



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

Biologia Molecolare e Applicata

**CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR AND ITS RECEPTOR α NELLA
PLACENTA DEL PRIMO E DEL TERZO TRIMESTRE DI GESTAZIONE**

**CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR AND ITS RECEPTOR α IN
PLACENTA OF FIRST AND THIRD TRIMESTER OF GESTATION**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Mirko Luigi Ciliberti

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa Daniela Marzioni

Correlatore:
Dr.ssa Sonia Fantone

Sessione Straordinaria

Anno Accademico 2018/2019

Indice

1. Introduzione	2
1.1 Placenta	2
1.1.1 Struttura	2
1.1.2 Formazione dell'albero villosa placentare	4
1.1.3 Funzioni della placenta.....	6
1.2 CNTF	7
1.2.1 CNTF struttura e funzione	9
1.2.2 CNTF Receptor α	11
2. Materiali e Metodi	13
2.1 Campioni tissutali.....	13
2.2 Immunoistochimica	13
2.3 Western blotting	15
2.4 Colture cellulari	16
2.5 Immunofluorescenza.....	16
2.6 Tabella anticorpi utilizzati	17
3. Risultati	18
3.1 Espressione del CNTF e CNTFR α nella placenta umana.....	18
3.2 Espressione del CNTF e CNTFR α nelle linee cellulari placentari umane	21
4. Discussione	23
5. Bibliografia	26

1. Introduzione

1.1 Placenta

La placenta è un organo fondamentale per la gestazione, essa infatti instaura un legame fondamentale tra madre e feto, fungendo da barriera ma permettendo scambi gassosi e di metaboliti tra i due. Infatti, consente il trasporto di gas, nutrienti e prodotti di scarto (1-3). Inoltre, è coinvolta nella secrezione di una grande varietà di peptidi ed ormoni. Il trasporto, noto come passaggio transplacentare, è regolato dalla cosiddetta barriera placentare, che permette gli scambi materno-fetali tramite sistemi di trasporto come diffusione semplice, diffusione facilitata, trasporto attivo e pinocitosi (3).

1.1.1 Struttura

La placenta è costituita da una parte materna (decidua) e una parte fetale (corion). Ha una forma discoidale con una faccia fetale, chiamata piatto coriale, ed una faccia materna, detta piatto basale. Il piatto basale è inserito nell'endometrio materno e si approfonda fino al primo terzo del miometrio. La placenta è costituita da un'unità funzionale chiamato cotiledone placentare: questi sono separati da setti placentari ed ognuno contiene uno o più alberi villosi. I villi sono costituiti da una porzione centrale, il core o stroma villosa, e da uno strato epiteliale più esterno a contatto con il sangue materno: il trofoblasto. Nello stroma del villo, costituito prevalentemente da tessuto connettivale, sono presenti canali e vasi fetali in numero variabile a seconda dell'età

gestazionale. Il trofoblasto è composto da due strutture diverse: il citotrofoblasto villosa ed il sinciziotrofoblasto. Il citotrofoblasto che poggia su una membrana basale a contatto con lo stroma villosa, rappresenta il comparto staminale del villo dalla cui fusione si origina il sinciziotrofoblasto che è lo strato più esterno del villo. Quest'ultimo è un epitelio differenziato, specializzato che ha perso la capacità di proliferare. Presenta dei microvilli apicali che permettono di aumentare la superficie di scambio tra il sangue materno, che è presente nello spazio intervilloso, ed il sangue fetale, che scorre all'interno dei vasi fetali presenti nello stroma del villo (3).

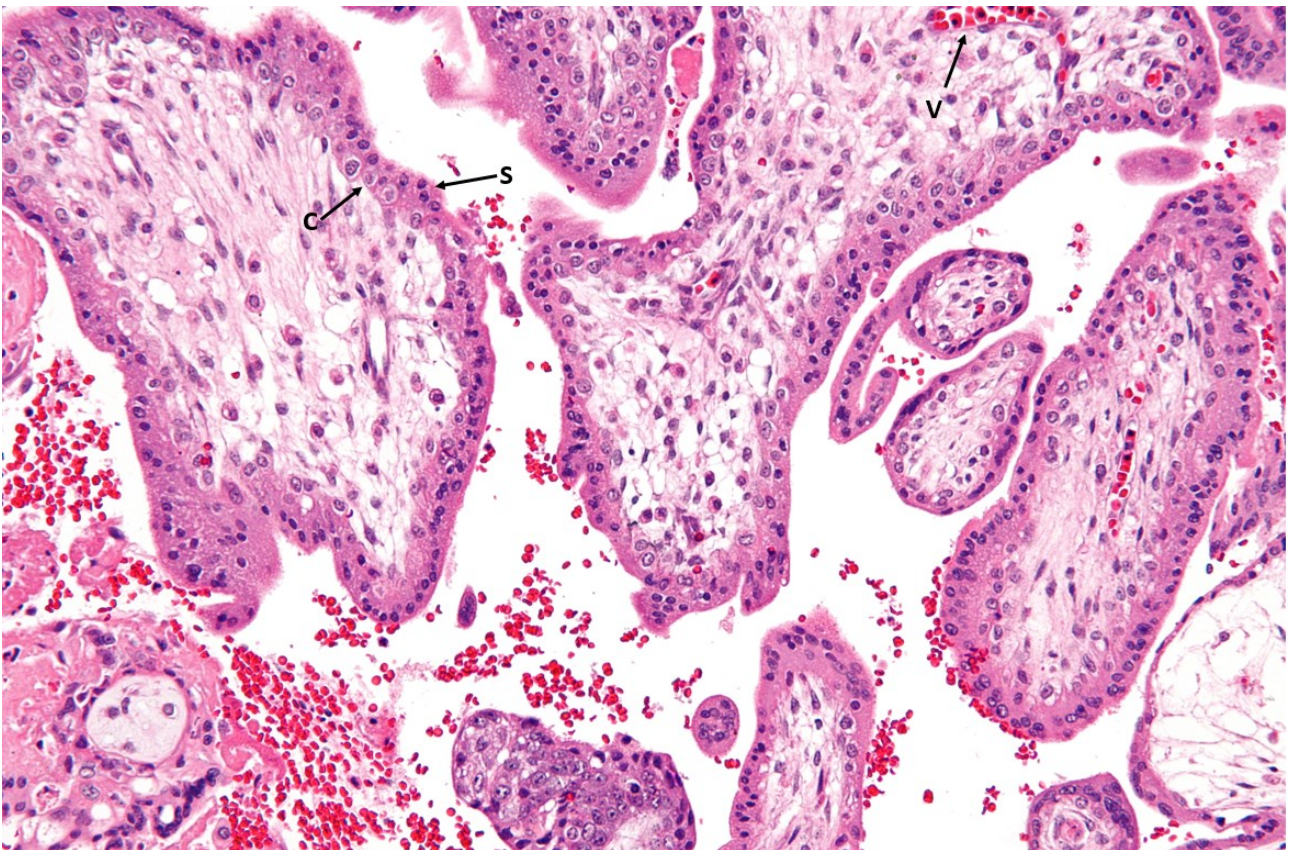


Figura 1 Placenta umana al primo trimestre di gestazione. C= Ciotrofoblasto villosa, S= Sinciziotrofoblasto, V= Vaso fetale

Nella placenta sono inoltre presenti due strutture costituite da citotrofoblasto extravillioso, ovvero le colonne e le isole. Queste sono costituite da cellule con elevata capacità invasiva perciò sono responsabili dell'ancoraggio dei villi placentari, e quindi della placenta, alla parete uterina (3).

1.1.2 Formazione dell'albero villosa placentare

Dopo la fecondazione, si ha la formazione dello zigote, in seguito della morula e poi della blastocisti. Una volta formata la blastocisti, questa inizia ad invadere la parete uterina grazie al suo strato più esterno chiamato trofoblasto. Quest'ultimo fa parte dei tessuti che contribuiranno a formare la placenta come abbiamo accennato nel paragrafo precedente. La massa cellulare interna è invece composta da cellule che andranno a formare l'embrione (3).

Le cellule del trofoblasto a diretto contatto con l'utero si differenziano in cellule multinucleate, dando origine al sinciziotrofoblasto. Le cellule più interne formano il citotrofoblasto villosa.

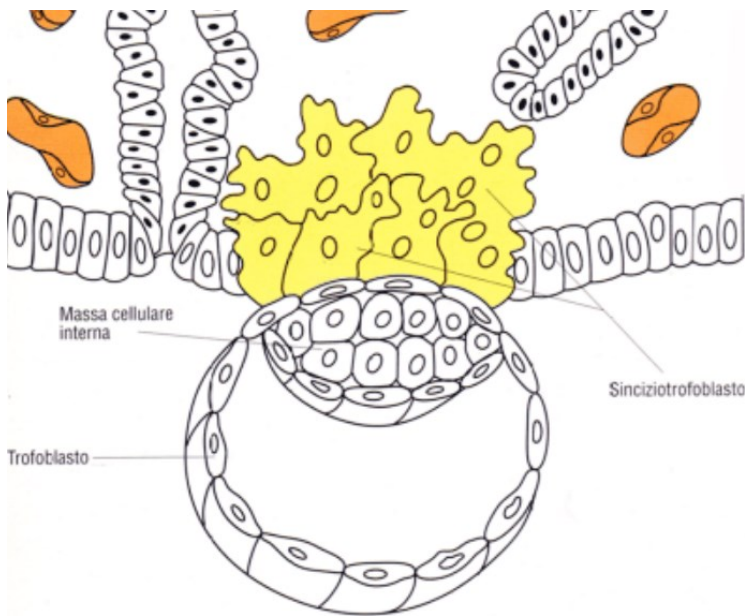


Figura 2 Impianto blastocisti umana

Dopo l'impianto, il trofoblasto potrà differenziarsi in villosi o extravillosi. Intorno al quattordicesimo giorno, il citotrofoblasto penetra nel sinciziotrofoblasto, formando le colonne. (2) Queste costituiscono la base dei villi di ancoraggio e nei primi stadi di gravidanza sono una fonte di citotrofoblasto in proliferazione. Inoltre, una porzione del citotrofoblasto extravillioso potrà andare a formare le isole di citotrofoblasto che rappresentano un meccanismo di riparo qualora le colonne si stacchino dall'utero (3).

Durante la terza settimana, si forma l'apparato circolatorio primitivo, responsabile della nutrizione dell'embrione. I vasi inizialmente saranno presenti nella parte più interna dello stroma dei villi e soltanto in seguito diventeranno più superficiali ed immediatamente al di sotto del trofoblasto. Si avranno così i villi terminali che sono i responsabili dello scambio materno-fetale (3).

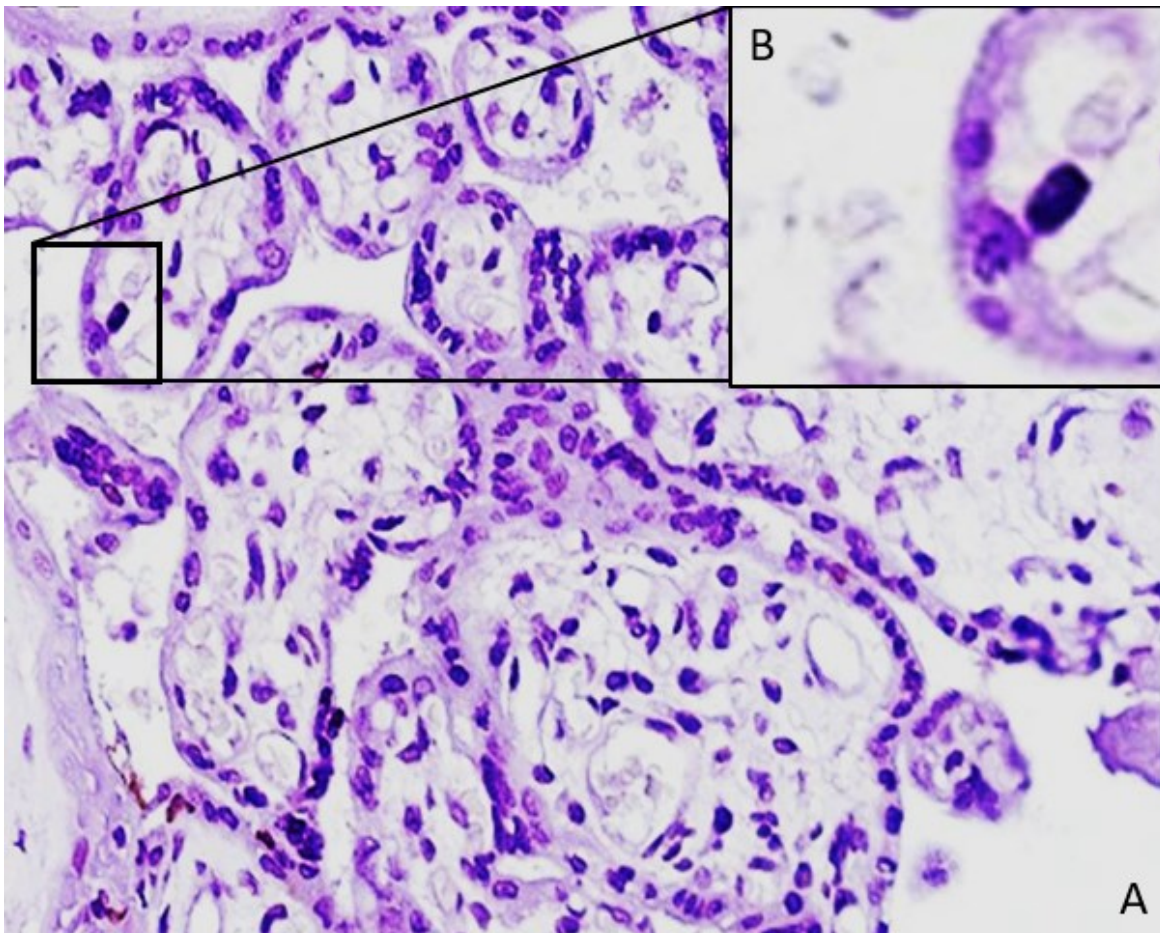


Figura 3 Placenta umana al terzo trimestre di gravidanza (A) e barriera materno-fetale (B)

1.1.3 Funzioni della placenta

Come detto in precedenza, la placenta ha diverse funzioni: questa è responsabile del trasporto e dell'eliminazione di metaboliti e sostanze di scarto, ma ha anche funzione protettiva nei confronti del feto.

Il trasporto delle sostanze nutritive così come quelle dei gas (ossigeno e anidride carbonica) avviene tramite la barriera placentare. Questa è permeabile ai gas

respiratori, permettendo una diffusione rapida dell'ossigeno dal sangue materno a quello fetale.

Le sostanze nutritive come i carboidrati, gli aminoacidi ed i lipidi oltrepassano la barriera placentare tramite processi diversi, ad esempio diffusione facilitata per il trasporto del glucosio oppure il trasporto attivo per la maggior parte dei sali (4).

Un'altra funzione molto importante della placenta è quella endocrina. La placenta modula la secrezione di una serie di ormoni quali estrogeni, progesterone, ormone della crescita placentare, fattori della crescita, gonadotropine corioniche, citochine, ecc. (4,5). A titolo di esempio, il progesterone viene sintetizzato dal colesterolo materno e utilizzato per controllare le contrazioni uterine. Le gonadotropine corioniche sembrano essere coinvolte nella stimolazione dell'invasione del trofoblasto, modulando la produzione di metallo-proteasi (6), ma anche nella differenziazione del trofoblasto villosa (7).

1.2 CNTF

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) è una citochina appartenente alla famiglia delle IL-6, chiamate anche *long type 1* o citochine gp130, così come IL-6, IL-11, *leukemia inhibitory factor* (LIF), *oncostatin M* (OsM), *cardiotrophin 1* (CT-1), e *cardiotrophin-like cytokine* (CLC) (8). Il CNTF fu inizialmente isolato nel tessuto embrionale dell'occhio del pulcino dove ne fu caratterizzata l'azione sui neuroni colinergici

parasimpatici (9). Questa citochina è espressa costitutivamente nelle cellule gliali, ma è stata ritrovata anche nel citoplasma delle cellule di Schwann dei nervi periferici, dove supporta il mantenimento postnatale dei neuroni motori (10). Durante lo sviluppo del feto, è stato visto che le cellule del plesso corioideo secernono una serie di molecole, incluso il CNTF, che porteranno all'auto-rinnovo delle cellule progenitrici neuronali (11). In aggiunta alla sua localizzazione nelle cellule del sistema nervoso centrale e periferico, dove promuove la differenziazione e la proliferazione dei neuroni e dei precursori delle cellule della glia, il CNTF è espresso anche in cellule non neuronali quali adipociti, miociti, epatociti (12-14). Infatti, studi recenti hanno dimostrato che la molecola è presente nelle cellule del miocardio murino ed è in grado di attivare una serie di segnali che portano ad una riduzione della morte cellulare in seguito a OGD (Oxygen glucose deprivation) (12). Inoltre, è stato dimostrato il coinvolgimento del CNTF nel metabolismo e nella regolazione energetica in modelli murini noti come DIO (Diet-Induced Obesity), utilizzati per lo studio dell'obesità. Somministrazioni giornaliere della citochina hanno prodotto una riduzione progressiva e dose-dipendente della massa corporea, relazionata a una diminuzione dell'assunzione di cibo (13).

In aggiunta, studi sull'espressione del CNTFR α nel fegato sano e nelle cellule tumorali di epatocarcinoma hanno evidenziato che il CNTFR α è espresso nella porzione periferica dei lobuli epatici degli epatociti e nelle cellule tumorali. Trattamenti con CNTF delle cellule sopracitate, dimostrano un ruolo di questa citochina nell'attivazione del pathway AKT-PI3K-mTORC inducendo la traslocazione del GLUT4, un trasportatore del glucosio che consente il passaggio del glucosio attraverso

la membrana plasmatica, dalla porzione intracellulare alla membrana plasmatica e contribuendo quindi all'uptake del glucosio nelle cellule cancerogene (14).

1.2.1 CNTF struttura e funzione

Il CNTF è una proteina di 22 kDa composta da 200 amminoacidi organizzate a formare una struttura terziaria composta da quattro α -eliche (fig.4). A differenza dell'IL-6, manca di un peptide di segnale e quindi non è secreto dai neuroni.

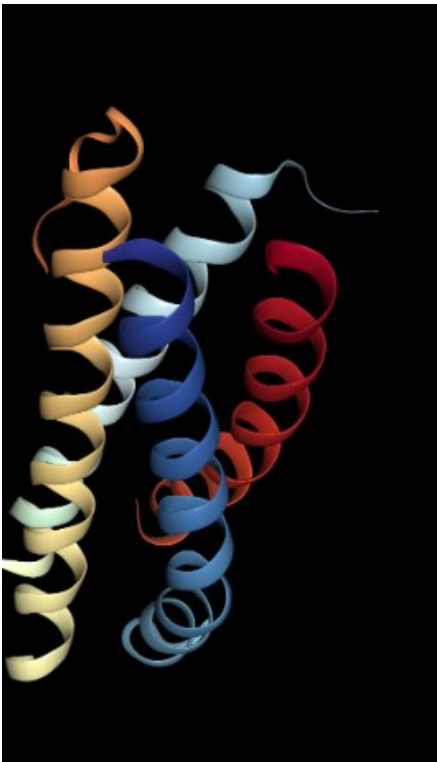


Figura 4 Ultrastruttura del CNTF

Al fine di svolgere le sue diverse funzioni cellulari, il CNTF lega il suo recettore, chiamato CNTF Receptor α (CNTFR α). Questo evento porta all'eterodimerizzazione della glicoproteina 130 (gp130). Insieme, queste molecole attiveranno un pathway noto

come *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*, anche chiamato JAK/STAT (15) (fig.5).

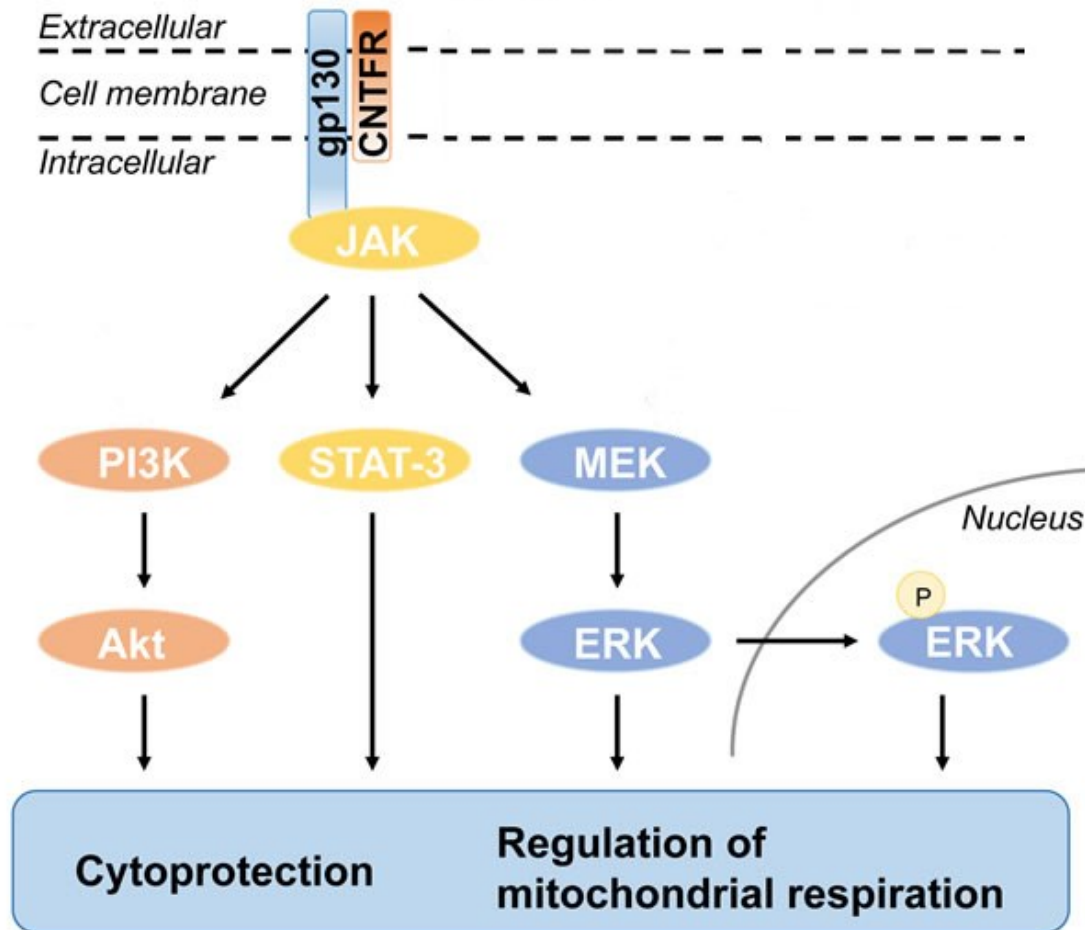


Figura 5 CNTF signalling pathways

In seguito alla formazione del complesso CNTF/CNTFR α /gp130/LIFR β , si ha l'attivazione delle chinasi Jak1, Jak2 e Tyk2, queste possono attivare uno o pi \dot{u} dei tre pathways seguenti (16):

1. JAK/STAT pathway, fosforilando STAT3 (17)
2. AKT-PI3K-mTORC pathway, fosforilando AKT (18)
3. MEK/ERK pathway, fosforilando ERK1/2 (19)

Una volta fosforilate, le proteine a valle si attivano migrando nel nucleo cellulare e attivando i geni sensibili al CNTF.

1.2.2 CNTF Receptor α

Il CNTF receptor complex è strettamente correlato a quello dell'IL-6 e del LIFR. La specificità della subunità α al complesso è altamente conservata tra le specie e la si ritrova soprattutto nel sistema nervoso così come nel sistema scheletrico. CNTFR α non è posizionata nel dominio transmembrana, essa è ancorata alla membrana cellulare tramite un legame glicosil-fosfatidil inositolo (10).

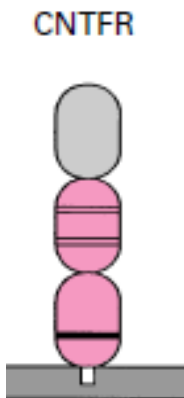


Figura 6 Divisione dei domini del CNTF Receptor α . In grigio il dominio IgG-like, in rosa il CBM (20)

Il CNTFR α appartiene alla classe I dei recettori citochinici: questa è definita dalla presenza di una porzione nota come cytokine-binding module (CBM), che è formata da due domini *fibronectin-type-III-like*, al cui N-terminale si ritrova un set di quattro cisteine conservate, mentre al C-terminale un dominio WSXWS (fig.6).

Alcune ricerche hanno rivelato che le citochine della famiglia IL-6 hanno tre siti per il legame al recettore (16) con diverse funzioni: legame al recettore, legame della gp130 e reclutamento di LIFR.

2. Materiali e Metodi

2.1 Campioni tissutali

Sono stati analizzati 18 placenti umane al terzo trimestre di gestazione (Termine) e 12 placenti al primo trimestre di gestazione (Interruzione Volontaria di Gravidanza; IVG). I campioni provengono dalla Clinica di Ostetricia e Ginecologia, Ospedale Salesi, Ancona. I tessuti sono stati fissati in formalina tamponata al 4%, per 12 ore a 4°C; successivamente sono stati deidratati attraverso una scala graduata di alcool etilico (50°-70°-100°) e tramite xilene a temperatura ambiente. In seguito, sono stati inclusi in paraffina a 56°C, formati i blocchetti, lasciati raffreddare e conservati a temperatura ambiente fino al momento dell'utilizzo.

2.2 Immunoistochimica

L'analisi immunoistochimica è stata eseguita sui campioni di placenta precedentemente inclusi in paraffina. Dai blocchi di paraffina, attraverso l'utilizzo di un microtomo a slitta, sono state tagliate sezioni ad uno spessore di 5 µm, le sezioni distese su acqua a 40°C sono state poste sui vetrini carichi poli-lisinati. Le sezioni sono state inizialmente deparaffinate e idratate. La sparaffinatura delle sezioni avviene tramite lavaggi in xilolo per 30 minuti, mentre la reidratazione avviene mediante il passaggio delle sezioni in soluzioni a concentrazioni scalari di alcool etilico (dal 100% al 50%) per finire con l'immersione delle sezioni in acqua deionizzata. In seguito, per eseguire il blocco delle perossidasi endogene, il campione

viene posto per 30 minuti in perossido di idrogeno al 3%, seguito da tre lavaggi da 5 minuti l'uno in tampone salino fosfato (PBS) pH 7.4. Al fine di rendere accessibile gli epitopi (smascheramento) agli anticorpi, è stato effettuato un trattamento al calore in buffer di citrato 10 mM pH 6 a 98°C per 10 minuti per il CNTF, mentre per il CNTFR α le sezioni sono state incubate con 100 ng/ml di Proteinasi K, per 5 minuti a 37 °C. Dopo questo pre-trattamento, per prevenire legami aspecifici degli anticorpi, le sezioni sono incubate con i sieri dell'animale in cui è stato prodotto l'anticorpo secondario, diluiti 1:75 in PBS, per 1 ora a temperatura ambiente.

I campioni sono stati successivamente incubati con gli anticorpi primari riassunti in Tabella 1 overnight a 4 °C. Il giorno successivo le sezioni sono state incubate con l'opportuno anticorpo secondario biotinilato, diluito 1:200 in PBS, per 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, le sezioni sono state fatte reagire per un'ora con una soluzione ABC (Vector, Burlingame, CA), contenente il complesso avidina-biotina-perossidasi, diluito 1:100 in PBS. In seguito è stato utilizzato un substrato cromogeno per la perossidasi, la 3',3'-diamminobenzidina cloridrato (DAB). La reazione tra enzima e substrato provoca la comparsa di aggregati insolubili di colore marrone osservabili al microscopio ottico.

Le sezioni sono state infine contrastate con ematossilina di Mayer per 10 secondi, lavate ripetutamente in acqua corrente, disidratate in soluzioni di alcol a concentrazioni crescenti (da 50% a 100%) e xylolo, e montate con balsamo Eukitt.

2.3 Western blotting

I campioni di placenta sono stati omogenizzati con Ultra-Turrax T8 (IKA-WERKE, Lille, France) in lysis buffer (0.1M PBS, 0.1% w/v SDS, 1% w/w NONIDET-P40, 1 mM w/v Na-ortovanadato, 1 mM w/w PMSF, 12 mM w/v Na-deossicolato, 1.7 µg/ml Aprotitina) e successivamente centrifugati a 3000g per 20 minuti a 4 °C. Per la quantificazione delle proteine presenti nei surnatanti dei campioni è stato utilizzato il metodo Bradford. Questo è un saggio colorimetrico basato sulla variazione di assorbanza del Blue Coomassie in seguito al legame con le proteine. Per effettuare la misurazione viene rilevata l'assorbanza dei preparati a 595 nm. Questi sono stati successivamente diluiti in acqua e sample buffer (un tampone costituito dal 4% SDS, 10% β-mercaptoetanololo, 20% glicerolo, 0.004% bromofenolo) e riscaldati a 95 °C. I campioni vengono caricati in gel di SDS-poliacrilamide al 10% e fatti correre utilizzando una camera elettroforetica ad un ddp di 120 V. In seguito, i campioni separati su gel vengono trasferiti su una membrana di nitrocellulosa e immersi in una soluzione di latte 5% in TBS-T per un'ora, bloccando in questa maniera possibili legami aspecifici. Dopo l'aggiunta dei relativi anticorpi primari (vedi Tabella 1) diluiti in TBS-T, le membrane vengono incubate overnight a 4 °C.

Il giorno successivo le membrane vengono lavate in TBS-T per tre volte, per 5 minuti l'una e incubate con lo specifico anticorpo secondario coniugato con la perossidasi HRP diluito 1:5000 in TBS-T per 1h e 30 minuti a temperatura ambiente. Per la rilevazione è stato utilizzato il "Clarity Western ECL Substrate" (Bio-rad

Laboratories, Segrate (MI), Italy) e le immagini sono state ottenute con il Chemidoc (Bio-Rad Laboratories, Segrate (MI), Italy).

2.4 Colture cellulari

Al fine di utilizzare un modello cellulare per indagare il ruolo del CNTF è stata valutata l'espressione del CNTF e del suo recettore in due linee cellulari di trofoblasto umano. La linea di primo trimestre HTR-8/SVneo (utilizzata come modello di citotrofoblasto) è stata coltivata in RPMI 1640 (Life technologies, CA) supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA) e 100 U/ml di penicillina/streptomicina (Gibco).

Inoltre, la linea cellulare BeWo è stata utilizzata come modello di sinciziotrofoblasto (coriocarcinoma), coltivata in DMEM/F12 (Gibco) con aggiunta del 10% di siero fetale bovino e 100 U/ml di penicillina/streptomicina. Entrambe le linee cellulari sono state incubate a 37°C con 5% di CO₂ fino al raggiungimento della confluenza desiderata. Il terreno è stato cambiato due volte a settimana, mentre le cellule sono state amplificate 1:4 ogni 4 giorni.

2.5 Immunofluorescenza

Le linee cellulari HTR-8/SVneo e BeWo sono state lavate in tampone PBS (Lifetechnology, Monza, Italia), fissati in paraformaldeide al 4% in PBS per 10

minuti a 4 ° C e permeabilizzati con 0,1% di Triton X-100 (Sigma, Milano, Italia) in PBS 0,1 M per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo il lavaggio in PBS a temperatura ambiente, le cellule sono state bloccate con siero di asino normale al 10% (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA) in PBS 0,1 M e incubate overnight a 4 ° C con gli anticorpi anti-CNTF e CNTFR α (vedi Tabella 1). Le cellule sono state quindi lavate tre volte in PBS e incubate con l'anticorpo secondario coniugato con Alexa Fluor 488 (per CNTF) e Alexa Fluor 555 (per CNTFR α) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) per 30 minuti a temperatura ambiente. La sonda TOTO3 è stata utilizzata per la colorazione nucleare. Infine, i vetrini sono stati coperti con propil gallato e valutati con un microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse E600 (Nikon, Düsseldorf, Germania).

2.6 Tabella anticorpi utilizzati

ANTICORPO	IHC	WB	IHF	AZIENDA PRODUTTRICE
CNTF	//	1:400	//	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
CNTF	1:100	//	1:150	Abcam, Cambridge, UK
CNTFR α	//	1:400	//	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
CNTFR α	1:150	//	1:100	Abcam, Cambridge, UK
β -ACTIN	//	1:1000	//	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, USA

3. Risultati

3.1 Espressione del CNTF e CNTFR α nella placenta umana

Tramite l'analisi immunohistochimica dei tessuti placentari umani normali del primo (Figura 7 a,b,e,f) e terzo trimestre (Figura 7 c,d,g,h) abbiamo dimostrato la localizzazione del CNTF (a,b,c,d) e del CNTFR α (e,f,g,h). Il CNTF nelle placente del primo trimestre (a, b) è espresso nel citotrofoblasto villosa (Figura 7 a, frecce) e nella parte prossimale delle colonne placentari (Figura 7 b, asterischi), cioè nelle cellule di citotrofoblasto extravillosa delle colonne vicino allo stroma del villo. Il sinciziotrofoblasto era principalmente negativo (Figura 7 a). Inoltre, le cellule stromali dei villi placentari erano per la maggior parte debolmente positive per CNTF (7 a,b). Nelle placente del terzo trimestre di gestazione (Figura 7 c,d) il CNTF era espresso nello strato di sinciziotrofoblasto (c,d: frecce) mentre il citotrofoblasto villosa e le cellule endoteliali erano principalmente negativi (Figura 7 c,d). Il CNTFR α , nelle placente del primo trimestre (e,f), era espresso nel citotrofoblasto (f: frecce) mentre il sinciziotrofoblasto è risultato essere negativo. Inoltre, le cellule stromali e i vasi placentari (Figura 7 e, punte di freccia) erano positivi per il CNTFR α . Il CNTFR α , nei tessuti placentari di terzo trimestre (g,h), era principalmente espresso nello strato di sinciziotrofoblasto (Figura 7 h: frecce) mentre il citotrofoblasto, le cellule stromali e i vasi placentari erano negativi.

L'analisi tramite western blotting del CNTF e CNTFR α ci ha permesso di valutare la variazione dell'espressione di queste molecole nelle placente del primo e del terzo

trimestre di gestazione (Figura 7 i,l). Come mostrato nella Figura 7 (i, l) nessuna variazione significativa è stata dimostrata nell'espressione del CNTF (i) e CNTFR α (l) nei tessuti placentari del primo (IVG) e del terzo (TERM) trimestre di gestazione sebbene una diminuzione di entrambe le molecole è evidente nel terzo trimestre di gestazione.

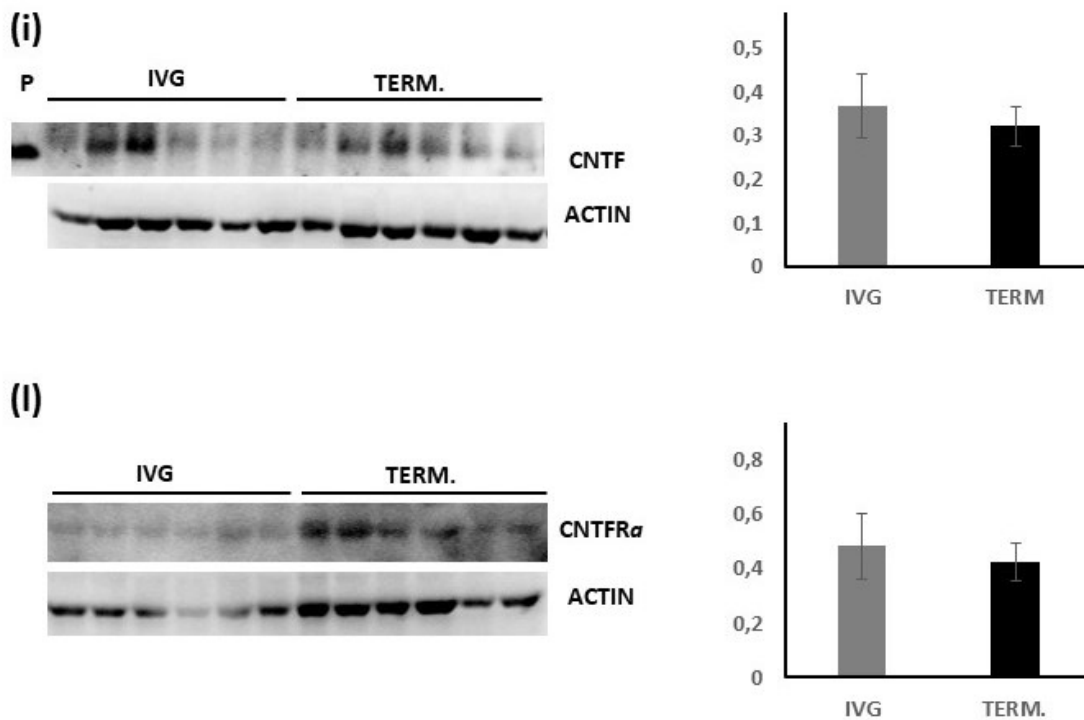
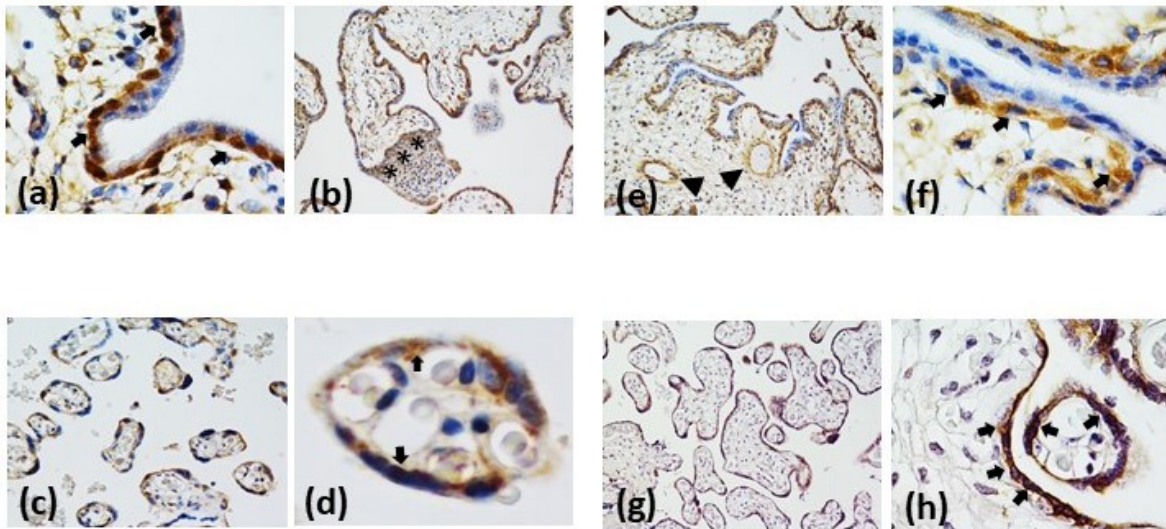


Figura 7 Localizzazione del CNTF nelle placente di primo (a,b) e terzo trimestre (c,d); del CNTFRα nelle placente di primo (e,f) e terzo trimestre (g,h) tramite immunoistochimica. Valutazione quantitativa dell'espressione del CNTF (i) e del CNTFRα (l) e nella placenta umana di primo e terzo trimestre tramite western blotting. P=CNTF ricombinante utilizzato come controllo di peso molecolare. ACTIN: beta-actin come housekeeping. IVG: interruzione volontaria di gravidanza (placente al 1° trimestre di gestazione), TERM: placente al 3° trimestre di gestazione.

3.2 Espressione del CNTF e CNTFR α nelle linee cellulari placentari umane

L'espressione del CNTF e del CNTFR α è stata anche valutata, mediante tecniche di immunofluorescenza, in due diverse linee cellulari, HTR8/SVneo e BeWo, normalmente utilizzate come modelli *in vitro* della placenta umana, rispettivamente per il citotrofoblasto ed il sinciziotrofoblasto. Come mostrato in Figura 8, il CNTF era localizzato nel citoplasma e nel nucleoplasma di entrambe le linee cellulari HTR8/SVneo (Fig. 8a-c) e BeWo (Fig. 8g-i) mentre i nucleoli erano risultati negativi. Il CNTFR α era localizzato nel citoplasma e sulla membrana cellulare di entrambe le linee cellulari (HTR8/SVneo in Figura 8 d-f e BeWo in Fig 8 l-n). I nucleoli erano negativi in entrambe le linee cellulari.

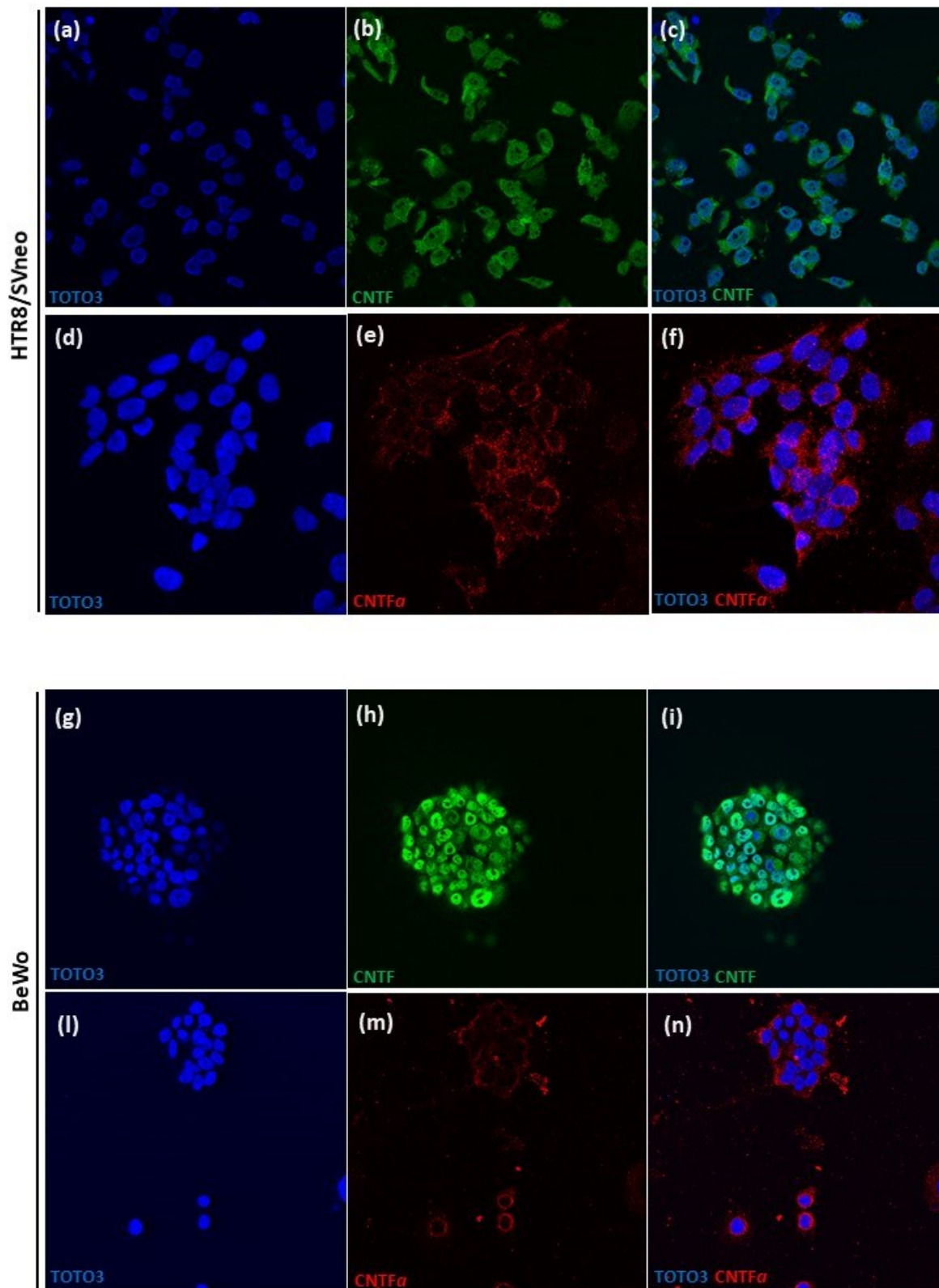


Figura 8 Localizzazione del CNTF (a-c; g-i) e CNTFR α (d-f; l-n) nelle linee cellulari placentari umane HTR8/SVneo (a-f) e BeWo (g-n) mediante immunofluorescenza. CNTF= verde, CNTFR α = rosso, NUCLEI=blu.

4. Discussione

Diversi studi hanno provato la presenza del CNTF e del CNTFR α in vari tessuti, coinvolti nella differenziazione, proliferazione o sopravvivenza di diversi tipi cellulari (10,12) ma non ci sono dati in letteratura riguardanti la loro localizzazione e variazione di espressione nella placenta umana. L'obiettivo di questa ricerca è stato dimostrare per la prima volta la presenza del CNTF e del suo recettore nella placenta umana durante il suo sviluppo.

In questo studio è stato dimostrato che il CNTF e il CNTFR α sono espressi nella placenta umana normale sia durante il primo che il terzo trimestre di gestazione. In particolare, l'analisi immunohistochimica ha rivelato la presenza della citochina e del suo recettore nel citotrofoblasto villosa ed extravillosa durante il primo trimestre di gestazione. Le colonne di citotrofoblasto extravillosa, presenti solo nella placenta del primo trimestre di gestazione, sono strutture molto importanti per il normale sviluppo dei villi placentari perché giocano un ruolo centrale nella crescita del trofoblasto, nell'invasione dell'endometrio durante le prime fasi dello sviluppo placentare e nello sviluppo della vascolarizzazione placentare (21, 22). Inoltre, CNTF e CNTFR α erano espressi dalle cellule stromali dei villi placentari così come nell'endotelio dei vasi fetali al primo trimestre di gestazione (Figura 7 e;f). Questi dati ci suggeriscono che queste due molecole giocano un ruolo chiave nel fisiologico sviluppo della placenta agendo nel rimodellamento dello stroma dei villi ed in modo particolare nel rimodellamento dei vasi fetali.

Al terzo trimestre di gestazione sia il CNTF che il CNTFR α sono espressi nel sinciziotrofoblasto mentre il citotrofoblasto villosa risulta essere prevalentemente negativo. Inoltre, come mostrato dai risultati del Western Blotting la quantit  di queste due molecole non cambia in modo significativo anche se si ha una diminuzione. Questo dato pu  essere spiegato in quanto entrambe le molecole anche se non sono pi  presenti nel citotrofoblasto villosa si ritrovano nel sinciziotrofoblasto, quindi variano di localizzazione e non di espressione quantitativa. Nel terzo trimestre queste molecole non vengono pi  prodotte dal citotrofoblasto in quanto questo prolifera molto pi  lentamente rispetto il primo trimestre e non svolge pi  quell'azione di sviluppo e mantenimento della struttura placentare. Al contrario, il CNTF che il CNTFR α vengono sintetizzati dal sinciziotrofoblasto che deve rimanere integro nella sua struttura e funzione fino al termine della gravidanza. Quindi questo cambiamento di localizzazione delle due molecole potrebbe essere correlato ai processi omeostatici placentari.

Il significato funzionale dell'espressione del CNTF e del suo recettore nel trofoblasto pu  essere anche correlato alla regolazione dei processi di invasivit  ed in particolare nella modulazione dell'attivit  o della sintesi di molecole come le metalloproteasi della matrice extracellulare (MMPs) che sembrano essere sotto il controllo di questa citochina. Questi sono degli enzimi prodotti dal trofoblasto extravillosa durante le prime fasi della gestazione, in particolare sono fondamentali durante l'impianto e l'invasione dell'endometrio da parte della blastocisti. Un'alterata espressione delle MMPs pu  compromettere l'invasione fisiologica del trofoblasto e quindi l'impianto e

la crescita placentare (23). L'alterazione dell'impianto e dello sviluppo placentare può portare a patologie quali la preeclampsia (PE), una sindrome caratterizzata da un innalzamento eccessivo della pressione sanguigna (ipertensione) con un'incidenza dell'8-10%.

A livello molecolare, questa sindrome si manifesta con una minore invasività dell'endometrio da parte del trofoblasto placentare e con un conseguente alterato rimodellamento delle arterie spiraliformi, responsabili dell'apporto di sangue materno alla placenta, che porta la placenta a crescere in una condizione di ipossia patologica (24). Questi presupposti aprono la strada per ulteriori studi sul CNTF e sul suo recettore al fine di comprendere quali processi regolativi alla base dei meccanismi di differenziazione, proliferazione o infiammatori sono regolati da questa citochina.

In conclusione, il nostro lavoro è stato il primo a suggerire un ruolo del CNTF e del suo recettore nello sviluppo della placenta umana, aprendo la strada a nuovi studi funzionali con un occhio attento ad indagini riguardanti gravi patologie come per esempio la PE che colpiscono lo sviluppo di quest'organo.

Bibliografia

- (1) Myatt L.(2002) Role of Placenta in Preeclampsia. *Endocrine*. 2002 Oct;19(1):103-11.
- (2) Gude N.M, Roberts C.T., Kalionis B., King R.G (2004) Growth and function of the normal human placenta
- (3) Pathology of the human placenta
- (4) Lager S, Powell TL. (2012) Regulation of Nutrient Transport across the Placenta. *J Pregnancy*. 2012;2012:179827.
- (5) Staud F, Karahoda R. Trophoblast: The central unit of fetal growth, protection and programming. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018 Dec;105:35-40.
- (6) Fluhr, H., Bischof-Islami, D., Krenzer, S., Licht, P., Bischof, P., Zygmunt, M., 2008. Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and -9 in cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2, and -3 in decidualized endometrial stromal cells. *Fertil. Steril*. 90, 1390–1395.
- (7) Malassine A, Cronier L. Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine* 2002
- (8) Febbraio, M.A. (2007) gp130 receptor ligands as potential therapeutic targets for obesity. *J. Clin. Invest*. 117, 841–849
- (9) Adler,R.,Landa,K.B.,Manthorpe,M.,andVaron,S.(1979).Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* 204,1434–1436.doi:10.1126/science.451576
- (10) Sleeman, M.W., et al. 2000. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR α . *Pharm. Acta Helvet*.
- (11) Mousa A, Bakhiet M (2013) Role of Cytokine Signaling during Nervous System Development. *Int. J. Mol. Sci*. doi:10.3390/ijms140713931

- (12) Zheng K, Zhang Q, et al. (2018) Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) Protects Myocardial Cells from Oxygen Glucose Deprivation (OGD)/Re-Oxygenation via Activation of Akt-Nrf2 Signaling. *Cell Physiol Biochem* 2018;51:1852-1862
- (13) Gloaguen I, Costa P., et al, (1997) Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 6456–6461. Medical Science
- (14) Hu X., Zhao Y., et al (2007) Ciliary neurotrophic factor receptor α subunit–modulated multiple downstream signaling pathways in hepatic cancer cell lines and their biological implications. *Hepatology*. 2008 Apr;47(4):1298-308. doi: 10.1002/hep.22163.
- (15) Matthews, V.B., Febbraio M.A. (2008) CNTF: a target therapeutic for obesity-related metabolic disease? *J Mol Med*
- (16) Heinrich P.C, Behrmann I, et al. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J*; 334, 297–314
- (17) Perugini J, Di Mercurio E, Tossetta G, Severi I, Monaco F, Reguzzoni M, Tomasetti M, Dani C, Cinti S, Giordano A. Biological Effects of Ciliary Neurotrophic Factor on hMADS Adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Nov 12;10:768. doi: 10.3389/fendo.2019.00768. eCollection 2019.
- (18) Heinrich P.C, Behrmann I, et al. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J*. 374, 1–20
- (19) Trimarchi T1, Pachuau J, Shepherd A, Dey D, Martin-Caraballo M. CNTF-evoked activation of JAK and ERK mediates the functional expression of T-type Ca²⁺ channels in chicken nodose neurons. *J Neurochem*. 2009 Jan;108(1):246-59. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05759.x. Epub 2008 Nov 21.
- (20) <https://www.rndsystems.com/pathways/cntf-signaling-pathways>
- (21) Muhlhauser J, Crescimanno C, Kasper M, Zaccheo D, Castellucci M. Differentiation of human trophoblast populations involves alterations in cytokeratin patterns. *J Histochem Cytochem*. 1995;43(6):579-89.

- (22) Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update*. 2007;13(2):121-41.
- (23) Espino Y Sosa S, Flores-Pliego A, Espejel-Nuñez A, Medina-Bastidas D, Vadillo-Ortega F, Zaga-Clavellina V, Estrada-Gutierrez G, New Insights into the Role of Matrix Metalloproteinases in Preeclampsia. *Int J Mol Sci*. 2017 Jul 20;18(7). pii: E1448. doi: 10.3390/ijms18071448.
- (24) Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. *Development*. 2019 Nov 27;146(22). pii: dev163428. doi: 10.1242/dev.163428.