



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale**

**BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**

**Alterazioni molecolari in placentate di pazienti diabetiche**

**Molecular alterations in placenta from diabetic patients**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Principi Simone

Relatore:

Prof.ssa Oliana Carnevali

Correlatore:

Dott.ssa Francesca Maradonna

**Sessione Febbraio 2022**

**Anno accademico**

**2021/2022**

## INDICE

### *Capitolo primo*

<b>INTRODUZIONE</b>	4
1.1 La Placenta	4
1.2 Patologie in gravidanza: focus sul diabete	10
1.3 Apoptosi	14
1.4 Autofagia	16
1.5 Scopo del lavoro	18

### *Capitolo secondo*

<b>MATERIALI E METODI</b>	20
2.1 Campioni di placenta	20
2.2 Estrazione RNA totale	20
2.3 Digestione DNasi e retrotrascrizione a cDNA	21
2.4 Real-time qPCR	21
2.5 Analisi statistica	23
2.6 Analisi istologica	23

2.7 FTIR imaging	25
------------------	----

*Capitolo terzo*

<b>RISULTATI</b>	28
------------------	----

3.1 Dati Clinici Pazienti

3.2 Analisi dei Trascritti Mediante RT-qPCR	28
---	----

3.3 Caratterizzazione Istologica	32
----------------------------------	----

3.4 Determinazione dei Profili Macromolecolari Mediante FTIR	34
--	----

*Capitolo quarto*

<b>DISUSSIONE</b>	37
-------------------	----

<b>CONCLUSIONE</b>	44
--------------------	----

<b>RINGRAZIAMENTI</b>	45
-----------------------	----

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	47
---------------------	----

## **Capitolo primo**

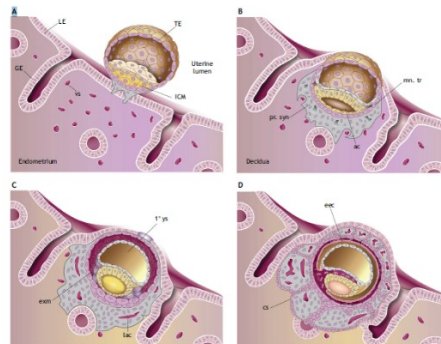
### **INTRODUZIONE**

#### ***1.1 La placenta***

La placenta è un organo deciduo che si forma nell'utero durante la gravidanza. Questa struttura è deputata a nutrire, proteggere e sostenere la crescita fetale. Un'altra funzione importante della placenta è la produzione e il rilascio di ormoni che regolano l'impianto. I più importanti ormoni secreti sono gli estrogeni, il progesterone, la gonadotropina corionica (hCG), i lattogeni placentari (hPL), l'ormone della crescita placentare (hGH) e le citochine (Gude et al. 2004). L'hCG è una glicoproteina dimerica che viene prodotta dal trofoblasto e secreta nel circolo materno. Il livello più alto di questo ormone si raggiunge all'ottava settimana dal concepimento e dura per tutta la gravidanza (Gude et al. 2004). Il progesterone inibisce la contrazione uterina evitando l'aborto (Gude et al. 2004). I lattogeni placentari (hPL) modulano lo sviluppo embrionale, regolando la produzione di insulina e di adrenocorticoidi (Gude et al. 2004). L'ormone di crescita placentare (hGH) svolge un ruolo importante nel regolare il fattore di crescita 1 insulinico (IGF-1), regolando così l'accrescimento fetale e il raggiungimento della taglia adeguata per il parto (Gude et al. 2004). La placenta rappresenta anche una barriera protettiva contro

gli inquinanti e le sostanze xenobiotiche, a tal proposito questo organo provvede al loro smaltimento dato che il fegato fetale è immaturo nei primi mesi di vita (Gude et al. 2004). A partire dal quinto/sesto giorno dopo il concepimento, la blastocisti attua un processo di impianto nell'endometrio, mediato dal trofoectoderma. Le cellule embrionali del sincizio e citotrofoblasto, iniziano a formare propaggini digitiformi, dette villi coriali, che penetrano nell'endometrio vascolarizzato materno, la decidua, rilasciando enzimi che corrodono le pareti dei vasi sanguigni formando così le lacune sanguigne all'interno delle quali avverranno gli scambi gassosi e di nutrienti durante la gestazione (Gong and Kim 2014). Un singolo layer di cellule del sinciziotrofoblasto riveste la parte più esterna dei villi fungendo da barriera cellulare tra il compartimento fetale e il sangue materno. Al di sotto del sinciziotrofoblasto sono presenti le cellule citotrofoblastiche indifferenziate (CTBs), che rappresentano i progenitori delle future cellule trofoblastiche. Le cellule CTBs possono fondersi tra loro costituendo il layer di extravilli trofoblastici (EVTs), disposto alle estremità dei villi d'ancoraggio (Ander, Diamond, and Coyne 2019). Durante il primo trimestre la placenta umana è dicorionica ovvero formata da due layer di cellule trofoblastiche che separano il sangue fetale da quello materno (SYN e CTB). Al crescere della placenta lo strato di CTB si assottiglia fino a integrarsi con al SYN. Il SYN facilita il

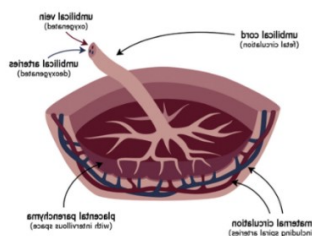
trasporto di nutrienti, gas e prodotti di rifiuto nell'interfaccia materno-fetale (Ander et al. 2019). Gli EVT favoriscono l'adesione all'endometrio e l'invasività di queste cellule è importante per il rimodellamento delle arterie spirali all'esterno del miometrio. Nel primo trimestre gli EVT occludono le arterie spirali creando un ambiente ipossico. Durante la transizione dal primo al secondo trimestre questo strato cellulare viene eroso e lo spazio intervillare (IVS) così creato viene riempito dal sangue materno. La presenza del sangue materno a contatto diretto con il SYN permette lo scambio di nutrienti per il resto della gravidanza (Ander et al. 2019).



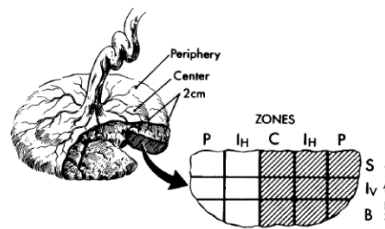
**Figura 1.** Fasi dell'impianto della blastocisti. (A,B) Pre formazione delle lacune sanguigne. (C) Formazione delle lacune sanguigne. (D) Villi primari (Turco and Moffett 2019).

In condizioni normali, la placenta misura in media 22 cm di diametro, 2.5 cm di spessore al centro e pesa all'incirca 500 g. Il cordone ombelicale si forma a partire dalla quinta settimana di gestazione e possono essere facilmente riconosciuti i tre vasi sanguigni: la vena ombelicale e le due arterie ombelicali

che rappresentando i vasi di collegamento tra feto e placenta. Nella vena ombelicale scorre sangue ricco di ossigeno e nutrienti che sostengono l'accrescimento fetale. Le arterie ombelicali trasportano sangue venoso con all'interno anidride carbonica e sostanze di scarto che vengono eliminate (Cellula e Tessuti, Edi-Ermes, Milano). Durante il primo trimestre di gravidanza le membrane amniotiche secernono una gran quantità di molecole ad azione protettiva tra cui lipidi, peptidi e proteine coinvolte nella risposta immunitaria innata (Šket et al. 2021) e nelle fasi tardive si ha l'attraversamento della placenta da parte delle IgG materne in modo da fornire una prima difesa immunitaria al nascituro, oltre a proteggerlo da infezioni virali e batteriche (Cellula e Tessuti, Edi-Ermes, Milano).



**Figura 2.** Placenta umana e rimodellamento vascolare (Schoots et al. 2018).



**Figura 3.** Aree placentari. C = centrale, Ih= intermedia e P = zona periferica nel piano orizzontale; S = subcoriale, Iv = intermedia e B = parabasale nel piano verticale (Bacon, Gilbert, and Longo 1986).

Attraverso la placenta una serie di nutrienti (ossigeno, acqua, carboidrati, amminoacidi, lipidi, vitamine e minerali) di origine materna arrivano al feto mentre l'anidride carbonica e altre sostanze di scarto, dannose per il bambino vengono eliminate. Queste funzioni di scambio placentare cambiano durante la gestazione in maniera adeguata alle fasi di sviluppo embrionale in modo da garantire una taglia corporea adeguata alla nascita (Gude et al. 2004). Il glucosio, necessario per il metabolismo fetale, è il principale substrato metabolico presente nella placenta e riesce ad attraversarla per semplice diffusione facilitata. Le proteine appartenenti alla famiglia GLUTs servono alla regolazione del trasporto del glucosio. L'uptake di glucosio avviene a livello del sinciziotrofoblasto, che riveste i villi, dove viene convertito facilmente in glucosio-6-fosfato o immagazzinato sotto forma di glicogeno. A questo punto il glucosio-6-fosfato viene utilizzato nella respirazione aerobica/anaerobica o nella via dei pentosi fosfato. Il maggior carrier di glucosio che circola nel

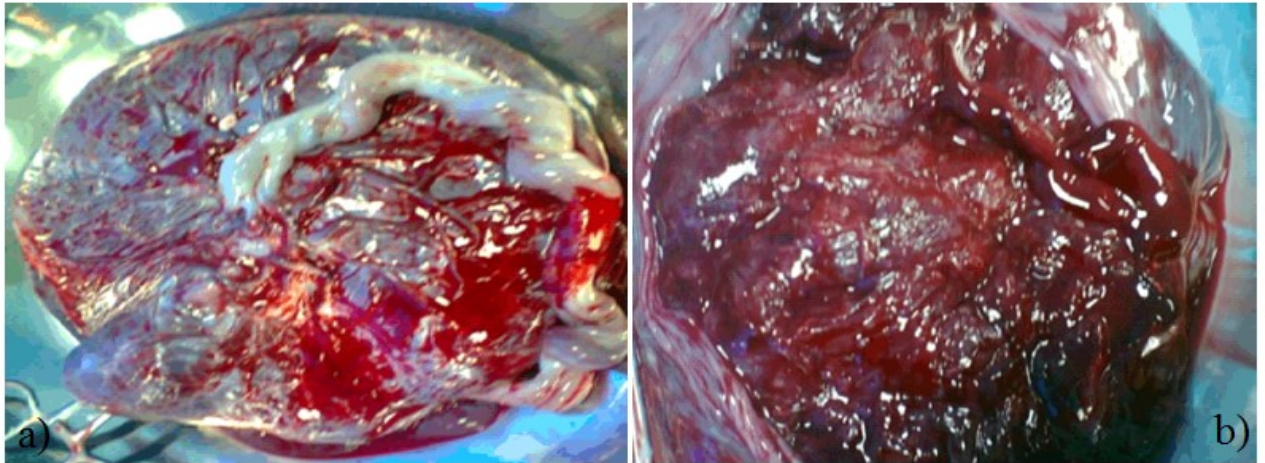


sangue materno e fetale è GLUT1 e l'espressione di queste proteine GLUTs cambia in base al periodo gestazionale (Gude et al. 2004). Oltre al glucosio, gli amminoacidi sono un'altra classe di biomolecole necessarie per un corretto sviluppo fetale. Ciascuno dei 20 amminoacidi viene trasportato verso la placenta in modo attivo, tramite vie di trasporto diverse: trasportatori di amminoacidi cationici, trasportatori sodio dipendenti che legano solamente amminoacidi neutri come alanina, cisteina, serina e trasportatori che necessitano di un gradiente ionico per consentire il legame all'aspartato e all'acido glutammico (Gude et al. 2004). I lipidi sono fondamentali per costituire la membrana plasmatica di tutte le cellule embrionali. La fluidità delle membrane viene indotta dal colesterolo che nella placenta è trasportato dalle lipoproteine LDLs presenti nel sangue materno. I recettori presenti sulla membrana delle cellule del sinciziotrofoblasto favoriscono l'entrata di tale molecola per endocitosi. Per via delle sue funzioni endocrine, la placenta è in grado di regolare l'appetito materno in modo da favorire la formazione di riserve energetiche e predisporre l'organismo all'allattamento (Gude et al. 2004).

## ***1.2 Patologie in gravidanza: focus sul diabete***

Tra le più comuni malattie che possono insorgere durante la gravidanza ci sono la pre-eclampsia (PE), la restrizione della crescita fetale (FGR), e il diabete mellito gestazionale (GDM), che possono comportare alterazioni nella struttura e nella fisiologia della placenta, causando danni alla salute della madre e del feto. La pre-eclampsia (PE) è caratterizzata da un innalzamento eccessivo della pressione sanguigna (ipertensione), spesso in combinazione con il riscontro di una quantità significativa di proteine nelle urine (proteinuria elevata). Esordisce dopo la 20esima settimana gestazionale, in donne precedentemente normotese e non proteinuriche e, di solito, si risolve spontaneamente a distanza di qualche settimana dal parto. Le cause alla base dell'insorgenza della preeclampsia non sono ancora state identificate con certezza, ma si pensa siano determinanti alcune alterazioni nello sviluppo della placenta e dei vasi sanguigni che la irrorano. La restrizione sulla crescita fetale (FGR) o small gestational age (SGA) è causata da un deficit di espressione genica di fattori di crescita insulino-simili -I e -II (IGF-I e IGF-II), entrambi deputati a svolgere ruoli centrali nella normale crescita fetale, stimolando la proliferazione cellulare, la differenziazione, la sintesi di proteine e glicogeno, tutte azioni mediate dai loro recettori e dalle proteine leganti l'IGF (IGFBP). Il diabete gestazionale (GD) è caratterizzato da una resistenza al glucosio. Nella maggior parte delle

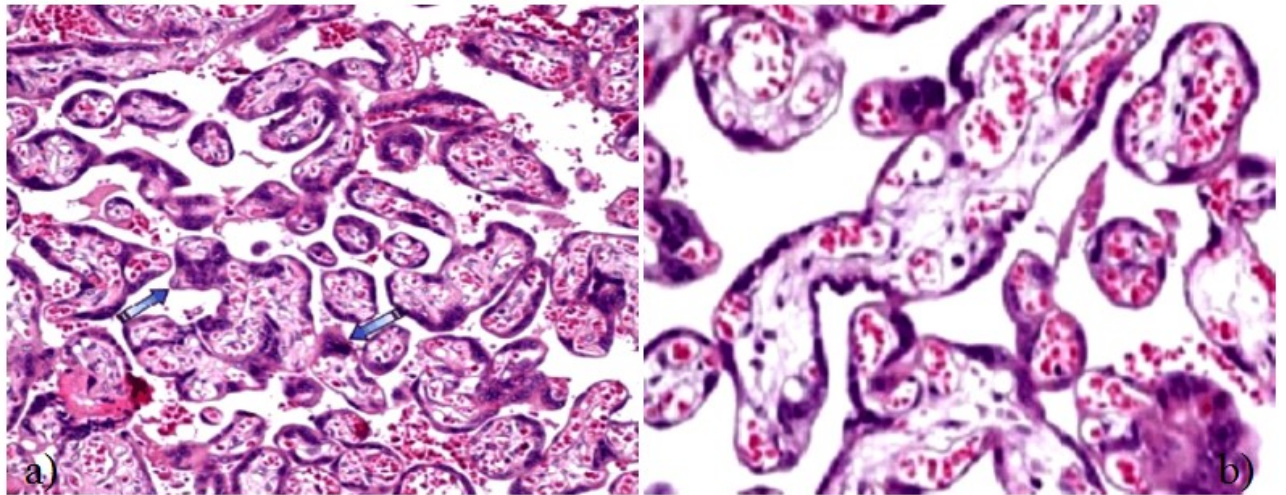
gravidanze la produzione di insulina è sufficiente a superare questa resistenza ma in alcuni casi ciò non avviene, soprattutto negli ultimi mesi della gravidanza, per cui si sviluppa il diabete gestazionale. In genere, il diabete gestazionale scompare dopo il parto ma può ripresentarsi a distanza di anni come diabete di tipo 2 (Edu et al. 2016). Nelle donne diabetiche la placenta assume un peso maggiore rispetto a quelle sane. Si possono notare dei cambiamenti a livello macroscopico, microscopico e genetico tra una placenta diabetica e una normale. Macroscopicamente una placenta di una paziente affetta da diabete gestazionale risulta più grande in taglia, volume, peso e presenta una maggior degradazione fibrosa.



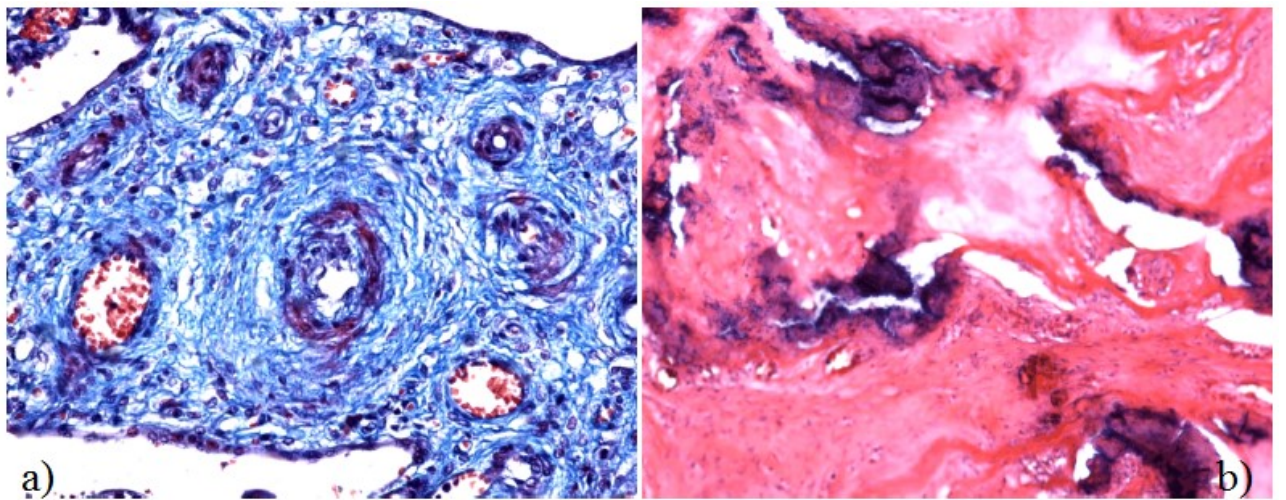
**Figura 4.** a) Placenta controllo; b) Placenta con GD (Edu et al. 2016).

A livello microscopico l'organo patologico è caratterizzato da un aumento dei noduli sinciziali che in rari casi, possono anche causare edema stromale. Molte

volte si nota la presenza di fibre collagene e calcificazione dello stroma villare (Edu et al. 2016).



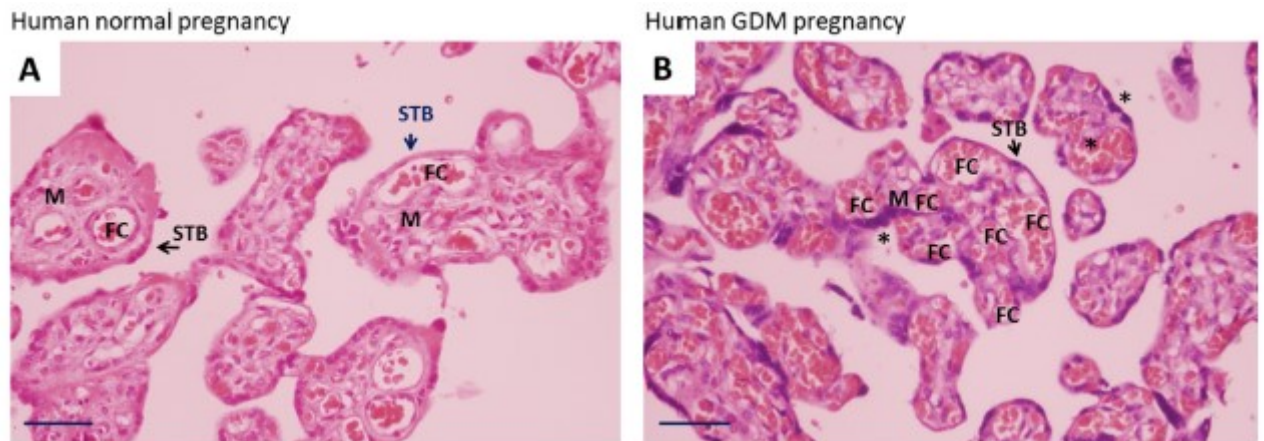
**Figura 5.** (a) Noduli sinciziali; (b) edema stromale (Edu et al. 2016).



**Figura 6.** (a) Depositi collagenosi; (b) calcificazione villare (Edu et al. 2016).

Nel diabete gestazionale (GD) si hanno accumuli di glicogeno nei vari strati placentari con un maggior numero di cotiledoni nella regione centrale rispetto alle placente derivanti da gravidanze non patologiche. Confrontando a livello

microscopico una placenta sana da una diabetica si distingue bene l'incremento del numero dei villi, benché di dimensioni minori e di zone ricche di capillari fetali (FC) disposti centralmente (Carrasco-Wong et al. 2020).



**Figura 7.** Microscopia placentare; M) Tessuto mesenchimale; FC) Capillari fetali; STB) Sinciziotrofoblasto; \* Nodi sinciziali (Carrasco-Wong et al. 2020).

Di fronte a questi cambiamenti morfologici, può risultare utile andare ad analizzare i biomarker genetici coinvolti nel trasporto del glucosio, ovvero tutti i geni della famiglia GLUTs, in modo da monitorare i livelli di glucosio nel sangue materno evitando che insorgano complicanze durante la gravidanza. Lo stile di vita materno (cibo, fumo, alcol, inquinanti endocrini) incide sullo sviluppo del diabete gestazionale e può indurre alterazioni epigenetiche sul feto. Studi dimostrano che la condizione diabetica nella donna induce una risposta infiammatoria nella placenta che determina l'espressione genica di fattori come il  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , attivando a loro volta il processo autofagico (Li

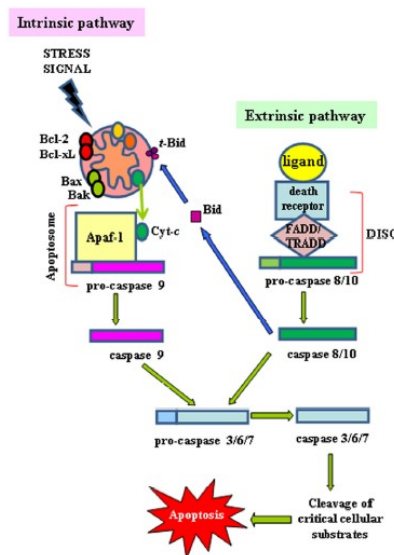
et al. 2020). Generalmente l'autofagia è una normale condizione fisiologica a cui la placenta va incontro per mantenere una corretta omeostasi cellulare. In condizioni patologiche (PE, GDM, FGR) si riscontra una sorta di disequilibrio nelle fasi di morte cellulare (Li et al. 2020). Inoltre, lo stato diabetico causa un aumento della produzione dei radicali di stress ossidativo (ROS) derivati dalla respirazione mitocondriale. Nella risposta antiossidante infatti si notano differenze significative dell'espressione genica degli enzimi superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e glutatione perossidasi (GPx) rispetto alle condizioni normali di controllo (Hoch et al. 2019).

### ***1.3 Apoptosi***

L'apoptosi consiste in un processo di morte cellulare programmata utile al rimodellamento morfologico e strutturale di alcuni organi, tra cui la placenta. Questo meccanismo può essere attivato tramite due vie: intrinseca, indotta da modificazioni a livello mitocondriale ed estrinseca, mediata da un recettore di membrana. Entrambe le vie inducono l'attivazione delle caspasi esecutrici, enzimi coinvolti nell'attivazione delle DNasi che tramite frammentazione del DNA portano la cellula alla morte (Cellula e Tessuti, Edi-Erme, Milano). Nella via intrinseca, l'aumento delle proteine BAX induce il mitocondrio a

rilasciare il citocromo c che legandosi al fattore citosolico Apaf-1 e alla procaspasi 9 forma l'apoptosoma, determinando dapprima l'attivazione della caspasi 9 quindi l'attivazione delle caspasi esecutrici (3, 6 e 7), causando la morte cellulare (Li et al. 1997; Liu et al. 1999). Nella via estrinseca l'attivazione delle caspasi avviene grazie alla trasduzione del segnale Fas ligand e TNF. Il recettore Fas viene regolato dalla proteina FLIP che funge da inibitore dominante (De Falco et al. 2004). TRAIL appartiene alla superfamiglia proteica TNF (tumor necrosis factor) con elevata affinità per i recettori DR4 e DR5 che tramite una cascata di reazioni attivano le caspasi esecutrici (Yuan et al. 2018). Focalizzando sul ruolo dell'apoptosi nella fisiologia della placenta, in questo organo l'apoptosi è coinvolta nella formazione e nel rimodellamento dei villi coriali e diminuisce quando il sinciziotrofoblasto termina la sua differenziazione. I nuclei apoptotici del sinciziotrofoblasto si accumulano negli spazi intervillari formando i nodi sinciziali. Nel primo trimestre di gravidanza l'apoptosi si esplica prevalentemente attraverso la via mediata dal recettore Fas, al contrario, nel terzo trimestre di gravidanza, al livello del sinciziotrofoblasto, si osserva un aumento di Caspasi-9, Caspasi-3 e Apaf-1, riconducibili alla via intrinseca (De Falco et al. 2004). Recenti studi mostrano che durante lo stress indotto dall'apoptosi, Apaf-1, Caspasi-9 e Caspasi-3 sono traslocate dal citoplasma al

nucleo mediante un trasporto attivo (Ritter et al. 2000). Questo evento consente l'attivazione dell'apoptosi con un continuo rimodellamento dei villi coriali a sostegno dello sviluppo embrionale durante la gravidanza.



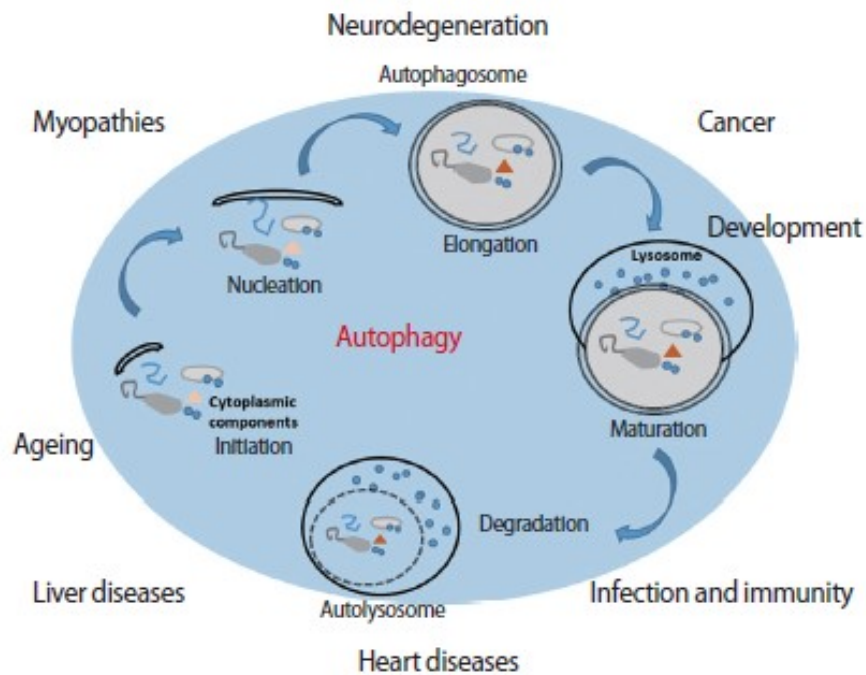
**Figura 8.** Pathway apoptosi cellulare (Pistritto et al. 2016).

### **1.4 Autofagia**

L'autofagia, conosciuta come autofagocitosi, è un processo catabolico che consente la digestione del materiale cellulare ricavandone energia utilizzabile dalle cellule (Levine and Klionsky 2004; Mizushima 2007). Durante la formazione della placenta è importante che tale processo sia finemente regolato alla stessa stregua di quello apoptotico. Questa via di segnalazione permette il differenziamento trofoblastico nella placenta umana e in quella dei modelli



sperimentali murini (Gong and Kim 2014). I due segnali più importanti dell'autofagia sono LC3-II e Beclin-1 che risultano prevalentemente espressi nei villi citotrofoblastici durante il primo trimestre di gravidanza per raggiungere poi alti livelli nella placenta a termine (Chifenti et al. 2013). Studi mostrano che in alcune patologie gestazionali, il processo autofagico è ridotto rispetto al normale sviluppo in gravidanza (Signorelli et al. 2011). La concentrazione di ossigeno e glucosio cambia durante l'età gestazionale, di conseguenza è presente un cambiamento della risposta autofagica a livello del citotrofoblasto (Hung et al. 2013). L'ipossia e l'iperglicemia modificano l'espressione di geni autofagici, come Atg7 e LC3-II, cambiando anche i livelli di apoptosi nelle cellule tramite l'accensione o lo spegnimento del segnale mTOR che controlla numerosi pathway intracellulari (Hung et al. 2013). Inoltre, come per l'apoptosi, anche l'autofagia gioca un ruolo importante nel regolare il normale sviluppo della placenta durante l'invasione trofoblastica nel processo di decidualizzazione (Gong and Kim 2014).



**Figura 9.** Schema del processo autofagico (Gong and Kim 2014).

### ***1.5 Scopo del lavoro***

L'obiettivo di questo studio è stato quello di caratterizzare, mediante un approccio multidisciplinare basato su analisi istologiche, spettroscopiche e molecolari, le placenti derivanti da gravidanze di pazienti affette da diabete. In particolare, le evidenze derivanti dalle analisi istologiche e dalla microspettroscopia infrarossa, sono state integrate da analisi di trascrittomiche. In particolare si è focalizzato sull'espressione dei principali geni legati a: apoptosi, autofagia, stress ossidativo e metabolismo. La

spettroscopia infrarossa FTIR ha fornito indicazioni sulle differenze nella composizione macromolecolare, in termini di lipidi e proteine, a livello dei villi coriali. L'istologia del tessuto deciduo ha fornito ulteriori prove sui cambiamenti morfologici presenti nella placenta di donne affette da diabete gestazionale.

## **Capitolo secondo**

### **MATERIALI E METODI**

#### ***2.1 Campioni di placenta***

I campioni di placenta sono stati forniti dal reparto di ostetricia e ginecologica dell'ospedale pediatrico Salesi di Ancona. Ciascuna paziente donatrice ha firmato un modulo di consenso alla sperimentazione. Sono stati raccolti due diversi gruppi di placenti: Controllo (C) e Diabete Mellito Gestazionale (GDM). Tutti i campioni sono stati prelevati da donne con gravidanza a termine. Per ogni gruppo è stata raccolta una porzione per l'analisi molecolare-conservata in RNA protect (QIAGEN, Germania), una porzione conservata in formalina (BioOptica, Milano, Italia) per le analisi istologiche ed una porzione congelata a -80°C per le analisi con l'FTIR.

#### ***2.2 Estrazione RNA totale***

L'RNA totale è stato estratto da 14 campioni di CTRL e 10 campioni di GDM utilizzando l'RNAzol (Sigma, Milano, Italia) ed un omogenizzatore

(Janke&Kunkel). La qualità dell'RNA ottenuto è stata determinata tramite una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%. La concentrazione finale è stata valutata tramite lo spettrofotometro nanodrop (Implem GmbH, Monaco, Germania).

### ***2.3 Digestione DNasi e retrotrascrizione a cDNA***

La digestione con la DNasi è stata fatta per eliminare le eventuali contaminazioni da parte di DNA genomico. La retrotrascrizione del cDNA è stata eseguita a partire da 1 µg di RNA totale utilizzando il kit iSript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Milano, Italia).

### ***2.4 Real-time qPCR***

Le analisi in PCR Real time sono state condotte con il metodo del SYBR Green in un termociclatore iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BioRad). I valori di espressione sono stati normalizzati utilizzando come standard interni i geni GAPDH e ARP. I primers sono stati utilizzati alla concentrazione finale di 10 µM.

Ogni campione è stato riprodotto in duplicato.

Per ogni campione è stato preparato il seguente mix di reazione:

- 1 µl di cDNA (diluito 1/10);
- 5 µl di 2X SYBR Green PCR Master Mix (BioRad);
- 0,1 µM di primer forward 0,3µM;
- 0,1 µM di primer reverse 0,3µM;
- 3,8 µl di acqua milli-Q.

Nome	Forward	Reverse	Efficienza (Tm°)	Numero di Accesso su Gene Bank
<i>XIAP</i>	TGGCAGATTATGAAGCACGGATC	AGTTAGCCCTCCTCCACAGTGA	58°	XM_030934267.1
<i>CASP3</i>	CTCTGGTTTTTCGGTGGGTGT	CGCTTCCATGTATGATCTTTGGTT	58°	NM_004346.4
<i>CASP7</i>	GTGGGAACGATGGCAGATGA	GAGGGACGGTACAAACGAGG	60°	NM_001227.5
<i>BAX</i>	TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG	TGTGTCCACGGCGCAATCATC	56°	NM_138764.5
<i>AMBRA1</i>	TCCTGCCGGTCCGGTAGAAC	GTTGTCCTCATGGAAATCTGCAA	60°	NM_001267782.2
<i>BECN1</i>	GGCTGAGAGACTGGATCAGG	CTGCGTCTGGGCATAACG	60°	NM_003766.5
<i>MAP1LC3A</i>	GAGAAGCAGCTTCCTGTTCTGG	GTGTCCGTTACCAACAGGAAG	60°	NM_022818.5
<i>ATG5</i>	TGTGCTTCGAGATGTGTGGT	ATGCCATTTAGTGGTGTGC	60°	XM_020976930.1
<i>ATG12</i>	TTTGCTAAAGGCTGTGGG	AAGGAGCAAAGGACTGAT	56°	NM_004707.4
<i>ATG13</i>	TGTCATTGCTGCTGAAGTCCC	CCCCTGTCCCAACACGAACT	58°	XM_036426939.2
<i>SQSTM1</i>	CCAGCACCAAGAGCACGGACAGCG	TGGGGAGAAGAAGGGGACCACGAA	54°	M88108.1
<i>SLC2A1</i>	TGGCATCAACGCTGTCTTCT	AGCCAATGGTGGCATAACACA	60°	AK296736.1
<i>SLC2A2</i>	TGGGCTGAGGAAGAGACTGT	AGAGACTGAAGGATGGCTCG	52°	NM_000340.2
<i>SLC2A9</i>	TCCAGAGGGGCATGAAAATC	CGAGCAGGACCAGTCCAATTT	51°	NM_001001290.2
<i>PPARG</i>	TTCAGAAATGCCTTGCACTG	CACCTCTTTGCTCTGCTCCT	54°	AB247366.1
<i>SOD1</i>	GGTCCTCACTTTAATCCTCTATCCAG	CCAACATGCCTCTCTTCATCC	54°	NM_000454.5
<i>CAT</i>	TCCGGGATCTTTTTAACGCCATTG	TCGAGCACGGTAGGGACAGTTCAC	59°	NM_001752.4

**Tabella 1.** Primers geni analizzati.

## ***2.5 Analisi statistica***

I dati dei livelli di espressione genica sono presentati come media  $\pm$  SD in tutti gli esperimenti. I risultati sono stati elaborati con il programma Graph Pad Prism versione 8 e analizzati utilizzando il sistema two-way ANOVA seguito dal t-test, che paragona tutti i gruppi sperimentali tra loro, considerando come accettabile un valore di  $p < 0.05$ . Differenze statisticamente significative tra controllo e GDM, sono indicate con lettere diverse.

## ***2.6 Analisi istologica***

Per l'analisi istologica sono stati utilizzati 5 campioni di placenta per ogni gruppo sperimentale (CTRL e GDM), sezionati in modo da ottenere due porzioni rappresentative del lato materno e fetale e conservati in 70% etanolo fino al processamento per l'inclusione. L'inclusione in paraffina prevedeva una disidratazione a serie crescente in etanolo (80% per 1 ora, 95% per 1 ora, 100% EtOH per 1 ora). Successivamente i campioni sono stati trattati con Xilene (BioOptica, Milano) per 45 minuti, posti in paraffina bianca liquida per tre ore a 60°C e inclusi in blocchetti per l'istologia. Una volta ottenuti i blocchetti questi sono stati tagliati mediante l'uso di un microtomo (Leica, RM2125RTS, GmbH, Wetzlar, Germany) al fine di ottenere sezioni piccole dallo spessore di

4  $\mu\text{m}$ . Queste sezioni dopo averle disposte su un vetrino porta oggetti sono state fatte asciugare a temperatura ambiente e poi colorate con ematossilina-eosina di Mayer (H&E). Il protocollo di colorazione seguito prevedeva una prima rimozione della paraffina per 20 minuti nello xilene. Le sezioni sono state reidratate con passaggi da 5 minuti ognuno in etanolo (EtOH) decrescente (100%, 95%,80%,70%) e un lavaggio finale in acqua corrente per 10 minuti. Le sezioni sono state colorate con ematossilina (BioOptica, Milano) per 2,5 minuti, lavate in acqua e poi colorate con eosina (BioOptica, Milano) per 20 secondi. Oltre alla colorazione H&E è stata fatta anche la colorazione Masson Tricromica (BioOptica, Milano) per evidenziare il connettivo nelle placente seguendo il protocollo della BioOptica. Dopo la colorazione le sezioni sono state disidratate con passaggi in EtOH crescente, per finire Xilene per 10 minuti e poi un vetrino copri-oggetti è stato montato tramite una resina chiamata safemount (BioOptica, Milano) che consente la preservazione del colorante sulle sezioni di placenta. I campioni ora pronti sono stati visti al microscopio ottico a trasmissione Zeiss Axio Imager A.2 (Zeiss, Oberkochen, Germany) e le immagini sono state acquisite mediante fotocamera a colori ad alta risoluzione Axiocam 503. L'analisi dei dati è stata fatta con il programma ImageJ (Image J, NIH, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>), utilizzando tre immagini per campioni per ogni gruppo sperimentale in modo da vedere se ci



sono differenze statistiche sull'area dei villi coriali e sulla presenza dei noduli sinciziali nelle placente con GDM rispetto a quelle di CTRL.

## ***2.7 FTIR imaging***

Sono stati scongelati da -80 °C campioni di placenta CTRL e placenta GDM per l'analisi in spettroscopia infrarossa (IR). Con l'uso del criomicrotomo (BioOptica, Milano) sono state tagliate sezioni dallo spessore di 8 µm, depositate su vetrini ottici di fluoruro di calcio e lasciati ad asciugare per 30 minuti. Successivamente le sezioni sono state deparaffinate nello xilene per 45 minuti. Utilizzando un interferometro Bruker INVENIO R accoppiato con microscopio IR-Vis è stato possibile fare l'analisi spettroscopica. Il detector bidimensionale FPA viene usato per acquisire in real time immagini di porzioni di tessuto per dare come risultato finale una panoramica dell'intera sezione di placenta che si sta esaminando. Tutto la procedura è stata svolta presso il Laboratorio di Spettroscopia Vibrazionale dell'Università Politecnica delle Marche (DISVA, Ancona, Italia). Le mappe IR sono state fatte su fotografie acquisite con obiettivo 15X. Le dimensioni di queste mappe sono di 164x164 micron e sono composte da 4096 pixel/spettri. La dimensione di ogni pixel

(risoluzione spaziale) è di 2,56x2,56 micron. Con l'uso del software OPUS 7.5 Bruker Optics è stato possibile processare le mappe IR dei campioni. Questo sistema teneva in conto due fattori: Atmospheric Compensation routine (per eliminare il contributo della CO<sub>2</sub> e dell'umidità dell'aria) e Vector Normalization (per eliminare artifici dovuti a differenze nello spessore della sezione). Successivamente le mappe IR sono state analizzate spazialmente in base al tipo di macromolecole presenti all'interno tramite l'integrazione negli intervalli spettrali rappresentativi di:

- lipidi (3050-2800 cm<sup>-1</sup>, LIP)
- proteine (1780-1480 cm<sup>-1</sup>, PRT)

La composizione macromolecolare delle sezioni di placenta è stata valutata tramite rapporti di area delle bande:

- LIP/TBM (rapporto fra l'area della regione spettrale 3050-2800 cm<sup>-1</sup>, rappresentativa dei lipidi e la somma delle aree delle regioni spettrali 3050-2800 cm<sup>-1</sup> e 1800-900 cm<sup>-1</sup>, rappresentativa della biomassa totale, TBM)
- PRT/TBM (rapporto fra l'area della regione spettrale 1780-1480 cm<sup>-1</sup>, rappresentativa delle proteine e la somma delle aree delle regioni

spettrali 3050-2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1800-900  $\text{cm}^{-1}$ , rappresentativa della  
biomassa totale, TBM)

## Capitolo terzo

### RISULTATI

#### 3.1 Dati Clinici Pazienti

I dati demografici e clinici delle pazienti sono stati analizzati per determinare eventuali cambiamenti tra i due gruppi in esame. L'età delle pazienti non presenta variazioni statisticamente significative tra i due gruppi, così come anche il peso dei neonati alla nascita (Tab. 2). L'indice di massa corporea (BMI) calcolato prima e dopo la gravidanza mostra un aumento significativo sia nelle pazienti di controllo che in quelle affette da diabete (Tab. 2).

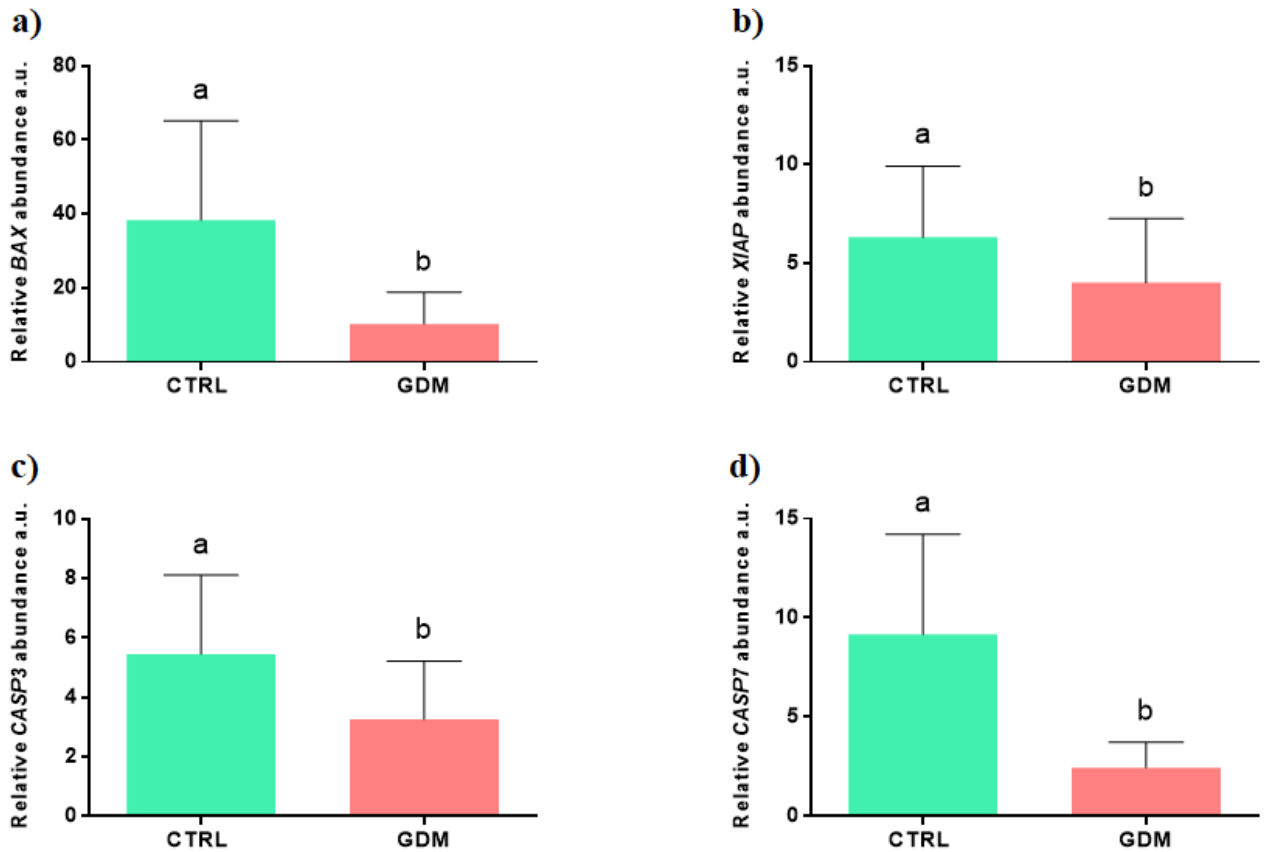
	<b>CTRL</b>	<b>GDM</b>
<b>Età</b>	34.2 ± 6.1 (a)	37.4 ± 4.09 (a)
<b>BMI Pre-gravidico</b>	21.62 ± 2.5 (a)	26.3 ± 2.6 (b)
<b>BMI Post-gravidico</b>	26.3 ± 3.02 (a)	30.52 ± 2.4 (b)
<b>Peso Neonato alla Nascita (Kg)</b>	3.45 ± 0.41 (a)	2.8 ± 0.68 (a)

**Tabella 2.** Caratteristiche materne e fetali di pazienti CTRL (verde) e GDM (rosso).

#### 3.2 Analisi dei Trascritti Mediante RT-qPCR

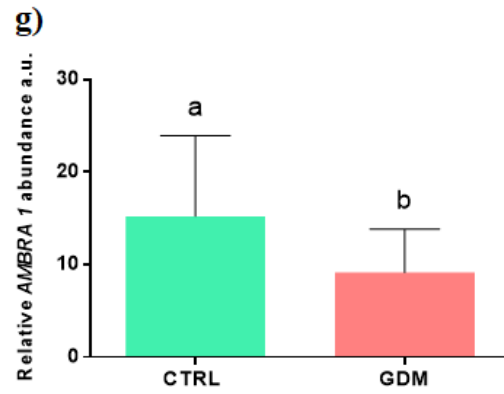
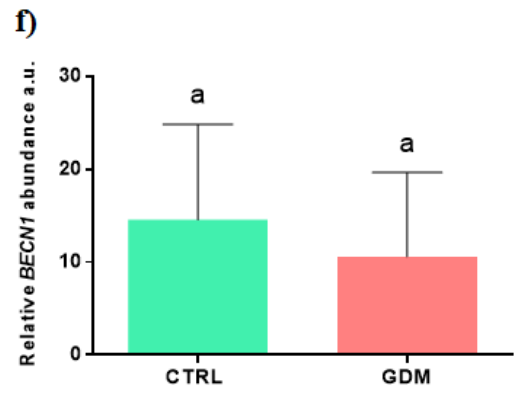
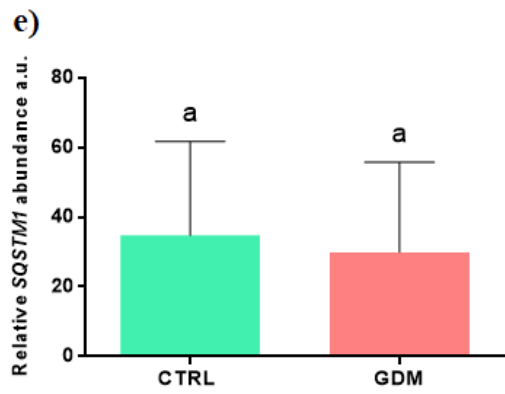
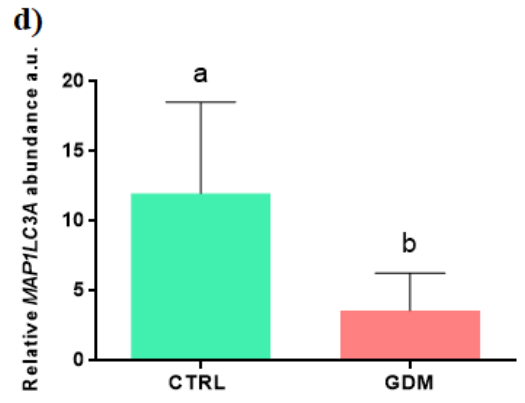
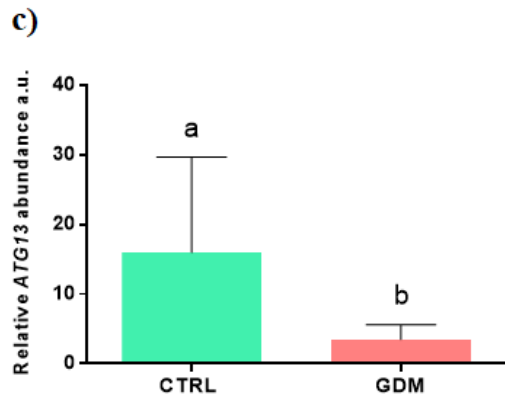
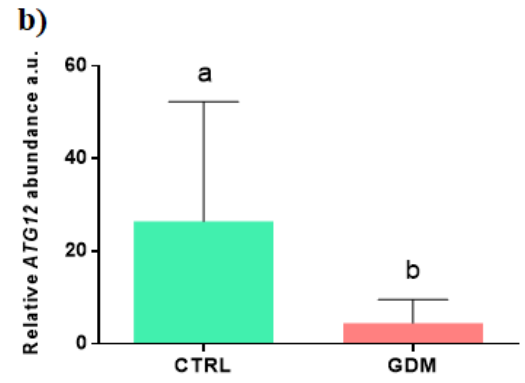
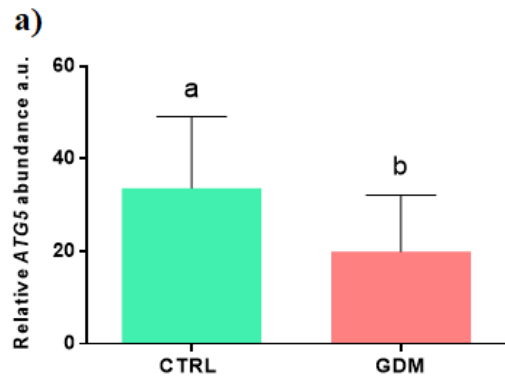
La RT-qPCR è stata utilizzata per effettuare l'analisi dei trascritti di geni coinvolti nel processo apoptotico (*BAX*, *XIAP*, *CASP3* e *CASP7*), nell'autofagia (*ATG5*, *ATG12*, *ATG13*, *SQSTM1*, *AMBRA1*, *MAP1LC3A* e *BECN1*), nello stress ossidativo e infiammazione (*CAT*, *SOD1* e *PPARG*) e nel trasporto del glucosio (*SLC2A1*, *SLC2A2* e *SLC2A9*).

Dall'analisi emerge una diminuzione significativa dell'espressione dei geni *BAX*, *XIAP*, *CASP3* e *CASP7*, coinvolti nell'apoptosi, nelle placente del gruppo GDM rispetto al gruppo CTRL (Fig. 1).



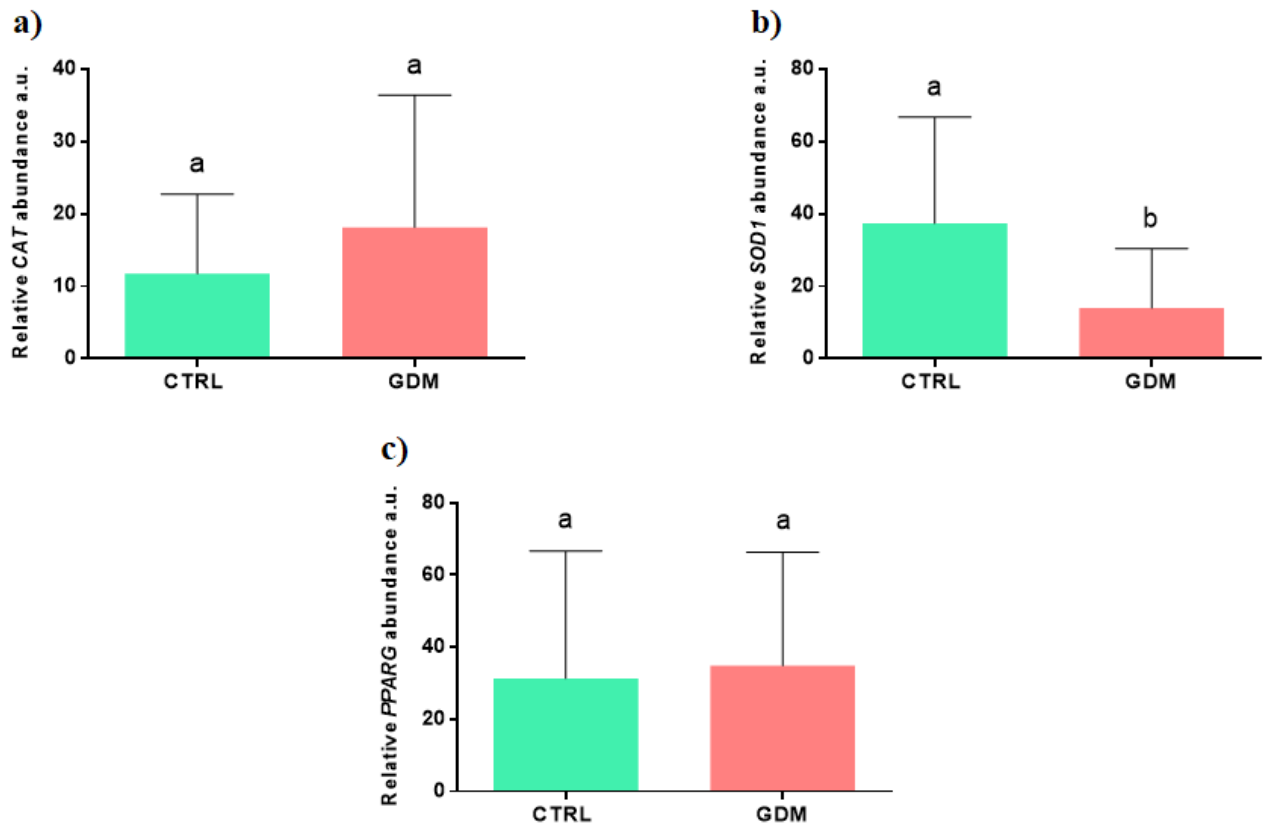
**Figura 10.** Analisi dei trascritti di geni coinvolti nel processo apoptotico (a) *BAX*, b) *XIAP*, c) *CASP3* e d) *CASP7*) nei gruppi CTRL (verde) e GDM (rosso). Gli istogrammi mostrano l'abbondanza relativa dell'espressione genica determinata tramite t-test considerando  $P < 0.05$  come soglia per i cambiamenti significativi. Lettere diverse indicano cambiamenti statisticamente significativi tra i due gruppi.

L'espressione dei geni *ATG5*, *ATG12*, *ATG13*, *AMBRA1* e *MAP1LC3A*, coinvolti nell'autofagia, mostra una diminuzione significativa nel gruppo GDM rispetto al CTRL (Fig. 2a,b,c,d,g), mentre i geni *SQSTM1* e *BECN1* non presentano variazioni rispetto al CTRL (Fig. 2e,f).



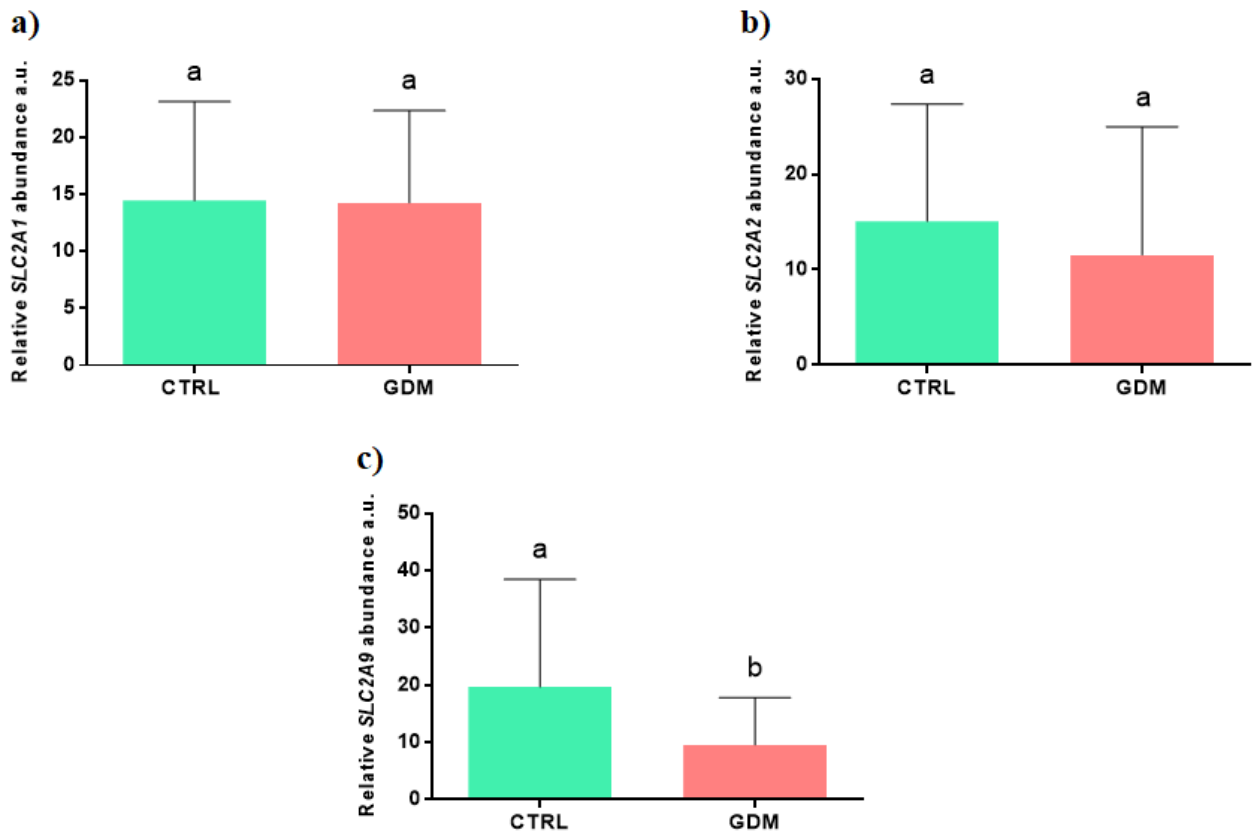
**Figura 11.** Analisi dei trascritti di geni coinvolti nell'autofagia (a) *ATG5*, b) *ATG12*, c) *ATG13*, d) *MAP1LC3A*, e) *SQSTM1*, f) *BECN1* e g) *AMBRA1*) nei gruppi CTRL (verde) e GDM (rosso). Gli istogrammi mostrano l'abbondanza relativa dell'espressione genica determinata tramite t-test considerando  $P < 0.05$  come soglia per i cambiamenti significativi. Lettere diverse indicano cambiamenti statisticamente significativi tra i due gruppi.

Per quanto riguarda i livelli di espressione dei geni *CAT* e *PPARG*, coinvolti nello stress ossidativo e nell'infiammazione, non sono state trovate differenze tra i due gruppi sperimentali (Fig.12a,b), mentre l'espressione di *SOD1* diminuisce significativamente nel GDM rispetto al CTRL (Fig. 12c).



**Figura 12.** Analisi dei trascritti di geni coinvolti nella risposta allo stress ossidativo (a) *CAT*, b) *SOD1* e c) *PPARG*) nei gruppi CTRL (verde) e GDM (rosso). Gli istogrammi mostrano l'abbondanza relativa dell'espressione genica determinata tramite t-test considerando  $P < 0.05$  come soglia per i cambiamenti significativi. Lettere diverse indicano cambiamenti statisticamente significativi tra i due gruppi.

Per quanto riguarda l'espressione dei geni coinvolti nel trasporto del glucosio, *SLC2A9* presenta una diminuzione significativa nel gruppo GDM rispetto al CTRL (Fig. 13c), mentre l'espressione di *SLC2A1* e *SLC2A2* rimane invariata nei due gruppi (Fig. 13 a,b).



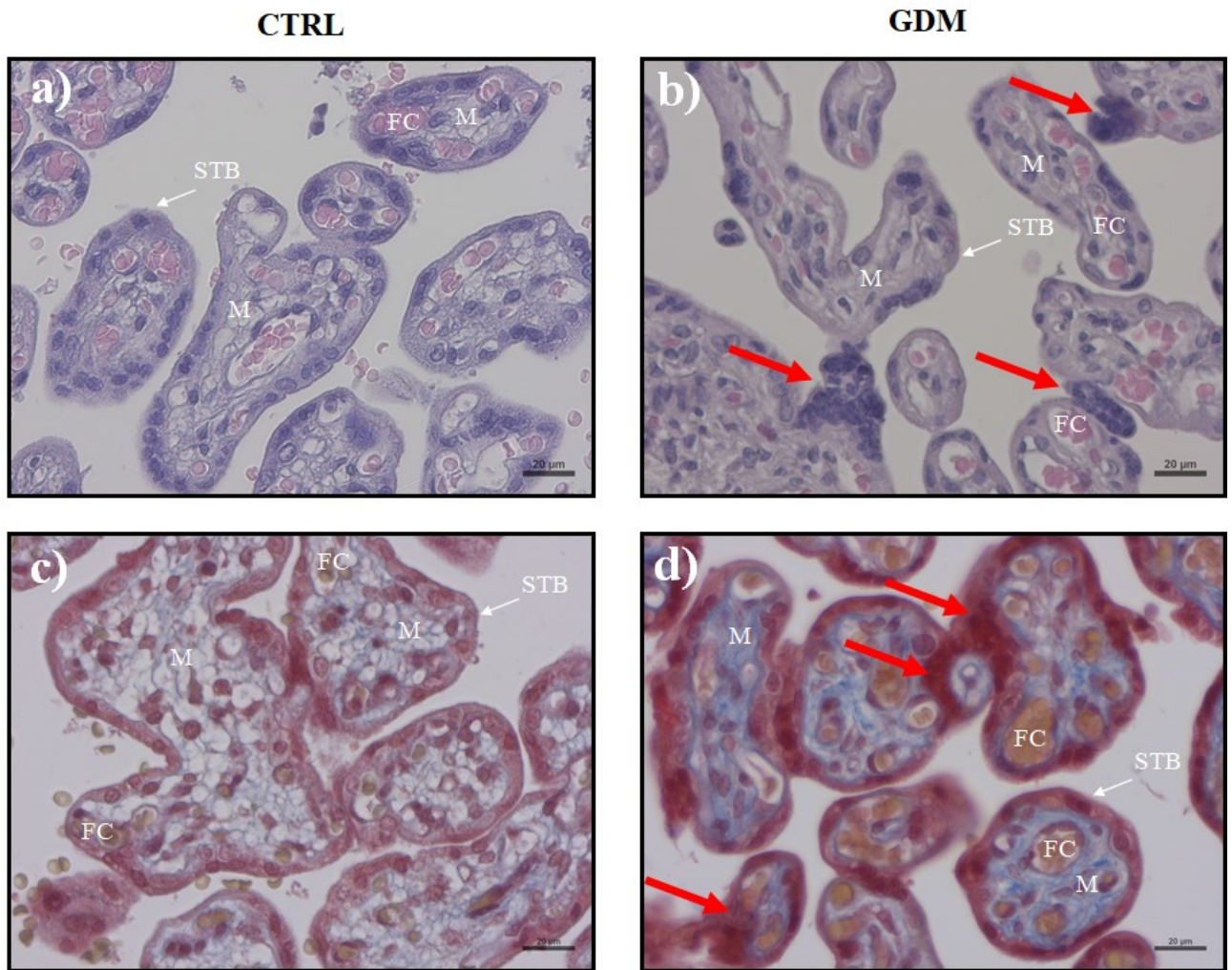
**Figura 13.** Analisi dei trascritti di geni coinvolti nel trasporto del glucosio (a) *SLC2A1*, b) *SLC2A2* e c) *SLC2A9*) nei gruppi CTRL (verde) e GDM (rosso). Gli istogrammi mostrano l'abbondanza relativa dell'espressione genica determinata tramite t-test considerando  $P < 0.05$  come soglia per i cambiamenti significativi. Lettere diverse indicano cambiamenti statisticamente significativi tra i due gruppi.

### 3.3 Caratterizzazione Istologica

In seguito alla colorazione delle sezioni istologiche con Ematossilina ed Eosina e Masson Tricromica è stata eseguita una caratterizzazione morfologica dei campioni dei due gruppi sperimentali. È stata evidenziata una riduzione del



tessuto mesenchimale (M) e una maggiore presenza di capillari fetali (FC) nel gruppo GDM rispetto al CTRL. I FC del gruppo GDM presentavano anche una maggior dilatazione rispetto al CTRL e una disposizione lungo l'asse centrale del villo, rispetto al CTRL dove i FC presentavano una disposizione al di sotto del sinciziotrofoblasto (STB) (Fig. 14).

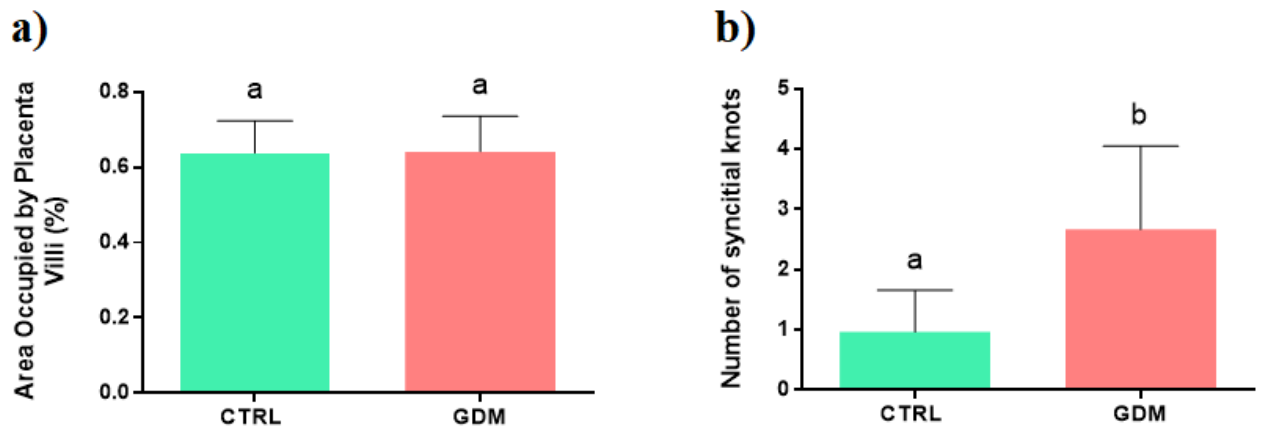


**Figura 14.** Microfotografie di placenti umane da pazienti con gravidanza normale e con diabete mellito gestazionale. a) e c) Villi coriali umani in placenta con gravidanza normale. Il sinciziotrofoblasto (STB) è ben visibile come mostrato dalla presenza di cellule cubiche discontinue che rivestono la parte esterna dei villi. Alla periferia dei villi, vicino al sinciziotrofoblasto, sono presenti i capillari fetali (FC). Il tessuto mesenchimale (M) si trova tra il sinciziotrofoblasto e i capillari. b) e d) Villi coriali umani in placenta con GDM. Nelle figure è possibile apprezzare la presenza di nodi sinciziali (freccie rosse). Tutte le microfotografie della placenta sono state acquisite ad un ingrandimento 400X e la scale bar è di 20 µm. Le immagini a) e b) provengono da campioni colorati con Ematossilina ed Eosina

mentre le immagini c) e d) sono state ottenute da campioni colorati con colorazione Masson Tricromica.

L'area occupata dai villi coriali è stata quantificata nei due gruppi sperimentali ad un ingrandimento del 400X e dall'analisi statistica non emergono differenze significative tra CTRL e GDM (Fig. n a).

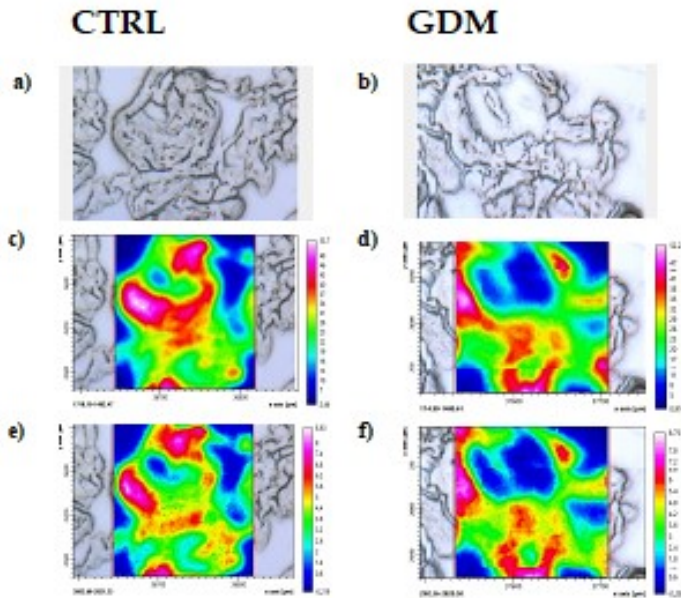
Dalle microfotografie ottenute ad ingrandimento 400X sono stati quantificati i nodi sinciziali nei due gruppi sperimentali, trovando un incremento statisticamente significativo nel gruppo GDM rispetto al CTRL (Fig. n b).



**Figura 15.** a) Area dei villi coriali in placente di CTRL (verde) e GDM (rosso), espressa come percentuale ottenuta considerando il rapporto tra area totale occupata dai villi rispetto alla superficie intera della microfotografia a 400X. b) Numero di nodi sinciziali a livello dei villi coriali in placente di CTRL (verde) e GDM (rosso) in microfotografie a 400X. I dati ottenuti sono stati analizzati tramite t-test considerando  $P < 0.05$  come soglia per i cambiamenti statisticamente significativi. Lettere diverse indicano cambiamenti statisticamente significativi tra i due gruppi.

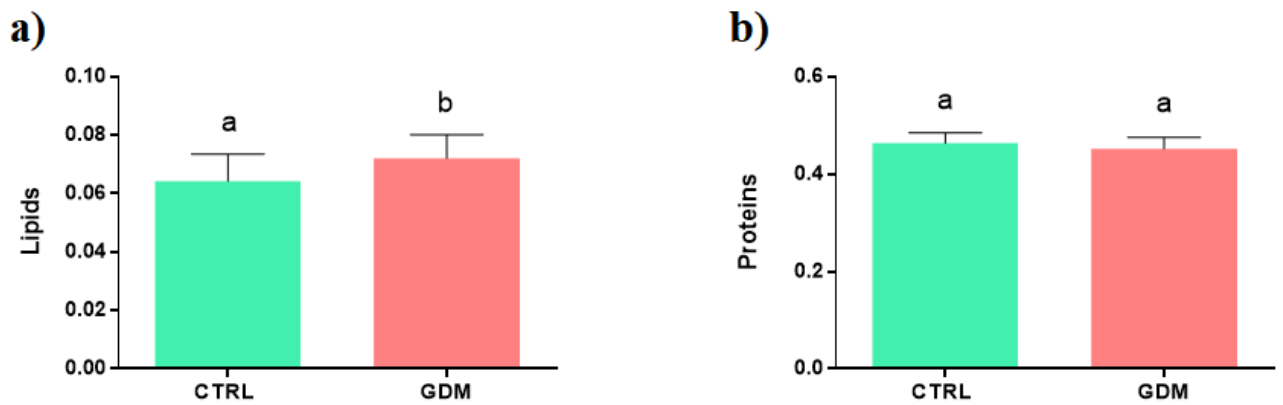
### 3.4 Determinazione dei Profili Macromolecolari Mediante FTIR

Nel panel della Figura 16 sono riportate le immagini a falsi colori che mostrano la distribuzione topografica dei lipidi e delle proteine all'interno dell'area mappata nei due gruppi sperimentali.



**Figura 16.** Microfotografie di sezioni rappresentative dei villi coriali dei gruppi a) CTRL e b) GDM. Immagini a falsi colori che mostrano la distribuzione topografica delle proteine totali c) e d) e dei lipidi totali e) ed f), rispettivamente nei gruppi CTRL e GDM. La scala di colori è stata scelta in modo arbitrario: bianco/rosa chiaro indicano i valori di assorbanza maggiori, mentre blu/nero indicano i valori minori di assorbanza.

Per valutare la composizione macromolecolare dei villi coriali sono stati calcolati degli specifici parametri spettrali. In Fig. 17 a è riportata l'analisi univariata della quantità relativa di lipidi e proteine tra i due gruppi sperimentali analizzati, che mostra un aumento significativo dei livelli di lipidi nel gruppo GDM rispetto al CTRL, mentre non sono state trovate differenze statisticamente significative tra i due gruppi sperimentali per quanto riguarda la componente proteica (Fig. 17b).



**Figura 17.** Variazioni numeriche tra gruppi i gruppi CTRL (verde) e GDM (rosso) dei seguenti parametri spettrali: Lipidi (contenuto di lipidi relative) e Proteine (contenuto proteico relative). I dati ottenuti sono stati analizzati tramite t-test considerando  $P < 0.05$  come soglia per i cambiamenti statisticamente significativi. Lettere diverse indicano cambiamenti statisticamente significativi tra i due gruppi.

## **Capitolo quarto**

### **DISCUSSIONE**

L'insorgenza dell'iperglicemia, durante la gravidanza, è associata ad una patologia gestazionale che può indurre alterazioni morfo-funzionali della placenta (Hoch et al. 2019). I dati clinici dell'ospedale Salesi di Ancona mostrano un incremento del BMI, sia pre-gravidico che post-gravidico, nelle donne con GDM rispetto a quelle di CTRL. Nonostante la bibliografia riporti che i feti nati da donne che presentano GDM siano generalmente di dimensioni significativamente maggiori (macrosomia fetale), in questo studio, non si riscontrano pesi diversi tra i neonati GDM e quelli di controllo ciò è dovuto all'attento monitoraggio, alle appropriate terapie e al rigoroso regime della dieta a cui sono sottoposte queste donne durante tutto il periodo di gravidanza. C'è inoltre da considerare che l'incremento del BMI nelle donne con diabete in gravidanza può infatti causare un disequilibrio della produzione dell'acido docosaesaenoico (DHA), un acido grasso polinsaturo a lunga catena appartenente agli omega-3, risultato essenziale nel neuro sviluppo fetale (Watkins et al. 2021). Oltre a questo, il peso della donna influisce anche su tutti i processi epigenetici che controllano l'accensione o lo spegnimento di geni coinvolti nell'apoptosi e nell'autofagia sia durante la placentazione che durante lo sviluppo fetale (Breton et al. 2020). A questo proposito, i risultati ottenuti in

questo lavoro mostrano una generale inibizione dell'apoptosi, risultando in accordo con studi precedenti in cui la riduzione del processo apoptotico risulta responsabile dell'aumento del peso della placenta e della macrosomia fetale (Kasture, Sahay, and Joshi 2021). Nello specifico, i risultati ottenuti indicano che l'espressione delle caspasi esecutrici, *CASP7* e *CASP3*, diminuisce nel gruppo GDM e trova riscontro in bibliografia, dove la down regolazione dell'espressione delle caspasi è stata osservata in placenti di pazienti affette da GDM (Belkacemi et al. 2013; Hung et al. 2020; Magee et al. 2014). Inoltre, è stata valutata l'espressione del gene *XIAP* (X-linked inhibitor of apoptosis protein), che codifica per una proteina in grado di inibire l'attivazione delle caspasi esecutrici (3, 7, 9) proteggendo in tal modo la cellula dall'apoptosi (Van Themsche et al. 2010). In accordo con quanto dimostrato precedentemente, di fronte ad un calo dell'apoptosi, ci si sarebbe dovuti aspettare un aumento dei livelli di questo mRNA, ma gli autori di questo studio hanno evidenziato come, in caso di GDM, si osserva un blocco dell'attivazione del promotore di XIAP, responsabile del ritardo dell'attivazione dell'apoptosi (Magee et al. 2014). Quindi, essendo un gene appartenente alla famiglia degli inibitori apoptotici (*IAPs*) la sua diminuzione nel GDM è legata al fatto che non dovendo contrastare aumenti di apoptosi, non viene trascritto. Il gene *BAX* codifica per una proteina associata alla membrana mitocondriale e ne regola la permeabilità

favorendo la fuoriuscita del citocromo c verso il citosol. In placenti GDM, l'espressione di *BAX* è down-regolata rispetto al CTRL, confermando quindi la diminuzione dell'apoptosi che durante il terzo trimestre di gravidanza avviene prevalentemente attraverso la via intrinseca (Cobellis et al. 2007). Il processo di morte cellulare programmata nelle placenti GDM diminuisce quindi, rispetto invece ad altre patologie in cui è stato osservato un aumento (Cobellis et al. 2007; Hung et al. 2020). Per quanto riguarda il processo autofagico, i dati presenti in bibliografia relativamente agli effetti legati al GDM sono piuttosto contrastanti; alcuni studi, infatti, ne mostrano una diminuzione (Hung et al. 2020) altri presentano un aumento (Shan, Dong, and Hu 2021). Il trend osservato in questo studio mostra un calo significativo di espressione del gene *ATG13*, a monte della cascata di segnali coinvolti nella formazione dell'autofagosoma (Jao et al. 2013). Questo gene, insieme ad *ATG12* e *ATG5*, entrambi coinvolti nell'elongazione delle vescicole autofagiche, diminuisce nel GDM. Questo risultato è in accordo con quanto osservato per l'espressione di *MAP1LC3A*, anch'esso espresso a livelli maggiori nel CTRL rispetto al GDM. Questo gene codifica per una proteina effettrice che gioca un ruolo importante nel riciclo del materiale cellulare. Anche l'espressione di *AMBR1*, un gene autofagico che contribuisce, insieme ai precedenti segnali, alla formazione dell'autofagosoma e coordina la risposta cellulare allo stress ossidativo (La

Barbera et al. 2019), cala rispetto al CTRL, confermando ulteriormente una minor autofagia in GDM (La Barbera et al. 2019). Una delle cause responsabili della diminuzione di autofagia e apoptosi sembra essere legata al fatto che nel GDM, i recettori dell'insulina sono numericamente inferiori rispetto al CTRL (Magee et al. 2014). Il GDM è caratterizzato quindi da insulina resistenza che genera un'ipervascolarizzazione dei villi placentari con conseguente esposizione fetale a più alti livelli di glucosio (Hiden et al. 2009). Questo aumento di glucosio causa una sovraespressione dei fattori della famiglia IGF e ad altri fattori di crescita come *FGF-2* (Fibroblast grow factor), in grado di inibire l'apoptosi causando ipertrofia placentare (Magee et al. 2014). Lo studio di (Burleigh et al. 2004) mostra che all'aumentare del segnale *FGF-2*, cala l'apoptosi nella placenta, attribuendogli così il ruolo di gene anti apoptotico. Altri autori hanno mostrato che l'IGF è in grado di inibire i processi autofagici e apoptotici grazie all'upregolazione della caspase 4, una caspase infiammatoria (Magee et al. 2014). Questo aumento di infiammazione è probabilmente legato ad una diminuzione della capacità antiossidante delle cellule in placenta con GDM. Anche il presente studio supporta questa ipotesi avendo evidenziato un calo di *SOD1*, come osservato recentemente anche da altri autori (Lin et al. 2021), e dalla mancanza di variazioni di espressione di *CAT*. Questo dimostra che nella placenta diabetica c'è un calo della risposta



antiossidante dovuto alla disfunzione endoteliale che avviene durante lo sviluppo embrionale (Myatt and Cui 2004) e alla minor apoptosi presente (Ohyama et al. 2004). Inoltre, non si osserva una variazione significativa dell'espressione del marker infiammatorio *PPARG* appartenente alla famiglia dei recettori PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors) con funzione di legare fattori trascrizionali che regolano l'attivazione di molti geni coinvolti nel metabolismo cellulare (Jawerbaum and Capobianco 2011). Il GDM causa anche un cambiamento del metabolismo dei carboidrati. In merito a questo, è stata condotta un'analisi di espressione genica dei principali trasportatori del glucosio appartenente alla famiglia proteica GLUTs (*GLUT1*, *GLUT2* e *GLUT9*) (Stanirowski et al. 2018). *GLUT1* è coinvolto nel trasporto del glucosio nella placenta (Stanirowski et al. 2018). *GLUT2* tende a regolare i livelli di zuccheri nei tessuti umani (Stanirowski et al. 2018). Come precedentemente descritto (Jansson et al. 2001) anche in questo studio non è stata osservata una variazione significativa dei livelli di trascritti del carrier del glucosio 1 e 2. Al contrario, il gene *GLUT9* presenta una diminuzione dell'espressione nel GDM rispetto al CTRL. Questo gene codifica per una proteina che ha buona affinità nel legare il fruttosio e l'urato (Bu et al. 2017), quindi potremmo speculare che nella placenta GDM ci sia un minor flusso di fruttosio compensato dagli alti livelli di glucosio presenti. La caratterizzazione

istologica delle placente colorate con H&E e Masson Tricromica nel GDM ha mostrato l'aumento statisticamente significativo dei nodi sinciziali rispetto al CTRL, confermando quanto presente in bibliografia (Meng et al. 2014). I nodi sinciziali sono aggregati di nuclei del sinciziotrofoblasto che si trovano all'estremità dei villi coriali derivati da cellule apoptotiche in via di eliminazione (Huppertz 2008). Il loro incremento significativo nel GDM è una condizione causata dalla diminuzione dell'apoptosi che comporta quindi un minor rimodellamento placentare e quindi un conseguente aumento del peso placentare (Bhattacharjee et al. 2017; Carrasco-Wong et al. 2020; Tewari, Tewari, and Bhardwaj 2011). L'area occupata dai villi coriali non mostra però differenze tra GDM e CTRL, anche se a livello morfologico in GDM all'interno del villo è presente una riduzione del tessuto mesenchimale (M) e una maggiore presenza di capillari fetali (FC). Questa composizione può essere spiegata dal fatto che l'ipossia causata dal GDM potrebbe cambiare la struttura vascolare dei villi coriali modificando la fisiologia delle cellule di sostegno (Augustine et al. 2016). L'immatùrità presente nei villi di placente diabetiche è il risultato di un ridotto trasferimento di ossigeno tra il sangue materno e fetale (Bhattacharjee et al. 2017; Carrasco-Wong et al. 2020). Mediante analisi FTIR, è stato possibile verificare che le placente GDM presentano un aumento significativo dei livelli di lipidi rispetto al CTRL. Questo dato trova spiegazione

nel fatto che l'alta concentrazione di glucosio e di insulina nel diabete comporta un aumento dei livelli di trigliceridi nella placenta sottoforma di gocce lipidiche, riducendo il processo di  $\beta$ -ossidazione necessaria per il loro metabolismo (Elchalal et al. 2005). L'aumento dei lipidi durante lo sviluppo embrionale nei figli di donne diabetiche incrementa la probabilità che in età adulta possano sviluppare patologie come l'obesità (Hulme et al. 2019). I nostri risultati sono in accordo con quelli ottenuti da Zhou e collaboratori, (Zhou et al. 2021) che mediante spettroscopia infrarossa hanno evidenziato un aumento di lipidi nei villi di donne con GDM.

## CONCLUSIONI

In questo lavoro, grazie ad un approccio multidisciplinare, è stato possibile caratterizzare placenti derivanti da parti GDM e di controllo, fornendo evidenze a livello morfologico, trascrizionale e relativamente alla struttura macromolecolare dei villi. Molti dei risultati ottenuti trovano riscontro in letteratura mostrando la validità dell'approccio seguito. Studi futuri saranno volti a mettere in evidenza il coinvolgimento di vie di morte cellulare diverse oltre a quelle analizzate in questo studio e potenzialmente coinvolte nella fisiopatologia placentare.

## RINGRAZIAMENTI

*Vorrei dedicare questo spazio a chi, con dedizione e pazienza, ha contribuito alla realizzazione di questo progetto di tesi.*

Ringrazio infinitamente mia madre e mio padre che hanno investito tempo e denaro per farmi studiare raggiungendo questo traguardo importante della mia vita. Senza i loro insegnamenti e senza il loro supporto, questo lavoro di tesi non esisterebbe nemmeno.

Un ringraziamento particolare va alla mia relatrice Carnevali Oliana che mi ha seguito, con la sua infinita disponibilità, in ogni step della realizzazione dell'elaborato, fin dalla scelta dell'argomento.

Grazie anche alla mia correlatrice Maradonna Francesca e al PhD Giommi Christian per tutte le ore passate in laboratorio a fare PCR, Western Blot, analizzare dati e trovare sempre risposte alle domande che ci si poneva durante questo progetto di ricerca.

Ringrazio la prof. Giorgini Elisabetta dell'Università Politecnica delle Marche insieme a tutto il suo gruppo di ricerca per aver reso possibile l'utilizzo dell'FTIR dando ancor più valore a questa tesi. Grazie anche alla Dr. Montik Nina dell'ospedale Salesi di Ancona per averci fornito con cura e professionalità le placente per questa sperimentazione.

Grazie a tutti i miei colleghi di corso, essendo stati sempre presenti in questi cinque anni di università, mi hanno aiutato a superare mille ostacoli prima di raggiungere questo traguardo importante della mia vita.

Ringrazio Laura che in questi ultimi mesi mi ha sostenuto, dando forza e motivazione fino all'arrivo di questo giorno. Senza te questo momento sarebbe stato diverso, grazie perché ci sei sempre stata.

Grazie anche ai miei amici per avermi regalato in questi anni momenti di spensieratezza e per aver ascoltato tutti i miei sfoghi qualsiasi volta ne avessi avuto bisogno.

Infine, dedico questa tesi a me stesso, ai miei sacrifici e alla mia tenacia che mi ha permesso di arrivare fin qui. Questa laurea è un punto di partenza che mi ha formato su tutti i punti di vista, pronto ad affrontare nuove realtà nel corso della mia vita.

*Ad Maiora Semper.*

## Bibliografia

- Ander, Stephanie E., Michael S. Diamond, and Carolyn B. Coyne. 2019. "Immune Responses at the Maternal-Fetal Interface." *Science Immunology* 4(31). doi: 10.1126/sciimmunol.aat6114.
- Augustine, Geena, Mumtaz Pulikkathodi, Renjith S, and Jithesh TK. 2016. "A Study of Placental Histological Changes in Gestational Diabetes Mellitus on Account of Fetal Hypoxia." *International Journal of Medical Science and Public Health* 5(12):2457. doi: 10.5455/ijmsph.2016.29042016494.
- Bacon, Barry J., Raymond D. Gilbert, and Lawrence D. Longo. 1986. "Regional Anatomy of the Term Human Placenta." *Placenta* 7(3):233–41. doi: 10.1016/S0143-4004(86)80161-8.
- La Barbera, Livia, Francescangelo Vedele, Annalisa Nobili, Marcello D'Amelio, and Paraskevi Krashia. 2019. "Neurodevelopmental Disorders: Functional Role of Ambra1 in Autism and Schizophrenia." *Molecular Neurobiology* 56(10):6716–24. doi: 10.1007/s12035-019-1557-7.
- Belkacemi, Louiza, S. Kjos, D. M. Nelson, M. Desai, and M. G. Ross. 2013.

“Reduced Apoptosis in Term Placentas from Gestational Diabetic Pregnancies.” *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 4(3):256–65. doi: 10.1017/S2040174413000068.

Bhattacharjee, Debashish, Santosh Kumar Mondal, Pratima Garain, Palash Mandal, Rudra Narayan Ray, and Goutam Dey. 2017. “Histopathological Study with Immunohistochemical Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Placentas of Hyperglycemic and Diabetic Women.” *Journal of Laboratory Physicians* 9(04):227–33. doi: 10.4103/jlp.jlp\_148\_16.

Breton, E., V. Gagné-Ouellet, K. Thibeault, R. Guérin, Rj Van Lieshout, P. Perron, Mf Hivert, and L. Bouchard. 2020. “Placental NEGR1 DNA Methylation Is Associated with BMI and Neurodevelopment in Preschool-Age Children.” *Epigenetics* 15(3):323–35. doi: 10.1080/15592294.2019.1666653.

Bu, Pengli, Yuan Le, Yue Zhang, and Xingguo Cheng. 2017. “Hormonal and Chemical Regulation of the Glut9 Transporter in Mice.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 360(1):206–14. doi: 10.1124/jpet.116.237040.

Burleigh, D. W., K. Stewart, K. M. Grindle, H. H. Kay, and T. G. Golos.



2004. “Influence of Maternal Diabetes on Placental Fibroblast Growth Factor-2 Expression, Proliferation, and Apoptosis.” *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 11(1):36–41. doi: 10.1016/j.jsgi.2003.06.001.

Carrasco-Wong, Ivo, Alejandra Moller, Fernanda R. Giachini, Victor V.

Lima, Fernando Toledo, Jana Stojanova, Luis Sobrevia, and Sebastián

San Martín. 2020. “Placental Structure in Gestational Diabetes Mellitus.”

*Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*

1866(2):165535. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.165535.

Chifenti, Barbara, Maria Teresa Locci, Gloria Lazzeri, Mariangela

Guagnozzi, Dino Dinucci, Federica Chiellini, Maria Elena Filice, Maria

Giovanna Salerno, and Lorella Battini. 2013. “Autophagy-Related Protein

LC3 and Beclin-1 in the First Trimester of Pregnancy.” *Clinical and*

*Experimental Reproductive Medicine* 40(1):33–37. doi:

10.5653/cerm.2013.40.1.33.

Cobellis, Luigi, Maria De Falco, Marco Torella, Elisabetta Trabucco,

Francesca Caprio, Elisabetta Federico, Lucrezia Manente, Gabriele

Coppola, Vincenza Laforgia, Roberto Cassandro, Nicola Colacurci, and

Antonio De Luca. 2007. “Modulation of Bax Expression in Physiological

and Pathological Human Placentas throughout Pregnancy.” *In Vivo* 21(5):777–84.

Edu, Antoine, Cristina Teodorescu, Carmen Gabriela Dobjanschi, Zița Zsuzsana Socol, Valeriu Teodorescu, Alexandru Matei, Dinu Florin Albu, and Gabriela Radulian. 2016. “Placenta Changes in Pregnancy with Gestational Diabetes.” *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 57(2):507–12.

Elchalal, Uriel, W. Timothy Schaiff, Steven D. Smith, Eli Rimon, Ibrahim Bildirici, D. Michael Nelson, and Yoel Sadovsky. 2005. “Insulin and Fatty Acids Regulate the Expression of the Fat Droplet-Associated Protein Adipophilin in Primary Human Trophoblasts.” *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 193(5):1716–23. doi: 10.1016/j.ajog.2005.04.012.

De Falco, M., V. Fedele, L. Cobellis, A. Mastrogiacomo, S. Leone, D. Giraldi, B. De Luca, V. Laforgia, and A. De Luca. 2004. “Immunohistochemical Distribution of Proteins Belonging to the Receptor-Mediated and the Mitochondrial Apoptotic Pathways in Human Placenta during Gestation.” *Cell and Tissue Research* 318(3):599–608. doi: 10.1007/s00441-004-0969-4.

- Gong, Jin Sung, and Gi Jin Kim. 2014. "The Role of Autophagy in the Placenta as a Regulator of Cell Death." *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 41(3):97–107. doi: 10.5653/cerm.2014.41.3.97.
- Gude, Neil M., Claire T. Roberts, Bill Kalionis, and Roger G. King. 2004. "Growth and Function of the Normal Human Placenta." *Thrombosis Research* 114(5-6 SPEC. ISS.):397–407. doi: 10.1016/j.thromres.2004.06.038.
- Hidden, Ursula, Elisabeth Gltzner, Michaelae Hartmann, and Gernot Desoye. 2009. "Insulin and the IGF System in the Human Placenta of Normal and Diabetic Pregnancies." *Journal of Anatomy* 215(1):60–68. doi: 10.1111/j.1469-7580.2008.01035.x.
- Hoch, Denise, Martin Gauster, Sylvie Hauguel-de Mouzon, and Gernot Desoye. 2019. "Diabesity-Associated Oxidative and Inflammatory Stress Signalling in the Early Human Placenta." *Molecular Aspects of Medicine* 66(December 2018):21–30. doi: 10.1016/j.mam.2018.11.002.
- Hulme, Charlotte H., Anna Nicolaou, Sharon A. Murphy, Alexander E. P. Heazell, Jenny E. Myers, and Melissa Westwood. 2019. "The Effect of High Glucose on Lipid Metabolism in the Human Placenta." *Scientific Reports* 9(1):1–9. doi: 10.1038/s41598-019-50626-x.

Hung, Tai Ho, T'sang T. an. Hsieh, Szu Fu Chen, Meng Jen Li, and Yi Lin Yeh. 2013. "Autophagy in the Human Placenta throughout Gestation." *PLoS ONE* 8(12):1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0083475.

Hung, Tai Ho, Shih Yin Huang, Szu Fu Chen, Chung Pu Wu, and T'sang T. an. Hsieh. 2020. "Decreased Placental Apoptosis and Autophagy in Pregnancies Complicated by Gestational Diabetes with Large-for-Gestational Age Fetuses." *Placenta* 90(December 2019):27–36. doi: 10.1016/j.placenta.2019.12.003.

Huppertz, B. 2008. "The Anatomy of the Normal Placenta." *Journal of Clinical Pathology* 61(12):1296–1302. doi: 10.1136/jcp.2008.055277.

Jansson, Thomas, Ylva Ekstrand, Margareta Wennergren, and Theresa L. Powell. 2001. "Placental Glucose Transport in Gestational Diabetes Mellitus." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 184(2):111–16. doi: 10.1067/mob.2001.108075.

Jao, Christine C., Michael J. Ragusa, Robin E. Stanley, and James H. Hurley. 2013. "What the N-Terminal Domain of Atg13 Looks like and What It Does: A HORMA Fold Required for PtdIns 3-Kinase Recruitment." *Autophagy* 9(7):1112–14. doi: 10.4161/auto.24896.

Jawerbaum, A., and E. Capobianco. 2011. "Review: Effects of PPAR

Activation in the Placenta and the Fetus: Implications in Maternal Diabetes.” *Placenta* 32(SUPPL. 2):212–17. doi: 10.1016/j.placenta.2010.12.002.

Kasture, Vaishali, Akriti Sahay, and Sadhana Joshi. 2021. *Cell Death Mechanisms and Their Roles in Pregnancy Related Disorders*. Vol. 126. 1st ed. Elsevier Inc.

Levine, Beth, and Daniel J. Klionsky. 2004. “Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy.” *Developmental Cell* 6(4):463–77. doi: 10.1016/S1534-5807(04)00099-1.

Li, Peng, Deepak Nijhawan, Imawati Budihardjo, Srinivasa M. Srinivasula, Manzoor Ahmad, Emad S. Alnemri, and Xiaodong Wang. 1997. “Cytochrome c and DATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade.” *Cell* 91(4):479–89. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80434-1.

Li, Yi Xiao, Deng Lu Long, Jia Liu, Di Qiu, Jingyun Wang, Xin Cheng, Xuesong Yang, Rui Man Li, and Guang Wang. 2020. “Gestational Diabetes Mellitus in Women Increased the Risk of Neonatal Infection via Inflammation and Autophagy in the Placenta.” *Medicine* 99(40):e22152. doi: 10.1097/MD.00000000000022152.

- Lin, Peihong, Xuedan Lai, Ling Wu, Wei Liu, Shiqiang Lin, and Jianwen Ye. 2021. "Network Analysis Reveals Important Genes in Human Placenta." *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 47(8):2607–15. doi: 10.1111/jog.14820.
- Liu, Xuesong, Hua Zou, Piotr Widlak, William Garrard, and Xiaodong Wang. 1999. "Activation of the Apoptotic Endonuclease DFF40 (Caspase-Activated DNase or Nuclease). Oligomerization and Direct Interaction with Histone H1." *Journal of Biological Chemistry* 274(20):13836–40. doi: 10.1074/jbc.274.20.13836.
- Magee, Thomas R., Michael G. Ross, Lauren Wedekind, Mina Desai, Siri Kjos, and Louiza Belkacemi. 2014. "Gestational Diabetes Mellitus Alters Apoptotic and Inflammatory Gene Expression of Trophoblasts from Human Term Placenta." *Journal of Diabetes and Its Complications* 28(4):448–59. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2014.03.010.
- Meng, Q., L. Shao, X. Luo, Y. Mu, W. Xu, C. Gao, L. Gao, J. Liu, and Y. Cui. 2014. "Ultrastructure of Placenta of Gravidas with Gestational Diabetes Mellitus." *Fertility and Sterility* 102(3):e251. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.855.
- Mizushima, Noboru. 2007. "Autophagy: Process and Function." *Genes and*

*Development* 21(22):2861–73. doi: 10.1101/gad.1599207.

Myatt, Leslie, and Xiaolan Cui. 2004. “Oxidative Stress in the Placenta.”

*Histochemistry and Cell Biology* 122(4):369–82. doi: 10.1007/s00418-004-0677-x.

Ohyama, Makiko, Yasufumi Itani, Michiko Yamanaka, Akiko Goto, Keisuke

Kato, Rieko Ijiri, and Yukichi Tanaka. 2004. “Maternal, Neonatal, and Placental Features Associated with Diffuse Chorioamniotic

Hemosiderosis, with Special Reference to Neonatal Morbidity and

Mortality.” *Pediatrics* 113(4 I):800–805. doi: 10.1542/peds.113.4.800.

Pistritto, Giuseppa, Daniela Trisciuglio, Claudia Ceci, Alessia Garufi, and

Gabriella D’Orazi. 2016. “Apoptosis as Anticancer Mechanism: Function and Dysfunction of Its Modulators and Targeted Therapeutic Strategies.”

*Aging* 8(4):603–19. doi: 10.18632/aging.100934.

Ritter, Philipp M., Andreas Marti, Céline Blanc, Anna Baltzer, Stanislaw

Krajewski, John C. Reed, and Rolf Jaggi. 2000. “Nuclear Localization of Procaspase-9 and Processing by a Caspase-3-like Activity in Mammary

Epithelial Cells.” *European Journal of Cell Biology* 79(5):358–64. doi:

10.1078/S0171-9335(04)70040-0.

Schoots, Mirthe H., Sanne J. Gordijn, Sicco A. Scherjon, Harry van Goor, and

- Jan Luuk Hillebrands. 2018. "Oxidative Stress in Placental Pathology." *Placenta* 69:153–61. doi: 10.1016/j.placenta.2018.03.003.
- Shan, Dan, Ruihong Dong, and Yayi Hu. 2021. "Current Understanding of Autophagy in Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy." *Placenta* 115:53–59. doi: 10.1016/j.placenta.2021.09.014.
- Signorelli, P., L. Avagliano, E. Virgili, V. Gagliostro, P. Doi, P. Braidotti, G. P. Bulfamante, R. Ghidoni, and A. M. Marconi. 2011. "Autophagy in Term Normal Human Placentas." *Placenta* 32(6):482–85. doi: 10.1016/j.placenta.2011.03.005.
- Šket, Tina, Taja Železnik Ramuta, Marjanca Starčič Erjavec, and Mateja Erdani Kreft. 2021. "The Role of Innate Immune System in the Human Amniotic Membrane and Human Amniotic Fluid in Protection Against Intra-Amniotic Infections and Inflammation." *Frontiers in Immunology* 12(October):1–18. doi: 10.3389/fimmu.2021.735324.
- Stanirowski, Paweł Jan, Dariusz Szukiewicz, Monika Pazura-Turowska, Włodzimierz Sawicki, and Krzysztof Cendrowski. 2018. "Placental Expression of Glucose Transporter Proteins in Pregnancies Complicated by Gestational and Pregestational Diabetes Mellitus." *Canadian Journal of Diabetes* 42(2):209–17. doi: 10.1016/j.jcjd.2017.04.008.



Tewari, Vineeta, Ajoy Tewari, and Nikha Bhardwaj. 2011. "Histological and Histochemical Changes in Placenta of Diabetic Pregnant Females and Its Comparison with Normal Placenta." *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 1(1):1–4. doi: 10.1016/S2222-1808(11)60001-7.

Van Themsche, Céline, Parvesh Chaudhry, Valérie Leblanc, Sophie Parent, and Eric Asselin. 2010. "XIAP Gene Expression and Function Is Regulated by Autocrine and Paracrine TGF- $\beta$  Signaling." *Molecular Cancer* 9:1–12. doi: 10.1186/1476-4598-9-216.

Turco, Margherita Y., and Ashley Moffett. 2019. "Development of the Human Placenta." *Development (Cambridge)* 146(22):1–14. doi: 10.1242/dev.163428.

Watkins, Oliver C., Preben Selvam, Reshma Appukuttan Pillai, Victoria K. B. Cracknell-Hazra, Hannah E. J. Yong, Neha Sharma, Amaury Cazenave-Gassiot, Anne K. Bendt, Keith M. Godfrey, Rohan M. Lewis, Markus R. Wenk, and Shiao Yng Chan. 2021. "Placental  $^{13}\text{C}$ -DHA Metabolism and Relationship with Maternal BMI, Glycemia and Birthweight." *Molecular Medicine* 27(1). doi: 10.1186/s10020-021-00344-w.

Yuan, Xun, Ambikai Gajan, Qian Chu, Hua Xiong, Kongming Wu, and Gen Sheng Wu. 2018. "Developing TRAIL/TRAIL Death Receptor-Based

Cancer Therapies.”

Zhou, Xiaojie, Weilin Wang, Jiajia Zhong, Wenjie Yu, Yuzhao Tang, and Qun Shu. 2021. “Biomolecular Characterization of Placental Tissues in Gestational Diabetes Mellitus Using Fourier Transform Infrared Microspectroscopy.” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 270:120794. doi: 10.1016/j.saa.2021.120794.