partenza alla camera di raccolta (arrivo).

Movimento, selezione e recupero delle cellule

Nel dispositivo DEP-array le cellule vengono spostate da una gabbia all'altra applicando ad elettrodi vicini, nella direzione del movimento desiderato, lo stesso pattern di onde sinusoidali dielettroforetiche: viene cioè generata una nuova gabbia dielettroforetica in cui la cellula target viene spinta, viaggiando alla velocità media di circa 1 mm al minuto (approssimativamente un elettrodo al secondo).

Pochi microlitri della sospensione di cellule campione vengono caricati nell'apposito sito con una micropipetta sul chip (vedi fig. 2B), ed i sensori sia elettrostatici che ottici elaborano un'immagine di 320x320 pixel, in cui ciascun pixel corrisponde ad un singolo microsito sul chip; in questo modo vengono determinate le precise coordinate di ogni elemento presente sul chip (anche delle eventuali bolle d'aria), che vengono integrate dal software di controllo.

Terminata questa fase di distribuzione ed elaborazione delle coordinate sul chip, vengono individuate le cellule di interesse (ad esempio solo quelle marcate con fluoresceina) e le loro posizioni.

Infine vengono immesse nel software sia le coordinate di partenza delle cellule target, che le coordinate di arrivo della camera di raccolta: il computer calcola il percorso ottimale per ciascuna cellula, che verrà spostata grazie al meccanismo di trappole dielettroforetiche descritto.

Dal momento che le cellule selezionate vengono messe in movimento in parallelo, senza che la velocità di spostamento di una cellula influenzi le altre, tutti gli spostamenti possono essere completati nello stesso intervallo di tempo, indipendentemente dal numero totale delle cellule. Eventuali ostacoli presenti nel percorso come bolle d'aria, anche se

infrequenti, vengono individuati dal software di controllo ed aggirati in automatico creando un iter alternativo alle cellule in movimento (figura 4).

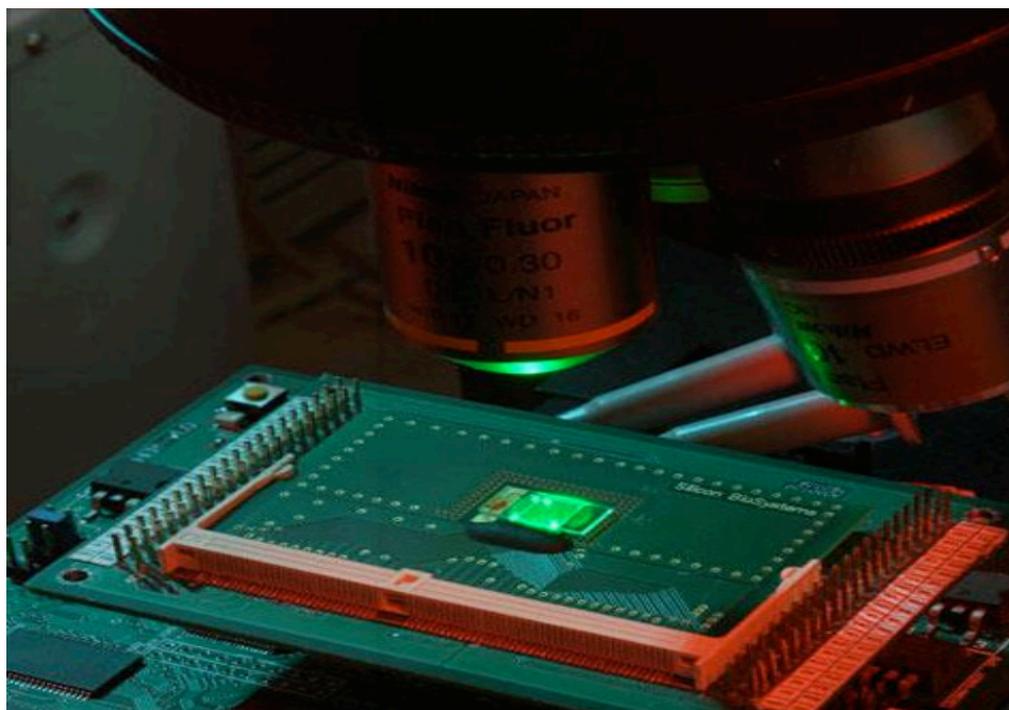


Figura 4 : foto del chip per il Dep-array in fase di lavoro.

3. Analisi: le cellule fetali così purificate sono state analizzate tramite QF-PCR.

Protocollo QF-PCR

La QF-PCR (PCR fluorescente o fluorescenza quantitativa con polimerasi reazione a catena), è un tecnica in cui precise regioni di DNA del campione in esame sono marcate con sequenze fluorescenti, la cui quantità viene misurata tramite elettroforesi.

L'innovazione tecnologica apportata dall'introduzione delle strumentazioni automatiche a tecnologia fluorescente ha incrementato la sensibilità e la precisione della PCR, dei test genetici eseguiti con tale metodica, ma soprattutto ha permesso di automatizzare l'intero processo analitico.

La PCR fluorescente è oggi applicata nella diagnosi della maggior parte delle malattie genetiche, sia in fase prenatale che post-natale, e si affianca alle tecniche citogenetiche tradizionali come ausilio diagnostico rapido e mirato delle più importanti aneuploidie fetali (cromosomi 21, 13, 18, X e Y), in sostituzione della tecnica di ibridizzazione fluorescente in situ (FISH) [26,27].

La metodica è basata sull'amplificazione fluorescente di sequenze di DNA ripetute altamente polimorfiche (Short Tandem Repeat - STR) localizzate sui cromosomi oggetto di studio e successiva elettroforesi capillare; eseguita su DNA estratto da cellule del liquido amniotico, villi coriali, sangue e cellule fetali, permette di definire l'esatto assetto numerico dei cromosomi presi in considerazione.

L'elettroforesi capillare è eseguita mediante sequenziatore automatico a tecnologia fluorescente, a seguito della quale per ciascun prodotto di PCR sono state calcolate le dimensioni, l'altezza e l'area di ciascun picco fluorescente. La verifica in termini qualitativi e quantitativi della segregazione degli alleli parentali permette di poter evidenziare nel feto la presenza di eventuali trisomie¹.

¹ I tracciati che si ottengono, per ogni STR, in caso di un assetto cromosomico normale sono 2 picchi di uguale area ed altezza. In caso di trisomia si possono verificare 2 differenti situazioni: presenza di 3 picchi per la trisomia triallelica o 2 picchi con rapporto aree 1:2 per la trisomia diallelica. Per quanto riguarda i cromosomi sessuali viene impiegata una sequenza relativa al gene dell'amelogenina. In questo caso un amplificato con un solo picco indica un assetto cromosomico femminile (XX), mentre uno con 2 picchi di differente dimensione un assetto maschile (XY). L'impiego di più marcatori con un alto indice di eterozigotità per ciascun cromosoma porta ad una frequenza molto bassa del pattern allelico non informativo (unico picco) per tutti i loci investigati.

Risultati

E' stata valutata l'efficacia del DEP-array nel mantenere le capacità proliferative, la vitalità delle cellule trattate ed i potenziali danni prodotti al DNA, utilizzando linee standard di cellule da laboratorio come le K 562 e le Jurkat, manipolate da campi DEP per circa 30 minuti [28].

Dopo il trattamento DEP le cellule sono state rimosse dal dispositivo e riposte in coltura, conteggiate dopo sei giorni, e messe a confronto con una coltura di controllo: la sperimentazione ha dimostrato che l'indice di proliferazione delle cellule trattate era paragonabile a quello delle colture di controllo per entrambe le linee cellulari.

La semplice procedura di lavaggio con acqua e un detergente delicato, seguita da un risciacquo con etanolo, è risultata sufficiente a garantire condizioni di sterilità delle colture; in nessuno degli esperimenti di coltura post-DEP è stata osservata contaminazione microbiologica.

Anche la vitalità delle cellule nucleate è stata testata sistematicamente dopo ogni manipolazione con il DEP-array: essa era sovrapponibile a quella delle sospensioni cellulari di controllo. E' stata testata una serie di campioni di globuli bianchi hanno mantenuto una vitalità del 84-92% dopo 30 minuti di manipolazione DEP, paragonabile alla vitalità delle stesse cellule prima dell'esperimento.

Infine, è stato studiato anche il possibile danno prodotto al DNA cellulare utilizzando il test Comet modificato: mentre il test standard valuta la frammentazione del DNA indotta dall'apoptosi, quello modificato con l'aggiunta di un enzima di riparazione del DNA (es.: formamidopirimidina-DNA glicosidasi), è stato in grado di rilevare anche danni molto più piccoli come l'ossidazione del DNA. Nei campioni analizzati non è stato

osservato un aumento nella percentuale di danno al DNA, tutti sono stati classificati in Classe I (= danno molto piccolo) e nessun cambiamento di categoria è stato segnalato tra le cellule di controllo e quelle sottoposte a manipolazione DEP.

Vengono qui di seguito esposti alcuni risultati relativi all'analisi dei campioni di sangue inviati alla Silicon Biosystems® di Bologna da parte della Clinica Ostetrica dell'Università di Padova; l'indagine è tuttora in corso e coinvolge numerosi Centri Universitari ed Ospedalieri.

Nella nostra analisi sono stati presi in esame 211 campioni, raccolti presso la Clinica Ostetrica dell'Università di Padova nel periodo da Marzo 2008 a Dicembre 2008. Le provette inviate sono state sottoposte dapprima ad arricchimento mediante Ficoll, seguito da isolamento delle cellule fetali mediante DEP-array. Le cellule fetali purificate sono state analizzate secondo il protocollo QF-PCR.

L'analisi delle cellule fetali isolate è rigorosamente avvenuta in modo "prospettico", cioè senza conoscere l'esito citogenetico della relativa villo o amniocentesi eseguita; il cariotipo fetale eseguito secondo le tecniche classiche veniva eventualmente consultato in un secondo momento, a procedura completata.

La Clinica Ostetrica ha inviato complessivamente 211 campioni; non è stato possibile portare a termine il processo in 41 casi per insuccesso nella marcatura di cellule fetali.

Su 211 campioni inviati dalla Clinica Ostetrica di Padova un caso è risultato patologico, con diagnosi di trisomia 18 (Edwards Syndrome). L'aneuploidia riscontrata è stata successivamente confermata dalla

diagnosi prenatale invasiva eseguita dalla paziente, cioè dal cariotipo fetale ottenuto con villocentesi.

Il caso in esame apparteneva ad una primigravida di 36 anni che aveva scelto di sottoporsi a diagnosi prenatale invasiva tramite villocentesi per “età materna”, ed aveva eseguito l’esame a 11 settimane di gravidanza.

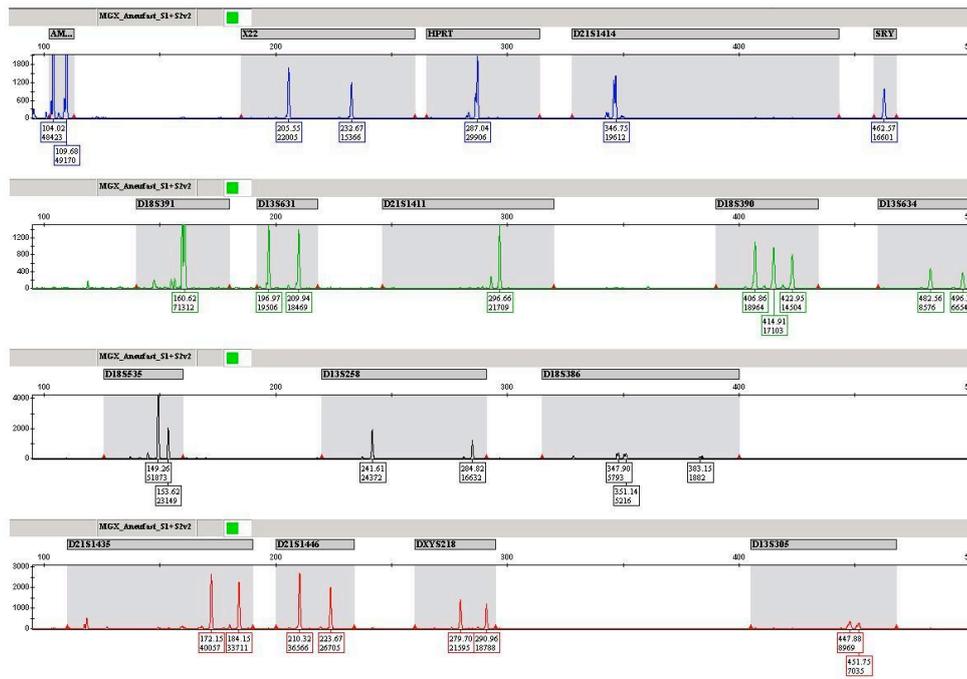


Figura 5 : Tracciato QF-PCR della trisomia 18.

La paziente era stata informata in sede di colloquio prenatale del nostro studio; la mattina della villocentesi, dopo avere raccolto il consenso informato, è stato eseguito il prelievo di sangue di 20 ml, prima di procedere al prelievo dei villi coriali e dopo avere verificato ecograficamente battito cardiaco fetale e fattibilità della villocentesi. Il prelievo è stato inviato ai laboratori della Silicon Biosystems® dove è stato sottoposto ai processi di arricchimento con Ficoll e di isolamento delle

cellule fetali impiegando il DEP-array. Le cellule fetali isolate sono state analizzate mediante QF-PCR. Il campione in questione ha dato alla QF-PCR cariotipo anomalo e indicativo di trisomia 18.

La paziente ha scelto di terminare la gravidanza sulla base dei risultati citogenetici della villocentesi che documentavano una trisomia 18, diagnosi che è stata successivamente confermata dall'analisi del materiale abortivo.

Discussione

La diagnosi prenatale di anomalie cromosomiche e malattie genetiche richiede necessariamente una fonte di cromosomi o DNA fetali, che a tutt'oggi si ottengono con procedure di diagnosi prenatale invasiva quali villocentesi ed amniocentesi. Proprio perché "invasive", comportano un rischio basso ma definito di perdita della gravidanza e non possono essere proposte come screening all'intera popolazione di gravide. Considerando che la maggior parte delle anomalie fetali sono cromosomiche e si verificano spesso anche in gravidanze classificate in partenza come "non a maggior rischio", un test non invasivo da offrire come vero e proprio screening rappresenterebbe una vera e propria rivoluzione. Fino ad oggi sono stati messi a punto ed applicati, test probabilistici come l'ultrascreen, purtroppo privi della sensibilità necessaria per una diagnosi definitiva.

Per questo motivo l'interesse della comunità scientifica si è nuovamente concentrato su un'idea "vecchia", il prelievo non invasivo di cellule fetali ricercandole nel sangue materno. E' stato calcolato che il rapporto cellule fetali/cellule materne è di 1/144.000 a 15 settimane di gravidanza e sale a 1/4.000 nella gravidanza avanzata [11]. Cellule fetali candidate ad essere ricercate nel sangue periferico materno sono leucociti, cellule eritroidi e cellule trofoblastiche; tutte e tre le popolazioni cellulari sono state isolate nel sangue periferico materno.

Tuttavia, gli eritroblasti nucleati sembrano i più idonei per i tests prenatali:

- sono praticamente assenti nel sangue periferico degli adulti mentre sono le cellule fetali nucleate più rappresentate nella gravidanza

- precoce [23],
- hanno ciclo vitale piuttosto breve di circa 90 giorni [18],
 - sono mononucleati e relativamente bene differenziati,
 - contengono emoglobina fetale (Hb F) che ne è un marker sesso indipendente.

Qualunque tecnica venga utilizzata per procedere all'isolamento delle cellule fetali dal sangue materno, il prelievo ematico viene sempre sottoposto a tre passaggi base di manipolazione: l'arricchimento, la purificazione o isolamento, e l'analisi. Sebbene numerosi lavori abbiano dimostrato la "fattibilità" di questo percorso diagnostico non invasivo, le tecniche correnti non sono ancora sufficientemente pratiche per farne un uso clinico su larga scala, ed il problema si concentra principalmente nella seconda fase, quella dell'isolamento.

Le tecniche di purificazione più utilizzate fino ad oggi sono state la FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), la MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) e la colonna di immunoaffinità biotina-avidina; si tratta di procedure cosiddette "meccaniche", penalizzate dalla perdita di una parte delle già poche cellule fetali contenute nel campione, posto che è necessario un numero minimo di 25 cellule fetali dopo arricchimento e purificazione per permettere una accurata analisi citogenetica. Le tecniche meccaniche inoltre, non solo non raggiungono sensibilità e specificità sufficienti nell'identificazione delle cellule fetali stesse, ma richiedono tempi di elaborazione spesso troppo lunghi non compatibili con un'applicazione clinica.

Smistare e recuperare singole cellule vive, da campioni che ne

contengono già in partenza meno di poche migliaia, può diventare complesso nella ricerca delle cellule staminali, della terapia e della diagnostica cellulare. Popolazioni di cellule rare quali quelle staminali nell'adulto e le fetali circolanti nel sangue materno, sono alla base di molte speranze in ambito scientifico. Dal momento che esse sono presenti esclusivamente in piccole quantità ed in campioni a loro volta a disponibilità limitata, identificare, selezionare e recuperare queste cellule vive rappresenta la maggior sfida in questo campo altamente promettente. Le strategie tradizionali di isolamento cellulare prevedono un primo passo di arricchimento del campione (tramite selezione su base magnetica o di fluorescenza), seguito da un prelievo manuale delle cellule; queste ultime vengono poi analizzate singolarmente.

Per ovviare a questo lavoro lungo e difficile, per la maggior parte manuale, sono stati sviluppati dispositivi miniaturizzati di analisi di campioni che contengono meno di poche migliaia di cellule.

Tra le tecniche nuove di manipolazione "gentile" delle cellule, la più promettente è quella che si avvale della dielettroforesi (DEP), applicata sia alla selezione sia alla manipolazione di singole cellule.

Il selezionamento elettronico dielettroforetico (DEP-array) ha dimostrato la capacità di manipolare contemporaneamente e in parallelo fino a 10.000 cellule mantenendone le caratteristiche principali quali vitalità e capacità proliferative. Anche il riscontro di assenza di contaminazione microbiologica consente di evitare il rischio di cross-ibridazioni e confondimenti nelle procedure di sequenziamento del DNA.

Questi risultati sono in accordo con quelli emersi da studi precedenti che hanno valutato l'effetto del DEP sulle cellule trattate [29].

La separazione di eritroblasti fetali dai campioni di sangue materno si avvale di parametri morfologici, colorimetrici e anticorpali in fase evolutiva.

I risultati delle analisi QF-PCR dei campioni di cellule fetali recuperate analizzati hanno mostrato che su 211 campioni analizzati con la tecnica del DEP-array, 170 hanno mostrato presenza di eritroblasti fetali, ed il solo caso di aneuploidia fetale presente, una trisomia 18, è stato correttamente individuato. Allo stato dell'arte la efficienza di separazione di cellule fetali è considerata promettente, tenendo conto dell'affinamento in corso delle procedure automatizzate di riconoscimento delle cellule fetali.

Nel corso della sperimentazione il metodo DEP-array ha mostrato una sorprendente maneggevolezza e velocità di lavoro: ogni singola cellula viaggia sul chip alla velocità di 1 mm al minuto, tenuto conto che ciascun chip è in grado di manipolare singolarmente le cellule in esame fino ad un massimo di 10.000 in contemporanea, risulta la possibilità di elaborare un campione di sangue nell'arco di poche ore.

Conclusioni

La ricerca non invasiva di cellule fetali nel sangue materno è da quasi trent'anni oggetto di studio di molti ricercatori in tutto il mondo. Grandi passi in avanti sono stati compiuti in questo campo, sempre più ci si è avvicinati al traguardo, senza però ancora averlo raggiunto. Ogni giorno sono maggiori le conoscenze in merito, come la certezza della presenza di cellule fetali nel sangue periferico materno, che le cellule sono isolabili già al primo trimestre di gravidanza, che gli eritroblasti nucleati sono le cellule più idonee al suddetto scopo.

Il nostro studio, in fase preliminare, ha iniziato a testare l'efficacia di una delle più recenti e promettenti tecniche di isolamento delle rare cellule fetali, il DEP-array.

I dati finora ottenuti dimostrano che il DEP-array è in grado di riconoscere, selezionare e separare gli eritroblasti fetali mantenendoli in vita e non danneggiandone il DNA. Ciò consente di applicare su ciascuna cellula tecniche di micromanipolazione e diagnosi genetica molecolare con sequenziamento e QF-PCR. La ottimizzazione dei sistemi automatici di marcatura delle cellule fetali e la velocità di attuazione dell'intero percorso diagnostico sono i passaggi cruciali della procedura perché possa diventare di applicazione clinica e avviare un trial diagnostico.

Bibliografia

[1] CUNNINGHAM F., ET AL, 2002 in Williams Obstetrics (Mc Graw-Hill, New York), p 942.

[2]SCHMORL G., 1893. Patologisch-anatomische Untersuchungen ueber Puberaleklampsie. Leipzig. Vogel.

[3] CLAYTON E. M., W. D. FELDHAUS & F.E. WHITEACRE 1964. Fetal erythrocytes in the maternal circulation of pregnant women. Obstet Gynecol. 23: 915-919.

[4] COVONE A. E., P.M. JOHNSON, D. MUTTONM & M. ADINOLFI. 1984. Trophoblast cells in peripheral blood from pregnant women. Lancet 1: 841-843.

[5] COVONE A. E., R. KOZMA, P.M. JOHNSON, S.A. LATT& M. ADINOLFI.1988. Analysis of peripheral blood samples for the presence of placental derived cells using Y-specific probes and McAb H315. Prenat. Diagn. 8: 591-607.

[6] LO Y. M., P. PATEL, M. SAMPIETRO, M.D. GILMER, K.A. FLEMING & J.S. WAINSCOAT. 1990. Detection of single copy fetal DNA sequence from maternal blood. Lancet 335: 1463-1464.

[7] LO Y.M., P. PATEL, J.S. WAINSCOAT, M. SAMPIETRO, M.D.

GILMER & K.A. FLEMING. 1989. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* 336: 1363-1365.

[8] BERNIISCHE & KAUFMANN 1990. The pathology of the human placenta. Springer Verlag. New York.

[9] PARKS D.R., L.A. HERZENBERG. 1982. Fetal cells from maternal blood: their selection and prospects for use in prenatal diagnosis. *Methods Cell Biol.* 26: 277-295.

[10] SCHRODER J., 1975. Transplacental passage of blood cells. *J. Med Genet.* 12: 230-242.

[11] HAMADA H., T. ARINAMI, T. KUBO, H. HAMAGUCHI & H. IWASAKI. 1993. Fetal nucleated cells in maternal blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum. Genet.* 91: 427-432.

[12] ZIPURSKY A., A. HULL, F.D. WHITE & L.G. ISRAELS. 1959. Foetal erythrocytes in the maternal circulation. *Lancet.* 1: 451-452.

[13] BIANCHI D.W., A.F. FLINT, M.F. PIZZIMENTI, J.H.M. KNOLL & S.A. LATT. 1990. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 3279-3283.

[14] WALKNOWSKA J., F.A. CONTE & M.M. GRUMBACH. 1969. Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer.

Lancet. 1: 1119-1122.

[15] AXELRAD A. A., D.L. MCLEOD, M.M. SHREEVE & D.S. HEATH. 1973. Properties of cells that produce erythrocytic colonies in vitro. *In* Hemopoiesis in culture. W. A. Robinson, Ed. DHEW Publication No. (NIH) 74-205, pp 226-234.

[16] WEINBERG R.S., L. HE & B.P. ALTER. Erythropoiesis is distinct at each stage of ontogeny. *Pediatr. Res.* 31: 170-175.

[17] FORESTER F., F. DAFFOS, N. CATHERINE, M. RENARD & J.P.ANDREUX. 1991. Developmental hematopoiesis in normal human placental blood. *Blood.* 77: 2360-2363.

[18] PEARSON H. A..1967. Life-span of the fetal red blood cell. *J. Pediatr.* 70: 166-171.

[19] SCHROEDER J., TIILIKAINEN & A. DE LA CHAPELLE. 1974. Fetal leucocytes in the maternal circulation after delivery. *Transplantation.* 17: 346-354.

[20] BIANCHI D.W., M.C. YIH, G.K. ZICKWOLF & A.F. FLINT. 1994. Transferrin receptor (CD 71) expression on circulating mononuclear cells during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170: 202-206.

[21] BIANCHI D.W., S. SYLVESTER, G.K. ZICKWOLF, M.A. DEMARIA,

G.J. WEIL & O.H. GEIFMAN. 1993. Fetal stem cells persist in maternal blood for decades post-partum. *Am. Hum. Genet.* 53 (suppl.): A251.

[22] SIMPSON J.L., E. SHERMAN. 1994. Successful prenatal diagnosis from maternal blood with magnetic activated cell sorting.

Fetal cells in maternal blood: prospects for non-invasive prenatal diagnosis. New York Academy Of Sciences. Pag106-107

[23] THOMAS D.B. & J.M. YOFFEY. 1962. Human foetal haematopoiesis: I. The cellular composition of foetal blood. *Br. J. Haematol.* 8: 290-295.

[24] HERZENBERG L.A., D.W. BIANCHI, J. SCHROEDER et al. 1979. Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 3, p 1453-1455.

[25] HALL J.M., S. ADAMS, S. WILLIAMS, M.A. REHSE, T.J. LAYTON & D.A. MOLESH. 1994. Purification of fetal cells from maternal blood using an avidin-biotin immunoaffinity column. *Fetal cells in maternal blood: prospects for non-invasive prenatal diagnosis. New York Academy Of Sciences.* Pag 115-128.

[26] Adinolfi M, Sherlock J. Prenatal detection of chromosome disorders by QF-PCR. *Lancet* 2001; 358:1030-1031

[27] Cirigliano V, Ejarque M, Canadas MP, Lloveras E, Plaja A, Perez MM,

Fuster C, Egozcue J. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod.* 2001 7:1001-1006.

[28] FUCHS A.B., ROMANI A., FREIDA D. MEDORO G., ABONNEC M., ALTOMARE L., CHARTIER I., GUERGOUR D., VILLIERS C., MARCHE P., TARTAGNI M., GUERRIERI R., CHATELAIN F. & MANARESI N. 2005. Electronic sorting and recovery of single live cells from microlitre sized samples. *Lab. Chip.* 2006. 6: 121-126.

[29] ARCHER T., T. LI, A.T. EVANS, S.T. BRITLAND & H.MORGAN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 257: 687-689.