



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Corso di Laurea Triennale in Ingegneria Biomedica

**MODELLIZZAZIONE MATEMATICA DEL TRASPORTO
PLACENTARE DI AMINOACIDI IN GRAVIDANZE SANE O
COMPLICATE DA PATOLOGIE**

Modelling Placental Amino Acids Transport in Healthy or Pathological Pregnancies

Relatore:

Dott. Ing. Micaela Morettini

Rapporto Finale di:

Maria Laura Zagaria

Correlatore:

Dott. Agnese Sbröllini

Prof.ssa Laura Burattini

Anno Accademico 2022/2023

ABSTRACT

La placenta è un organo temporaneo che funge da interfaccia per lo scambio di nutrienti tra madre e feto; altresì, riveste un ruolo importante nell'ambito della respirazione permettendo scambio di ossigeno, rappresenta una barriera protettiva e si comporta come ghiandola endocrina producendo ormoni utili per il proseguimento della gravidanza.

Tra le sostanze nutritive che vengono trasportate al feto, rientrano anche gli aminoacidi, le unità che vanno a formare una proteina; queste ultime rappresentano, infatti, la principale fonte nutritiva per l'uomo e sono anche i costituenti più presenti all'interno delle cellule viventi esplicando la loro funzione di enzimi e proteine regolatrici. Gli aminoacidi si differenziano in essenziali (isoleucina, leucina, tirosina, treonina, metionina, lisina, fenilalanina, triptofano, valina) e non essenziali (glicina, alanina, serina, acido aspartico, acido glutammico, prolina, idrossiprolina, cisteina): i primi sono quelli che l'organismo non è in grado di sintetizzare e che deve pertanto assumere con la dieta, contrariamente ai secondi che possono essere sintetizzati dall'organismo in base alla richiesta metabolica.

Gli aminoacidi, come tutte le altre sostanze, per giungere al feto, sfruttano diversi meccanismi di trasporto che sono stati per la prima volta definiti da Christensen e Van Winkle, esaminando cellule epiteliali e no. La differenziazione ricade in base alla dipendenza o meno dal trasporto dello ione sodio e dal tipo di substrato. Successivamente, è stata proposta una seconda classificazione funzionale che mira a incasellare i diversi sistemi di trasporto in tre macrocategorie quali: accumulatori, scambiatori e facilitati. I primi, ad esempio il tipo A, mediano l'influsso degli aminoacidi per incentivare l'aumento di concentrazione; i secondi, come il tipo L, scambiano di posizione un aminoacido presente al di fuori della cellula con uno presente all'interno senza variare del tutto la concentrazione ma alterando la composizione; gli ultimi, come il tipo T, contrariamente, mediano il trasporto bidirezionale. Gli aminoacidi, per giungere al feto, attraversano due membrane, una microvillosa (MVM) ed una basale (BM), che separano i tre compartimenti primari: madre, sinciziotrofoblasto e fetale.

Conoscere il meccanismo con cui gli aminoacidi vengono trasferiti, attualmente, risulta essere fonte primaria di ricerca al fine di individuare potenziali nuovi biomarcatori in grado di aiutare il clinico nel seguire la crescita fetale e predire eventuali patologie. Pertanto, con l'avvento dell'ingegneria biomedica e con l'introduzione sempre più predominante dei sistemi di supporto alla decisione clinica, si sono sviluppati, nel corso degli anni, modelli matematici e computazionali che mirano ad indagare il trasporto placentare di aminoacidi.

L'intento dello studio è stato quello di valutare inizialmente la variazione di concentrazione degli aminoacidi nel compartimento materno e fetale in condizione di gestazione sana, AGA (appropriate

for gestational age); successivamente, di individuare quelle che possono essere eventuali disfunzioni nelle attività di trasporto placentare di alcuni aminoacidi in condizioni patologiche. Per far questo, si è avvalsi di un modello computazionale e matematico sviluppato nel 2016 che ricorre all'uso di equazioni differenziali per rappresentare il flusso di ogni singolo aminoacido mediato dal sistema di trasporto di competenza. A differenza del modello precedentemente implementato che ha operato solo ed esclusivamente per gruppi di aminoacidi, suddivisi in base ai diversi meccanismi di trasporto, si sono andate a modellare, sull'ambiente di lavoro Simulink, le equazioni generali relative alla variazione di concentrazione di ogni singolo aminoacido all'interno del compartimento materno e fetale; i termini di queste equazioni erano rappresentati, a loro volta, da altre equazioni atte a modellare il flusso dovuto ai diversi meccanismi di trasporto secondo la classificazione precedente. A differenza di altri modelli presenti in letteratura, quello di partenza adottato, si mostra come il più completo in quanto si basa su una interdipendenza tra i diversi meccanismi di trasporto andando anche a considerare l'apporto dovuto al flusso sanguigno.

Per le simulazioni relative alle gravidanze sane, si sono considerate, come concentrazione in ingresso al compartimento materno, quella della arteria radiale mentre, per il compartimento fetale, quella della vena ombelicale. Con il modello, è stato possibile confermare la presenza di una elevata concentrazione fetale rispetto a quella materna ad indicare un trasporto efficiente di aminoacidi utili per il fabbisogno. Le uniche eccezioni sono state rappresentate da alcuni aminoacidi essenziali come tirosina e treonina, nel compartimento materno, dove si evidenzia una diminuzione complessiva della loro concentrazione ad indicare un rilascio uteroplacentare verso la circolazione materna; anche la serina, aminoacido non essenziale, nel compartimento fetale, presenta una diminuzione della sua concentrazione ad indicare un rilascio fetale verso la circolazione ombelicale. Per tutti gli altri aminoacidi, il modello conferma un adeguato assorbimento placentare.

Successivamente, si è ricorsi all'utilizzo del modello al fine di valutare eventuali alterazioni nei meccanismi di trasporto relativamente a due condizioni patologiche quali il ritardo di crescita intrauterino (IUGR) e il diabete mellito gestazionale (GDM). La prima è una patologia diagnosticata durante la gravidanza ed indicante un ritardo di crescita del feto o una crescita minima dello stesso. Si manifesta a seguito di una commistione di disturbi materni, fetali e placentari; una delle cause placentari risulta essere proprio l'insufficienza placentare che determina un'alterazione nella circolazione sanguigna e nel trasporto di nutrienti. La seconda, è una patologia che colpisce le donne in gravidanza ed è associata ad una crescita eccessiva del feto; è caratterizzata da una diminuzione della sensibilità materna all'insulina e, di conseguenza, da un maggior apporto di glucosio al feto che determina un aumento in termini di massa del feto stesso.

In particolare, nel primo caso si sono andati a variare i parametri cinetici del modello e quelli relativi al flusso sanguigno, seguendo le evidenze riportate in letteratura; secondo queste, infatti, il flusso sanguigno diminuisce di circa il 12.5% nel compartimento materno e l'assorbimento di alcuni aminoacidi, come lisina e leucina, si riduce, di quasi la metà, in entrambe le interfacce. Il fine è stato quello di poter ottenere risultati analoghi alle evidenze ottenute da altri studi; nel secondo caso, si sono variati soltanto i parametri cinetici in quanto non vi sono evidenze che dimostrano un'alterazione nella circolazione materna e fetale. I parametri cinetici sono stati variati tenendo conto di un aumento, oltre le condizioni del normale, della concentrazione degli aminoacidi.

In entrambi i casi, si sono esclusivamente indagati i meccanismi di trasporto A ed L in quanto risultano, secondo i dati sperimentali presenti in letteratura, quelli più compromessi.

Infatti, il modello è stato prima testato e poi successivamente validato per entrambe le patologie confermando, nel caso dell'IUGR, un aumento della concentrazione materna di aminoacidi, di circa il 40%, ed una diminuzione della concentrazione fetale, di circa il 60%, atta a dimostrare il mancato apporto di nutrienti al feto che ne limitano e ritardano la crescita; nel caso del GDM, di contro, si è ottenuta una lieve variazione di concentrazione materna ma un aumento di concentrazione fetale, di circa il 10%, dimostrando un eccessivo apporto di nutrienti che altera il trasporto di glucosio e la crescita fetale causando, ad esempio, episodi di macrosomia fetale.

Concludendo, è stato possibile riscontrare come, avvalersi di sistemi di supporto alla decisione clinica, come la modellizzazione matematica, risulta essere uno strumento utile e valido per interrogare la complessa attività del sistema e permettere l'individuazione di nuovi marcatori e features che possano aiutare la previsione di una patologia.

The placenta represents a temporary organ that serves as an interface for the exchange of nutrients between mother and fetus; in addition to this, it plays an important role in respiration by allowing oxygen exchange, it also represents a protective barrier, and it also acts as an endocrine gland producing hormones useful for the continuation of pregnancy.

The nutrients that are transported to the fetus also include amino acids, the units that go to form a protein; in fact, the latter represent the main nutrient source for humans and are also the constituents most present within living cells by exerting their function as enzymes and regulatory proteins. Amino acids are differentiated into essential and nonessential: the first are those that the body is unable to synthesize and must therefore take in through the diet in contrast to the latter, which can be synthesized by the body according to metabolic demand.

Amino acids, like all other substances, reach the fetus by exploiting different transport mechanisms that were first defined by Christensen and Van Winkle by examining epithelial and nonepithelial cells. Differentiation falls according to whether or not they are dependent on sodium ion transport and substrate type. Subsequently, a second functional classification pigeonhole the different transport systems into three macrocategories such as: accumulators, exchangers and facilitators. The former, as system A, mediate the influx of amino acids to stimulate an increase in concentration; the second, as system L, exchange of position an amino acid present outside the cell with one present inside without completely changing the concentration but altering the composition; the latter, as T, conversely, mediate bidirectional transport. In fact, amino acids, in order to reach the fetus, cross two membranes, one microvillous (MVM) and one basal (BM), which separate the three primary compartments: mother, syncytiotrophoblast and fetal.

Knowing the mechanism by which amino acids are transferred, at present, turns out to be a primary source of research in order to identify potential new biomarkers that can help the clinician in tracking fetal growth and predict possible pathology. Therefore, with the advent of biomedical engineering and the increasingly predominant introduction of clinical decision support systems, mathematical and computational models aimed at investigating placental amino acid transport have developed over the years.

The intent of the study was to investigate the variation in amino acid concentrations in the maternal and fetal compartments under healthy gestation, AGA (appropriate for gestational age) conditions; then to identify what may be possible dysfunctions in the placental transport activities of certain amino acids under pathological conditions. To do this, we made use of a computational and mathematical model developed in 2016 that resorts to the use of differential equations to represent the flux of each individual amino acid mediated by the relevant transport system. Therefore, on the Simulink workspace, model the general equations related to the variation of concentration of each

individual amino acid within the maternal and fetal compartment; the terms of these equations were represented, in turn, by other equations designed to model the flux due to the different transport mechanisms according to the classification. Unlike other models in the literature, this one is shown to be the most complete because it is based on an interdependence between the different transport mechanisms and also it considers the input due to blood flow.

For the simulations related to healthy pregnancies, concentration of radial artery was considered as input concentration to the maternal compartment while, for the fetal compartment, concentration of umbilical vein.

With the model, it was possible to confirm the presence of a high fetal concentration relative to maternal concentration indicating efficient transport of amino acids useful for requirements. The only exceptions were tyrosine and threonine, in the maternal compartment, where there is an overall decrease in their concentration indicating a uteroplacental release to the maternal circulation; serine, in the fetal compartment, also shows a decrease in its concentration indicating again a fetal release to the umbilical circulation. For all other amino acids, the model confirms adequate placental uptake.

Next, the model was used to assess possible alterations in transport mechanisms with regard to two pathological conditions, IUGR and GDM. The former is a pathology, diagnosed during pregnancy and indicating fetal growth retardation or minimal fetal growth. It is as a result of a mixture of maternal, fetal and placental disorders; one of the placental causes turns out to be placental insufficiency itself, which results in an alteration in blood circulation and nutrient transport. The second, is a condition that affects pregnant women and is associated with fetal overgrowth; it is characterized by a decrease in maternal insulin sensitivity and consequently an increased supply of glucose to the fetus that results in an increase in terms of fetal mass.

Specifically, in the first pathology, the model's kinetic parameters and those related to blood flow were varied, following the evidence reported in the literature, in order to be able to obtain results similar to the evidence obtained from other studies; in the latter case, only the kinetic parameters were varied because there is no evidence to demonstrate an alteration in maternal and fetal circulation. In particular, on the maternal side, blood flow decreases by 12.5%.

Only the A- and L-transport mechanisms were investigated since they appear, according to experimental data, to be the most impaired.

The model was first tested and then subsequently validated for both diseases confirming, in the case of IUGR, an increase in maternal concentration (40%) and a decrease (60%) in fetal concentration apt to demonstrate the lack of nutrient supply to the fetus that limits and retards its growth; in the case of GDM, on the other hand, was obtained a slight change in maternal concentration but a

disproportionate increase in fetal concentration (10%), demonstrating excessive nutrient intake that alters glucose transport and fetal growth causing, for example, episodes of fetal macrosomia.

In conclusion, it was possible to find that, making use of clinical decision support systems, such as computational modeling, turns out to be a useful and valuable tool to interrogate the complex activity of the system and allow the identification of new markers and features that can help predict pathology.

INDICE

INTRODUZIONE	I
1. GLI AMINOACIDI	1
1.1 CLASSIFICAZIONE	2
1.2 STRUTTURA	3
1.3 METABOLISMO DEGLI AMINOACIDI	6
1.4 AMINOACIDI ESSENZIALI, SEMI-ESSENZIALI E NON ESSENZIALI	7
1.5 AMINOACIDI BASICI, NEUTRI, ACIDI	8
1.6 MECCANISMI DI TRASPORTO	9
2. COMPLESSO MADRE-FETO: LO SCAMBIO DI AMINOACIDI	13
2.1 LA GRAVIDANZA	13
2.1.1 LA FECONDAZIONE E LO SVILUPPO GERMINALE	16
2.1.2 LO SVILUPPO EMBRIONALE	19
2.1.3 LO SVILUPPO FETALE	21
2.1.4 SISTEMA MADRE-FETO	22
2.1.5 LA VALUTAZIONE DEL NEONATO E GLI SCREENING NEONATALI	24
2.2 LA PLACENTA	28
2.2.2 LA CIRCOLAZIONE PLACENTARE	37
2.2.2.1 LA CIRCOLAZIONE MATERNA	37
2.2.2.2 LA CIRCOLAZIONE FETALE	38
2.2.3 LA MEMBRANA PLACENTARE	40
2.3 TRASPORTO DEGLI AMINOACIDI A LIVELLO PLACENTARE	40
2.3.1 SISTEMI DI TRASPORTO	42
2.3.1.1 SISTEMI DI TRASPORTO PER AMINOACIDI NEUTRI	43
2.3.1.2 SISTEMI DI TRASPORTO PER AMINOACIDI BASICI O CATIONICI	44
2.3.1.3 SISTEMI DI TRASPORTO PER AMINOACIDI ANIONICI O ACIDI	45
2.4 PATOLOGIE FETALI	48
2.4.1 IL RITARDO DI CRESCITA INTRAUTERINO (IUGR)	48
2.4.1.1 CAUSE	49
2.4.1.2 CLASSIFICAZIONE	50
2.4.1.3 DIAGNOSI E MONITORAGGIO	51
2.4.1.4 IL TRASPORTO DI AMINOACIDI IN GRAVIDANZE IUGR	53
2.4.2 IL DIABETE MELLITO GESTAZIONALE (GDM)	56
2.4.2.1 DIAGNOSI	56
2.4.2.2 MONITORAGGIO	57
2.4.2.3 IL TRASPORTO DI AMINOACIDI IN GRAVIDANZE GDM	58

3. MODELLIZZAZIONE DEL TRASPORTO DEGLI AMINOACIDI	59
NEL SISTEMA MADRE-FETO	59
3.1 REVISIONE DELLA LETTERATURA SUI MODELLI COMPUTAZIONALI, JANE K. CLEAL (2018)	59
3.2 STUDIO J.K. CLEAL, R.M.LEWIS	62
3.3 STUDIO B.G.SENGERS	64
3.4 STUDIO E.M. LOFTHOUSE, STUDIO PERAZZOLO S.	72
4. MODELLIZZAZIONE MATEMATICA DEL TRASPORTO PLACENTARE DI AMINOACIDI IN GRAVIDANZE SANE O COMPLICATE DA PATOLOGIE	76
4.1 METODI	76
4.1.1 MODELLO DI PARTENZA	76
4.2 DEFINIZIONE DEI PARAMETRI PER GESTAZIONI SANE	87
4.3 DEFINIZIONE DEI PARAMETRI PER GESTAZIONI PATOLOGICHE	91
4.4 IMPLEMENTAZIONE DEL MODELLO E RELATIVI CASI DI STUDIO	92
4.4.1 IMPLEMENTAZIONE DEL MODELLO	92
4.4.2 CASO DELLA GESTAZIONE SANA	92
4.4.3 CASO DELLA GESTAZIONE COMPLICATA DA RESTRIZIONE DI CRESCITA INTRAUTERINA	93
4.4.4 CASO DELLA GESTAZIONE DA MADRE CON DIABETE GESTAZIONALE	96
4.5 RISULTATI	97
DISCUSSIONE E CONCLUSIONE	III
BIBLIOGRAFIA	VI
SITOGRAFIA	XII

INTRODUZIONE

La placenta è un organo temporaneo che si forma nelle primissime fasi della gravidanza e rappresenta l'interfaccia materno-fetale che permette gli scambi metabolici e il trasferimento di nutrienti. Le funzioni peculiari riguardano aspetti respiratori, nutrizionali ed immunitari. In particolare, il trasferimento di sostanze, attraverso la membrana placentare, risulta essere possibile grazie alla cooperazione di una serie di meccanismi di trasporto che permettono il rilascio di sostanze nutritive essenziali per il fabbisogno fetale e l'espulsione dei prodotti di scarto. Si mostra, pertanto, come l'organo che meglio di tutti permette l'esistenza e il mantenimento del complesso madre-feto mediante un'azione sinergica che coinvolge numerosi aspetti. È infatti particolarmente interessante evidenziare come la madre riesca a convivere e a nutrire un organismo del tutto estraneo e soprattutto semiallogenico. Numerosi studi, infatti, in passato, hanno cercato di fornire una spiegazione a questo "paradosso della natura" e la risposta è esclusivamente deputata al funzionamento corretto placentare. In virtù di questo, così come grazie alla placenta il feto può soddisfare il suo fabbisogno energetico e funzionale, risulta di particolare interesse comprendere come alterazioni placentari possano compromettere la crescita del feto stesso.

L'intento è quello di indagare il funzionamento del trasporto degli aminoacidi a livello placentare; questi, per giungere correttamente al feto, devono attraversare due membrane quali la membrana microvillosa placentare (MVM) e la membrana basale (BM) che delimitano i tre compartimenti primari: materno, sinciziotrofoblasto e fetale. Per studiare il corretto trasporto, si sono messi a punto, nel corso degli anni, diversi modelli computazionali e matematici che mirano a fornire uno strumento di supporto al fine di poter individuare e validare quelli che possono essere nuovi marcatori metabolici utili per diagnosticare e predire eventuali patologie. Tra queste, si annoverano il ritardo di crescita intrauterino (IUGR) e il diabete mellito gestazionale (GDM). La prima è una patologia, diagnosticata durante la gravidanza ed indicante un ritardo di crescita del feto o una crescita minima dello stesso. Si manifesta a seguito di una commistione di disturbi materni, fetali e placentari; una delle cause placentari risulta essere proprio l'insufficienza placentare che determina una alterazione nella circolazione e nel trasporto di nutrienti. La seconda, è una patologia che colpisce le donne in gravidanza ed è associata ad una crescita eccessiva del feto; è caratterizzata da una diminuzione della sensibilità materna all'insulina e, di conseguenza, un maggior apporto di glucosio al feto ne determina un aumento in termini di massa. In entrambi i casi, è possibile riscontrare un'alterata attività dei sistemi di trasporto placentare relativi agli aminoacidi.

Lo scopo di questo studio è stato quello, partendo da un modello implementato nel 2016 ma che si è limitato ad indagare gruppi di aminoacidi, di simulare la variazione di concentrazione dei singoli

aminoacidi in condizioni di gestazione sana e in condizioni patologiche, soffermandosi sulle due patologie precedentemente analizzate. Il modello di partenza, in particolare, considera la placenta strutturata in tre diversi compartimenti che simboleggiano le zone che vengono attraversate dagli aminoacidi per giungere al feto: materno, sinciziotrofoblasto e fetale. A differenza di modelli passati, questo pone le fondamenta su una interdipendenza tra l'attività dei diversi sistemi di trasporto, andando, in più, a considerare il flusso sanguigno nel compartimento materno e fetale. Nel caso dello studio, pertanto, si è simulata la variazione di concentrazione degli aminoacidi, andando a modellare le diverse equazioni differenziali, sviluppate dal modello di partenza, sull'ambiente di lavoro Simulink e, successivamente, andando, per la prima volta, ad utilizzare il modello, variandone alcuni parametri, in caso di gestazioni patologiche.

1. GLI AMINOACIDI

Con il termine aminoacidi si indicano le unità che vanno a formare una proteina, definita come biopolimero di aminoacidi. Il termine proteina venne coniato nel 1800 da Johannes Muller, il quale riconobbe nelle sostanze albuminose una matrice comune a cui scelse di dare un nome derivante dalla lingua greca, “di primaria importanza”. [1]

Le proteine sono una classe di molecole di vitale importanza per l'uomo in quanto rappresentano non solo la principale fonte nutritiva, fornendo carbonio, idrogeno, azoto e zolfo ma, allo stesso tempo, sono uno dei costituenti più presenti all'interno delle cellule viventi a livello delle quali fungono da enzimi, quali catalizzatori delle reazioni chimiche, da proteine regolatrici che esplicano la loro funzione a livello del metabolismo e da proteine strutturali. La loro immensa variabilità in termini di proprietà è legata alla mutabilità dei singoli aminoacidi che possono comporre.

Chimicamente parlando, come mostrato in Fig.1, le proteine sono dei polimeri di venti α -aminoacidi, definiti proteogenici che si legano tra di loro tramite un legame peptidico (una tipologia di legame amminico); gli aminoacidi sono chiamati in questo modo per via del gruppo amminico legato all'atomo di carbonio α . La struttura tipica di 19 aminoacidi presenta un gruppo amminico primario, un gruppo carbossilico, un atomo di idrogeno e un gruppo laterale R; questi ultimi permettono alle singole unità di interagire tra di loro all'interno di una proteina. Il ventesimo aminoacido, definito prolina, è caratterizzato da un gruppo amminico secondario. Centralmente è presente un atomo di carbonio, definito chirale, legato a quattro diversi gruppi funzionali. La glicina rappresenta un'eccezione essendo l'unico aminoacido a non presentare un chirale per via della presenza di soli due atomi di idrogeno legati al carbonio naturale, Fig.2.

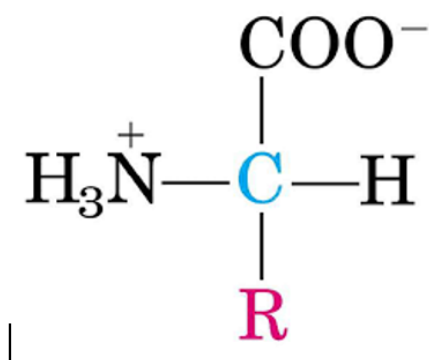


Figura 1: Struttura tipica aminoacido

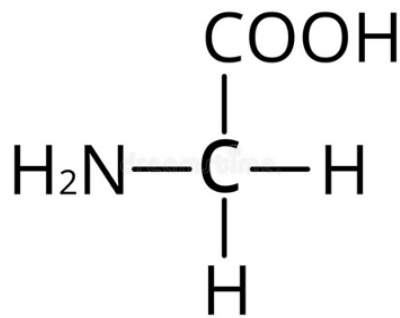


Figura 2: Glicina

1.1 CLASSIFICAZIONE

La presenza del gruppo R a livello di ogni singolo aminoacido permette la classificazione in aminoacidi idrofobi e idrofili che quindi si differenziano in virtù del loro rapporto con l'acqua, Fig.3. I primi presentano dei gruppi R non polari (alifatici o aromatici) e per tale motivo si posizionano centralmente all'interno di una proteina. Tra questi si citano: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina (questa in realtà è definita imino-acido per via della presenza di un gruppo iminico al posto di quello aminico), glicina, metionina, fenilalanina e triptofano.

I restanti presentano, invece, gruppi R polari e quindi si posizionano sulla superficie delle proteine. Questi si classificano in: aminoacidi polari neutri, aminoacidi carichi negativamente e aminoacidi carichi positivamente. I primi, pur essendo idrofili, a pH 7 non sono ionizzabili (sono infatti definiti privi di carica elettrica); tra questi rientrano: serina, treonina, cisteina, asparagina e glutammina. I secondi, presentano nella catena laterale dei gruppi carbossilici ionizzati e tra essi rientrano l'aspartato e il glutammato; sono detti acidi perché rilasciano un protone a seguito di ionizzazione. Gli ultimi, invece, definiti con carica positiva, presentano dei gruppi capaci di reagire con l'acqua e liberare un anione idrossido; rientrano la lisina, l'arginina e l'istidina.

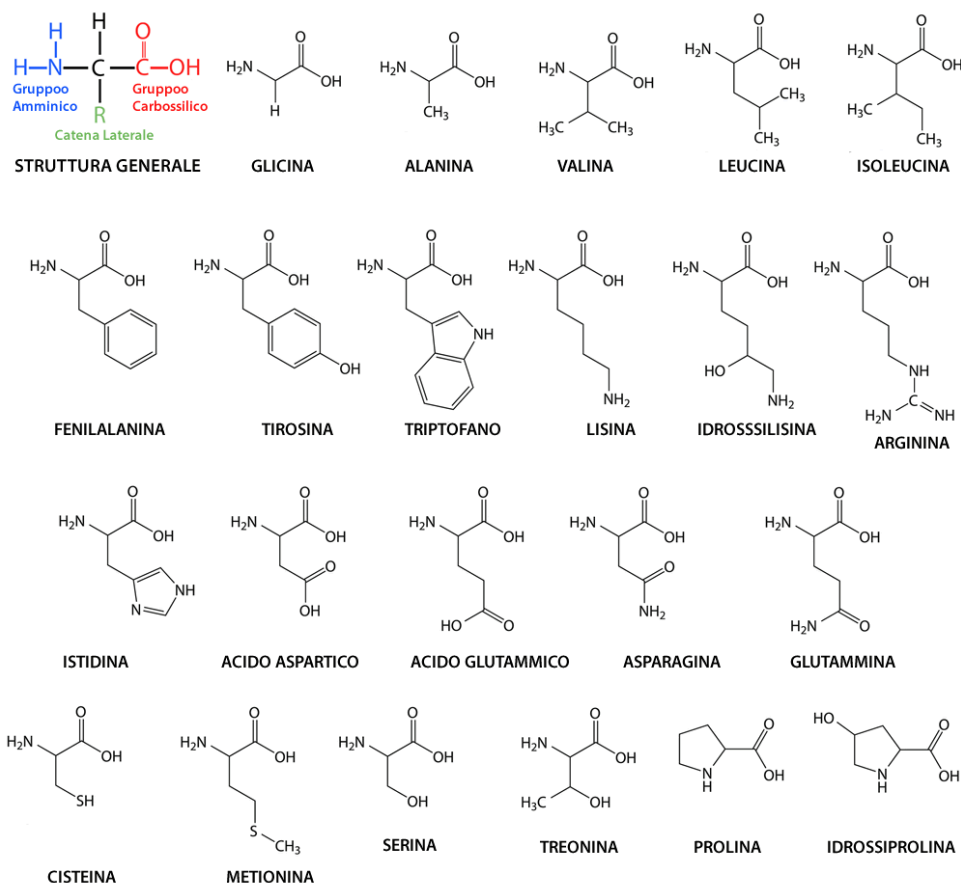


Figura 3: Rappresentazione dei vari aminoacidi

1.2 STRUTTURA

La struttura tridimensionale delle proteine si distribuisce su quattro diversi stadi: struttura primaria, struttura secondaria, struttura terziaria e struttura quaternaria.

Nel caso della struttura primaria, essa è data dalla sequenza degli aminoacidi seguendo quella genetica utilizzata per codificare la proteina; è caratterizzata dalla presenza di legami covalenti, detti legami peptidici, che si instaurano tra i singoli aminoacidi e conferiscono stabilità. In particolare, questo tipo di livello è il responsabile del ripiegamento della catena polimerica e, di conseguenza, della struttura tridimensionale della proteina e delle sue proprietà. [2]

Di seguito, le catene che formano la struttura primaria, tendono ad interagire con gli altri componenti dello scheletro polipeptidico attraverso la formazione di legami a idrogeno tra gli atomi che precedentemente avevano creato un legame peptidico. Nonostante la debolezza del legame a idrogeno, la sua presenza in forma massiccia conferisce stabilità alla struttura. Queste interazioni divengono responsabili della costituzione della struttura secondaria e possono presentarsi sotto forma di due diversi tipi di configurazioni: α -elica e foglietto β ripiegato. A livello di uno scheletro

polipeptidico è possibile individuarle entrambe o anche, nel caso di regioni definite random coil, non trovare nessuna delle due. La prima configurazione, Fig.4, assume la forma di spirale elicoidale e si distingue dall'altra per via del legame a idrogeno che si instaura tra l'idrogeno amidico e l'ossigeno carbonilico conferendone la forma specifica; questi legami a idrogeno sono, inoltre, paralleli all'asse lungo il quale si sviluppa l'elica. La catena è destrorsa e le catene laterali sono disposte verso l'esterno dell'elica; ciascun giro dell'elica è costituito da 3.6 aminoacidi. [3] Ci sono amminoacidi che per via della loro eccessiva rigidità (prolina) o flessibilità (glicina), non possono presentare la configurazione ad elica.

La seconda configurazione, Fig.5, detta "a foglietto ripiegato", è molto più estesa e i legami a idrogeno si vanno ad instaurare tra unità (gruppo carbonilico e idrogeno) di catene diverse adiacenti disponendosi l'uno di fianco all'altro. Questa configurazione è più frequente negli aminoacidi i cui gruppi R sono piccoli, ad esempio alanina e glicina in quanto, per gruppi più ingombranti, le catene non riescono ad avvicinarsi.

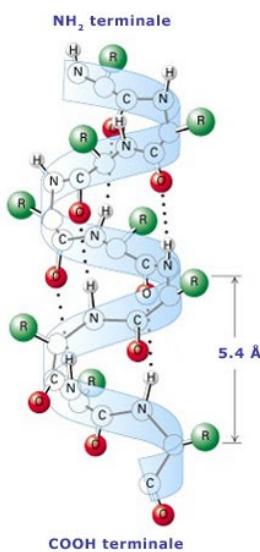


Figura 4: Configurazione α-elica

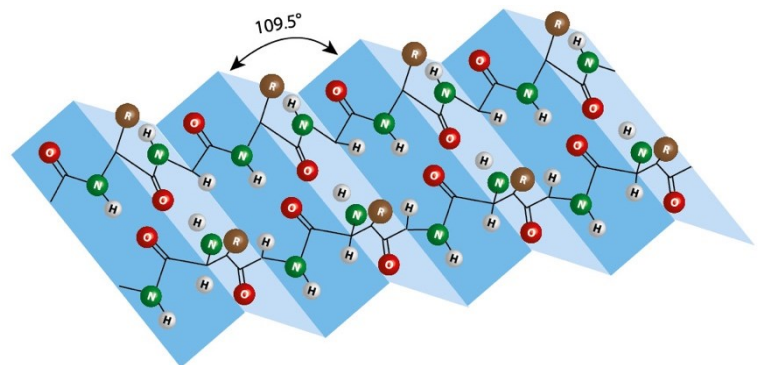


Figura 5: Configurazione foglietto β-ripiegato

La struttura terziaria, Fig.6(C), è quella che caratterizza le principali proteine globulari presenti all'interno della cellula e solubili nel citoplasma; rappresenta, infatti, la conformazione tridimensionale completa. Si parla di un ulteriore ripiegamento della struttura secondaria per generare la forma. Questo livello strutturale si occupa di delineare il tipo di configurazione assunto a livello della struttura secondaria e, di conseguenza, della forma della proteina stessa. I legami deboli (forze di Van der Waals, legami H, legami ionici o covalenti), che permettono l'instaurarsi della struttura terziaria, hanno come protagonisti le catene laterali di vari aminoacidi, in particolare gruppi funzionali polari; questi possono creare tra di loro anche legami a idrogeno mentre aminoacidi appartenenti a catene laterali cariche conferiscono solidità tramite interazioni elettrostatiche. I legami disolfuro, però, sono gli unici legami covalenti che stabilizzano la struttura. Tra le catene, si distinguono quelle idrofile orientate verso l'esterno del globulo e quelle idrofobe verso l'interno. La struttura terziaria gode di un importante ruolo in quanto, in virtù dei legami che la compongono, permette di definire quella che è la funzione biologica della proteina. Grazie ad un corretto ripiegamento è infatti possibile dar vita al sito attivo, regione che lega il substrato e permette poi l'esecuzione di una reazione.

La struttura quaternaria, di contro, Fig.6(D), non presente in tutte le proteine, interessa quegli elementi formati da più gruppi polipeptici globulari che formano la proteina completa. Descrive, infatti, la posizione spaziale di più catene polipeptidiche. La fermezza della struttura quaternaria è dovuta all'effetto idrofobico che si instaura nel momento in cui le catene polipeptidiche si avvolgono in strutture tridimensionali compatte al fine di esporre i gruppi polari verso l'ambiente acquoso e per proteggere quelli non polari dall'acqua; si vanno, quindi, a creare delle zone idrofobiche a contatto con l'acqua che rappresentano una sorta di barriera per la struttura dall'ambiente acquoso circostante. [4] Il caso per eccellenza è rappresentato dall'emoglobina la quale conta quattro catene polipeptidiche globulari uguali a due a due (due ad elica e due a foglietto ripiegato) chiamate subunità. I legami che interessano questa struttura sono gli stessi che si ritrovano a livello della struttura precedente.

Tramite l'analisi della struttura terziaria e quaternaria, è possibile ottenere una panoramica generale circa le funzioni svolte dalla specifica proteina tenendo a mente che questi stadi, a loro volta, dipendono ab ovo dalla struttura primaria (un'alterazione nella sequenza può comportare malformazioni o patologie). In particolare, ci sono proteine fibrose con elevata resistenza meccanica e per questo trovano campo di lavoro a livello delle cellule e dell'organismo; di contro, ci sono proteine globulari come quelle di trasporto, regolatrici e gli stessi enzimi che sfruttano la loro particolare forma per potersi legare ai recettori o per riconoscere una particolare molecola e permetterle l'ingresso nell'ambiente cellulare.

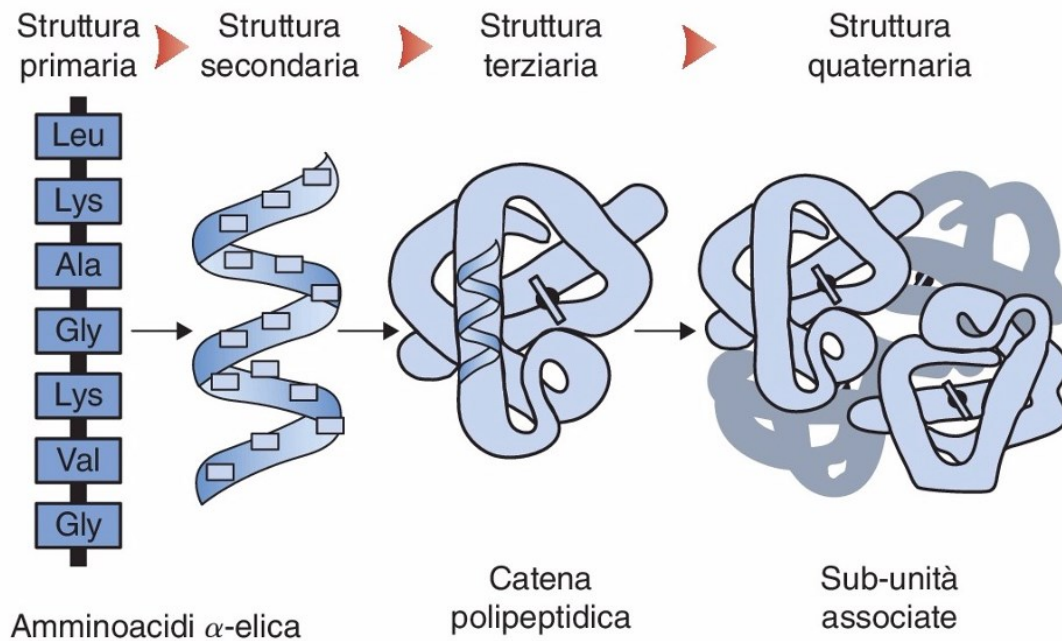


Figura 6: Panoramica strutture proteine

1.3 METABOLISMO DEGLI AMINOACIDI

Le proteine sono di vitale importanza per l'uomo ma, per poter esplicitare la loro funzione, è necessario che vengano digerite nel canale digerente, cioè idrolizzate nei loro aminoacidi costituenti grazie all'azione di enzimi: proteasi e peptidasi digestive. Queste ultime, si distinguono in endopeptidasi (pepsina, tripsina, chimotripsina) ed esopeptidasi, in base a dove svolgono la loro funzione di digestione. [5]

In base al loro campo di azione, le proteasi vengono catalogate in: gastriche, pancreatiche ed intestinali. Tra le proteasi gastriche rientra la pepsina, enzima che inizia a svolgere il suo compito a livello dello stomaco; secreta in forma di pepsinogeno dalle cellule della mucosa gastrica a seguito dell'aumento di concentrazione di gastrina, ormone secreto sempre a livello dello stomaco. La conversione del pepsinogeno in pepsina avviene spontaneamente nel momento in cui viene raggiunto il pH tipico dello stomaco conferito dall'HCl. La pepsina agisce sui legami carboamidici degli aminoacidi aromatici (fenilalanina, tirosina, triptofano) e viene annoverata come endopeptidasi in quanto agisce sui legami interni dello scheletro proteico.

Tra le proteasi pancreatiche, invece, rientrano: la tripsina, quale endopeptidasi con precursore il tripsinogeno, attivato dall'enteropeptidasi. La precoce azione del precursore può comportare l'autodigestione dell'organo e, pertanto, viene contemporaneamente elaborato un inibitore della tripsina. Quest'ultima agisce, in catena con la pepsina, sui legami carboamidici formati con arginina e lisina tramite il gruppo carbossilico. La chimotripsina, endopeptidasi derivante dal

chimotripsinogeno, agisce sui legami carboamidici ai quali partecipano gli aminoacidi aromatici. L'elastasi è invece un'endopeptidasi che agisce sui legami carboamidici degli aminoacidi neutri non aromatici. Queste ultime tre vengono annoverate tra gli enzimi serinici in quanto presentano un residuo di serina essenziale per i loro compiti. Rientrano tra le proteasi pancreatiche anche le carbossipeptidasi A e B.

Infine, le peptidasi intestinali sono endocellulari e tra di esse vengono comprese le aminopeptidasi e le dipeptidasi; le prime agiscono sui legami carboamidici dell'aminoacido N-terminale mentre le seconde agiscono sui dipeptidi derivanti dalle precedenti azioni di digestione.

Tutti gli aminoacidi naturali, al termine del processo di digestione operato dagli enzimi, vengono assorbiti dall'intestino tramite un particolare tipo di trasporto attivo definito simporto. In base alla tipologia di aminoacidi si differenziano 4 particolari tipi di sistemi presenti a livello dei tubuli renali. Successivamente, gli aminoacidi vengono convogliati nel fegato.

Nel neonato l'assorbimento delle proteine segue un processo definito pinocitosi non selettiva.

1.4 AMINOACIDI ESSENZIALI, SEMI-ESSENZIALI E NON ESSENZIALI

Data la vitale importanza degli aminoacidi nella vita dell'organismo, è opportuno classificare gli aminoacidi in essenziali e non essenziali in virtù del fabbisogno dell'uomo, della sua richiesta e della sua capacità di sintetizzare gli stessi. In particolare, ogni cellula diviene sede di sintesi proteiche con il fine di costruirne delle nuove, di accrescere il tessuto o sostituire quelle demolite. [5] Si definiscono, dunque, aminoacidi essenziali quegli aminoacidi che l'organismo non è in grado di sintetizzare e che deve, conseguentemente, integrare con la dieta. In caso di carenza, l'organismo è costretto a degradare altre proteine entrando in fase di bilancio di azoto negativo, rilevabile da una maggior eliminazione urinaria di composti azotati. Di contro, gli aminoacidi non essenziali, possono essere sintetizzati dall'organismo in base alla richiesta metabolica. Le proteine in grado di fornire tutti gli aminoacidi essenziali nelle giuste proporzioni per la natura umana sono dette complete (carne, pesce, latte, uova) mentre, quelle incomplete, sono quelle che presentano un deficit di uno o più aminoacidi essenziali. [6] Dalla Tab.1 si evidenzia la classificazione degli aminoacidi in tre categorie: essenziali, semi-essenziali e non essenziali. Con il termine semi-essenziali, si ricorre a quegli aminoacidi essenziali solo in fase di accrescimento e che quindi divengono non essenziali in fase adulta.

Tabella 1: Classificazione aminoacidi

AMINOACIDI ESSENZIALI	AMINOACIDI SEMI-ESSENZIALI	AMINOACIDI NON ESSENZIALI
<i>Isoleucina</i> <i>Leucina</i> <i>Metionina</i> <i>Lisina</i> <i>Fenilalanina (tirosina inclusa)</i> <i>Treonina</i> <i>Triptofano</i> <i>Valina</i>	<i>Istidina</i> <i>Arginina</i>	<i>Glicina</i> <i>Alanina</i> <i>Serina</i> <i>Acido aspartico</i> <i>Acido glutammico</i> <i>Prolina</i> <i>Idrossiprolina</i> <i>Cisteina</i>

1.5 AMINOACIDI BASICI, NEUTRI, ACIDI

I gruppi funzionali R, responsabili della varietà degli aminoacidi presenti in natura, conferiscono a questi anche il carattere anfotero, sono cioè sia acidi che basici. Si definisce zwitterione, la forma di ione dipolare con cui si presentano gli aminoacidi in soluzione acquosa (pH pari a 7.3); in particolare il gruppo carbossilico -COOH protona alla funzione amminica in modo da ottenere l'amminogruppo protonato (si presenta come catione ammonio) e il carbossile deprotonato (si presenta come anione carbossilato). [7] Sono pertanto dei particolari sali interni, solubili in acqua e insolubili in solventi organici; in fase di riscaldamento, andranno incontro a decomposizione (presentano punti di fusione elevati). Lo zwitterone è dunque polare e permette agli aminoacidi di creare reticoli cristallini forti.

In soluzione acquosa acida, lo zwitterione si comporta da base accettando un protone (si dice che è protonato) e divenendo catione; in soluzione basica, di contro, si comporta da acido perdendo un protone (deprotonato) e divenendo anione. L'acidità o la basicità della soluzione dipende dal pH. [8] Il carattere neutro, acido o basico di un aminoacido viene definito in base al comportamento dello stesso in soluzione acquosa e dalla sua dipendenza dal pH. Si ha infatti che, a $\text{pH} > 13$ predomina lo ione carbossilato; a pH pari a 6 predomina la forma neutra zwitterionica mentre, a $\text{pH} < 1$, predomina lo ione ammonio. L'interconversione di queste forme segue le regole proprie degli equilibri acido-base. [9]

Un punto di unione tra i due estremi è rappresentato dal punto isolettrico, pI: punto a livello del quale è possibile evidenziare un bilanciamento tra la forma anionica e cationica, e la concentrazione della

forma zwitterionica, a neutralizzazione di carica, è massima. Il valore del pI dipende dalla struttura dell'aminoacido: gli aminoacidi neutri (alanina, asparagina, cisteina, glutammina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina) hanno pI prossimi alla neutralità e quindi con un pH oscillante tra 5.0 e 6.5; quelli acidi (acido aspartico e acido glutammico) hanno pI prossimi a pH bassi in modo che, in questo punto, non avvenga la deprotonazione; i basici, infine, (arginina, istidina, lisina) hanno pI prossimi a pH alti in modo che, in questo punto, non avvenga la protonazione della catena laterale del gruppo amminico. Il pI di un aminoacido è rappresentato matematicamente dalla media delle due costanti di dissociazione acida in cui è coinvolto lo zwitterione neutro; il pI globale della singola proteina dipende dal tipo di aminoacidi che la compongono.

1.6 MECCANISMI DI TRASPORTO

L'esterno e l'interno della cellula comunicano tra di loro attraverso i trasporti che avvengono a livello della membrana plasmatica distinti in: trasporti in forma libera e trasporti in forma mediata. I primi, sono rappresentati da un semplice passaggio della particella, attraverso la membrana, senza la necessità di unirsi ai suoi costituenti. Questi comprendono: la diffusione, l'osmosi, il flusso massivo, la filtrazione e la permeazione delle membrane. La diffusione, Fig.7, consiste nel passaggio di particelle contro gradiente di concentrazione (dalla zona a maggior concentrazione verso la zona a minore concentrazione); questo meccanismo di trasporto, in particolare, è dovuto al mescolamento casuale delle molecole che tendono a ridistribuirsi uniformemente dopo essersi urtate le une con le altre. Questi urti, infatti, sono più frequenti nella zona in cui vi è una maggior concentrazione e ciò spiega il motivo del movimento, seppur casuale, delle molecole ma contro gradiente. [10] L'osmosi, Fig.8, è il meccanismo che si verifica quando, collegando attraverso una membrana semipermeabile due recipienti contenenti uno solo acqua e l'altro anche delle particelle di soluto, l'acqua tenderà a passare dalla zona in cui è più concentrata verso la zona in cui è meno concentrata; cosa che non accade per le particelle di soluto. Il tipo di membrana semipermeabile serve per far riferimento alla membrana plasmatica dotata di alcune proteine, acquaporine, che fungono da canali per il passaggio di acqua. Il flusso massivo, che si verifica prettamente a livello degli endoteli vasali, consiste nel passaggio delle molecole in virtù della differenza di pressione idraulica a livello della membrana. La filtrazione è un caso particolare di flusso massivo che si verifica nel momento in cui un liquido deve attraversare una membrana porosa, detta filtrante, in quanto non permette il passaggio di molecole di grandi dimensioni, per effetto di una pressione idraulica. In ultimo, la permeabilità è quella, si potrebbe dire, condizione intrinseca di una membrana data dalla presenza di giunzioni intercellulari

che permettono il passaggio delle sostanze per via transcellulare, attraverso il corpo delle cellule, o per via paracellulare ovvero tramite gli intersitizi lasciati dalle giunzioni.

I secondi, invece, sono dati dal legame della particella che deve spostarsi, con i costituenti della membrana. Questo meccanismo di trasporto è proprio di quelle sostanze che, per via delle loro dimensioni e della loro idrosolubilità, non possono godere dei trasporti in forma libera; queste molecole, come gli aminoacidi o il glucosio, d'altronde, sono fondamentali per la vita di un organismo. Per poter essere trasportate devono quindi trovare un escamotage: si avvalgono di particolari costituenti della membrana definiti carrier o trasportatori che fungono da vere e proprie navette. Ciò non vuol dire che basti legarsi ad uno di questi per attraversare la membrana; è infatti indispensabile che le navette contengano il sito di legame al quale, la molecola che deve oltrepassare la membrana, possa unirsi. I trasportatori, per poter permettere questo legame, infatti, riescono a indurre una modica della loro conformazione in modo che i siti di legame possono essere esposti all'unione. Una volta unite, la navetta assieme alla molecola si muoverà per diffusione e, dopo aver superato la barriera, il carrier farà il percorso contrario per essere nuovamente disponibile. Questo tipo di meccanismo è definito uniporto in quanto il carrier trasporta un unico tipo di particella; contrariamente al cotrasporto (o simporto) dove trasporta due particelle nella stessa direzione e al controtrasporto (o antiporto) in cui le due particelle devono arrivare in zone opposte, Fig.9.

I trasporti mediati possono distinguersi in passivi e attivi. I primi possono avvenire solo in direzione del gradiente e soprattutto senza dispendio di energia; gli altri possono avvenire anche contro-gradiente, richiedono energia e possono subire modifiche in virtù di alterazioni metaboliche. I trasporti passivi, il cui esempio per eccellenza è la diffusione facilitata, Fig.10, sono caratteristici degli aminoacidi. I trasporti attivi, invece, comprendono quelli primari e secondari. I primari sono chiamati così in quanto, l'energia necessaria per l'esecuzione, viene direttamente ricavata dal metabolismo cellulare (scissione di ATP in ADP); operano solo ioni inorganici, definiti pompe ioniche, le cui molecole trasportatrici tipiche godono di un carattere di ATPasi (si comportano da enzima e da carrier). Esempi lampanti di pompe ioniche sono la pompa ionica di scambio Na^+/K^+ , Fig.11, che opera a livello di tutte le membrane plasmatiche, e la pompa del Ca^{2+} , anch'essa operante a livello delle membrane plasmatiche. La prima, ha il compito di mantenere elevata la concentrazione degli ioni sodio nella zona extracellulare e di quelli potassio in quella intracellulare; la seconda, invece, di minimizzare la concentrazione dello ione a livello citoplasmatico e mantenerla elevata a livello extracellulare. I secondari, di contro, traggono l'energia dal metabolismo intercellulare indirettamente in quanto sfruttano il moto secondo gradiente di altre particelle, definite pertanto motrici del trasporto. Il carrier, in questo caso, funge da accoppiatore tra la motrice (ioni Na^+ , esempio tipico per il trasporto del glucosio dove il sodio funge da accoppiatore) e la particella che

deve esser mossa contro gradiente. Esempio tipico in cui invece avviene lo scambio ionico è il controtrasporto Na^+/K^+ .

Gli aminoacidi, possono dunque essere trasportati sia tramite trasporto attivo primario che secondario i cui unici limiti sono rappresentati dalla presenza di trasporto massimo e dalla possibile saturazione del trasportatore. Questi sono, infatti, legati alla non infinita disponibilità, a livello della membrana, di siti di legame e perciò si definisce quello che è il trasporto massimo come la massima quantità di sostanza che il trasportatore è in grado di portare con sé.

A queste due forme di trasporto, si aggiungono anche l'endocitosi (per l'ingresso) e l'esocitosi (per l'uscita); la prima vien detta fagocitosi quando la particella è solida o pinocitosi se liquida. [11]

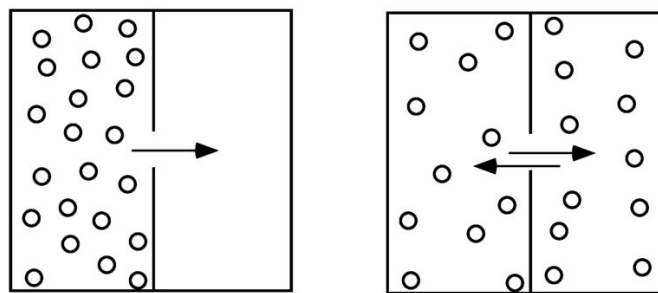


Figura 7: Diffusione

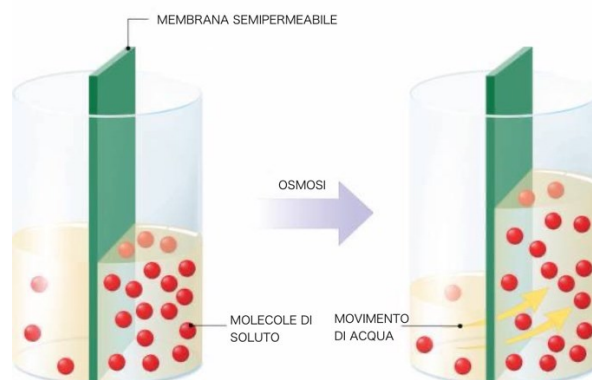


Figura 8: Osmosi

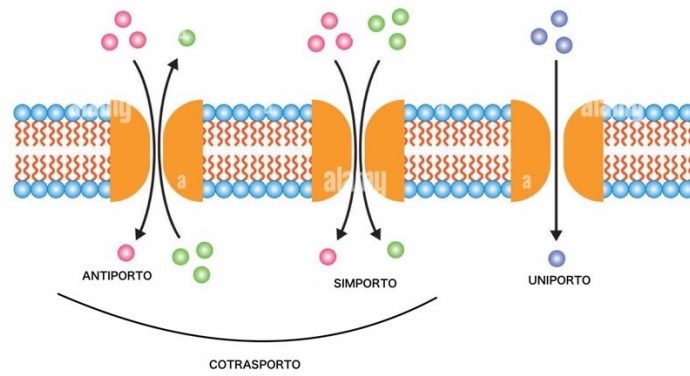


Figura 9: Cotrasporto e uniporto

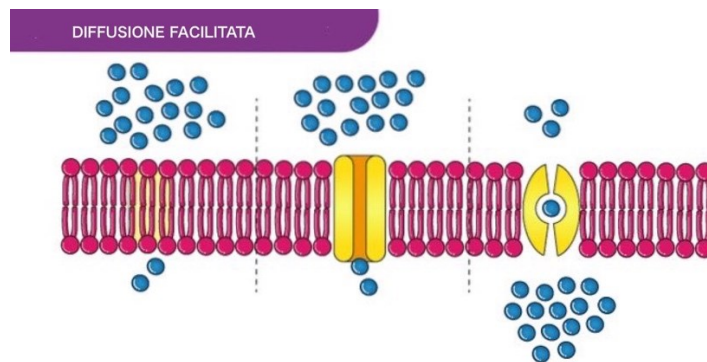


Figura 10: Diffusione facilitata

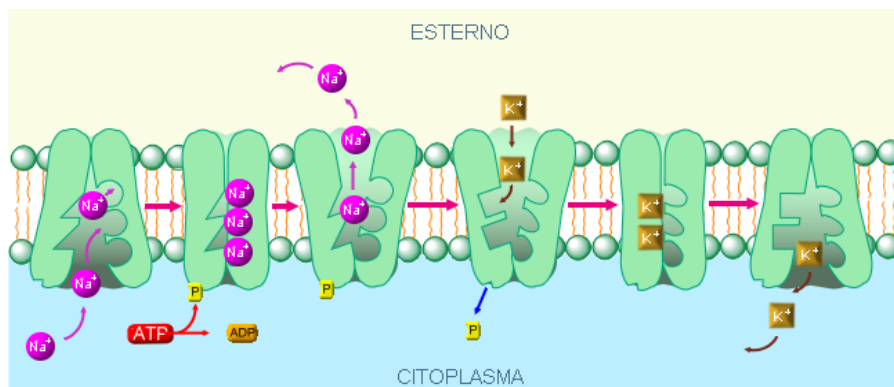


Figura 11: Pompa sodio/potassio

2. COMPLESSO MADRE-FETO: LO SCAMBIO DI AMINOACIDI

2.1 LA GRAVIDANZA

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità e la European Society for Human Reproduction and Embryology, si definisce gravidanza, Fig.12, la situazione in cui un esame ecografico riveli la presenza di una camera gestazionale in utero o in cui un esame del sangue rilevi una concentrazione ematica di bHCG (l'ormone della gravidanza) uguale o superiore a 1000 mUI/ml. [12]

La gravidanza si verifica nel momento in cui, gli spermatozoi (cellule sessuali maschili) si uniscono con le cellule sessuali femminili (cellule uovo) dando vita ad un'unica cellula, lo zigote, che trasporta i geni di entrambi i genitori e ha il potenziale di dare origine a un nuovo organismo. [13] Affinché questo processo si verifichi, è necessario che l'introduzione degli spermatozoi avvenga nel periodo che intercorre tra i cinque giorni precedenti l'ovulazione e il giorno seguente l'ovulazione in quanto, dopo essere stati eiaculati nella vagina, sono in grado di fecondare l'ovulo per un massimo di 4-6 giorni. Per ovulazione, s'intende il processo, durante il quale, la cellula uovo, a seguito della rottura del follicolo, viene espulsa dalla superficie dell'ovaio e, attraverso dei battiti ciliari, viene accolta nella tuba di Falloppio, all'interno della quale, è necessario che avvenga la fecondazione in quanto la sopravvivenza dell'uovo fecondato è breve. L'eiaculazione è, invece, il fenomeno che porta alla deposizione degli spermatozoi nella vagina durante un rapporto sessuale. Successivamente a quest'ultima fase, grazie alla spinta dovuta al rapporto stesso, gli spermatozoi riescono a penetrare nell'utero qualche minuto dopo l'eiaculazione, grazie all'azione di un moto propulsivo. Gli spermatozoi riescono a fecondare l'uovo solo dopo esser rimasti per qualche ora all'interno dell'ambiente riproduttivo femminile in modo da adattarsi ad esso, secondo un fenomeno chiamato "capacitazione", ultima tappa di maturazione degli stessi che provoca dei cambiamenti a livello di lipidi e proteine presenti sulla membrana dello spermatozoo. Questa termina nel momento in cui lo spermatozoo è esposto alle cellule Peg, cellule non ciliate dell'epitelio di rivestimento della tuba uterina. [14]

Bisogna tener conto anche dell'acidità dell'ambiente vaginale che comporta un elevato tasso di mortalità degli spermatozoi stessi lungo il tragitto verso l'utero. [15]

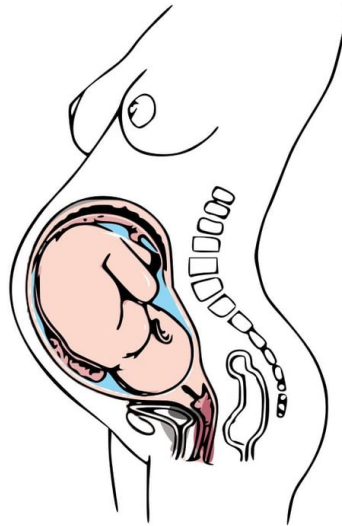


Figura 12: La gravidanza

La gravidanza risulta, pertanto, essere la situazione che segue il fenomeno della fecondazione ed è dunque la combinazione di due fenomeni diversi: la sessualità e la riproduzione.

Per valutare in termini di tempistica il periodo di gravidanza, si distinguono due metodologie: età naturale ed età mestruale. Con la prima, s'intende quel periodo che intercorre dall'ovulazione al parto prosano (38 settimane, 266 giorni); viceversa, con età mestruale, si racchiude il periodo che trascorre dall'ultima mestruazione alla data del parto (40settimane, 280 giorni). Quest' ultimo metodo è preferito in clinica data la difficoltà nello stabilire il momento esatto della fecondazione.

Inoltre, è possibile distinguere la gravidanza in tre periodi principali, Fig.13: periodo pre-embrionale o germinale, periodo embrionale e periodo fetale. Il primo, è rappresentato dalle prime due settimane di sviluppo, durante le quali, si verificano la segmentazione e l'impianto; vien data forma alle strutture extraembrionali che porteranno allo sviluppo dell'embrione. Successivamente, dalla terza settimana alla fine del secondo mese, allo stadio embrionale, si verificano la gastrulazione e l'organogenesi ossia i processi che danno inizio alla formazione dell'intero piano corporeo. In virtù di ciò, questa è la fase più pericolosa per lo sviluppo di eventuali malformazioni congenite. L'ultimo periodo, quello che porta alla nascita, rappresenta la fase di crescita e di differenziamento istologico durante la quale l'embrione, divenuto feto, inizia ad assumere le sembianze umane.

A livello clinico, si segue un'ulteriore differenziazione temporale in tre trimestri, Fig.14, che va poi a distinguere i periodi durante i quali vengono svolti determinati esami diagnostici: durante il primo, infatti, vengono svolti test di gravidanza e analisi di villi coriali (per verificare l'eventuale presenza di patologie ereditarie); durante il secondo, è possibile prelevare il liquido amniotico ed eseguire ecografia ed amniocentesi; infine, durante il terzo, si eseguono le analisi diagnostiche per seguire il decorso della crescita e dello sviluppo di apparati. Questa differenziazione segue, dunque, lo sviluppo

del feto all'interno delle cavità uterine. Durante la fine del primo trimestre, infatti, si iniziano a formare i rudimenti degli apparati e dei sistemi, piano fondamentale del corpo, fino ad arrivare, durante i tre mesi successivi, al raggiungimento di circa 0.64 Kg. Nel secondo trimestre, invece, l'accrescimento del feto supera di gran lunga quello della placenta, è un periodo di crescita rapido. Per ultimo, nel terzo trimestre, gli organi sono ormai pronti a svolgere le loro funzioni, il ritmo di crescita inizia pian piano a rallentare ma il peso, invece, continua ad incrementare fino a raggiungere, definitivamente, un valore di circa 3.2 Kg. [14]

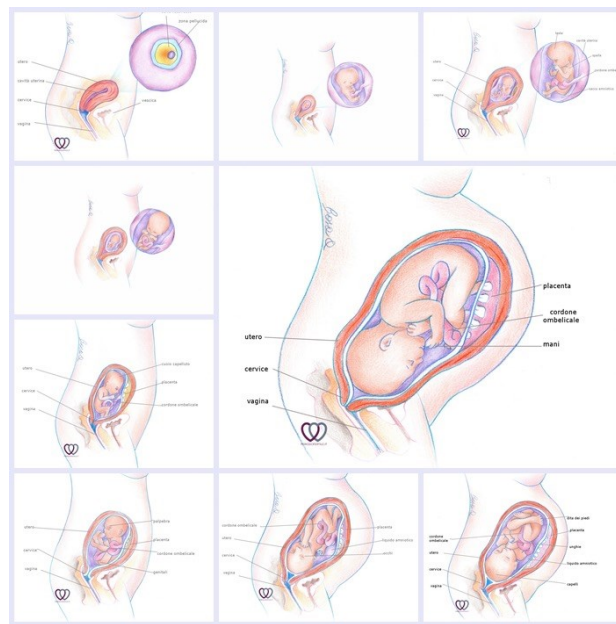


Figura 13: Fasi della gravidanza

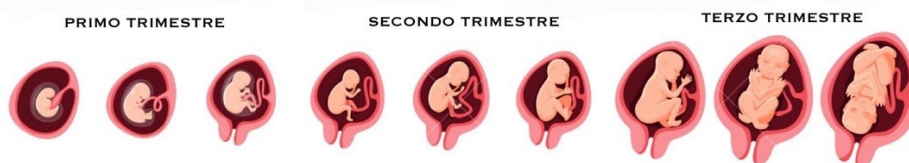


Figura 14: Suddivisione della gravidanza in trimestri e sviluppo del feto

2.1.1 LA FECONDAZIONE E LO SVILUPPO GERMINALE

Il concetto di vita, visto da una prospettiva biologica, viene suddiviso in due fasi, una detta prenatale ed una post-natale. La prima, a sua volta, si compone di tre periodi: germinale, embrionale e fetale. La prima fase inizia con la fecondazione e dura circa 2 settimane; la seconda include le settimane che vanno dalla terza all'ottava, durante le quali l'essere umano inizia ad essere chiamato embrione, mentre l'ultima fase è rappresentata dalle ultime 30 settimane durante le quali s'inizia a parlare di feto. [16] La fecondazione, processo che pone le origini della fase prenatale e, in particolare, di quella germinale, descrive l'unione tra le due cellule sessuali, due gameti aploidi, spermatozoo e ovocita secondario, all'interno dell'ampolla della tuba di Falloppio, nella parte distale, e si verifica qualche ora dopo l'ovulazione, Fig.15. Di tutti gli spermatozoi penetrati a seguito dell'eiaculazione, solo alcuni riescono ad arrivare in questa zona. Nonostante ciò, per poter fecondare, gli spermatozoi, attraverso i flagelli, devono attraversare una zona chiamata corona radiata, formata da una serie di cellule interconnesse tra loro che fungono da barriera e rallentano il loro movimento e una zona pellucida, rivestimento glicoproteico protettivo. [17] A livello di questa zona, infatti, è presente una particolare glicoproteina, ZP3, Fig.16, che funge da recettore per gli spermatozoi. Questi ultimi, dunque, legandosi a questa glicoproteina, innescano una reazione acrosomiale durante la quale vengono rilasciati enzimi, specialmente ialuronidasi, presenti sulla parte apicale della loro membrana, che hanno il compito di dissolvere le giunzioni cellulari e la zona pellucida, Fig.17.

Il primo spermatozoo che riesce ad oltrepassare la zona pellucida può raggiungere l'ovulo e legarsi ad esso grazie all'azione dei recettori, integrina $\alpha 6 \beta 1$. L'unione tra le membrane delle due cellule, che darà poi vita allo zigote, prende il nome di reazione corticale. Ne segue quello che è il blocco rapido della polispermia, reazione che determina un cambiamento del potenziale di membrana della cellula uovo e l'indurimento della zona pellucida in modo che nessun altro spermatozoo possa legarsi. Si verifica anche una liberazione intercellulare di ioni Ca^{2+} che porta ad una esocitosi di acqua e di granuli corticali in modo da determinare una denaturazione della zona pellucida e disattivare definitivamente la glicoproteina ZP3, non più disponibile per ulteriori legami. Questo processo è chiamato blocco lento della polispermia. Adesso lo spermatozoo può definitivamente rilasciare il nucleo nel citoplasma dell'ovulo permettendo a questo di completare la seconda divisione meiotica. Esso, infatti, in attesa dello stimolo dato dallo spermatozoo, era in uno stato letargico; se la fecondazione non si fosse verificata, l'ovocita sarebbe andato incontro a degenerazione. [14]

A seguito del completamento della divisione meiotica, il pronucleo femminile e quello maschile, entrambi aploidi e con un patrimonio cromosomico dimezzato, si uniscono (processo definito anfimissi) per dar vita ad un organismo diploide, lo zigote; fenomeno definito embriogenesi, Fig. 18.

A livello genetico, lo spermatozoo trasporta semplicemente i cromosomi paterni al sito di fecondazione; al contrario, l'ovocita secondario fornisce gli organuli cellulari, il nutrimento e il programma genetico necessario per lo sviluppo. [14]

Lo zigote è ora pronto per emigrare, attraverso la tuba di Falloppio, verso l'utero dove sosterà per tutto il periodo della gestazione.

Se la fecondazione non si fosse verificata, l'oocita sarebbe andato incontro a distruzione e sarebbe stato fagocitato dalle cellule che rivestono l'utero.

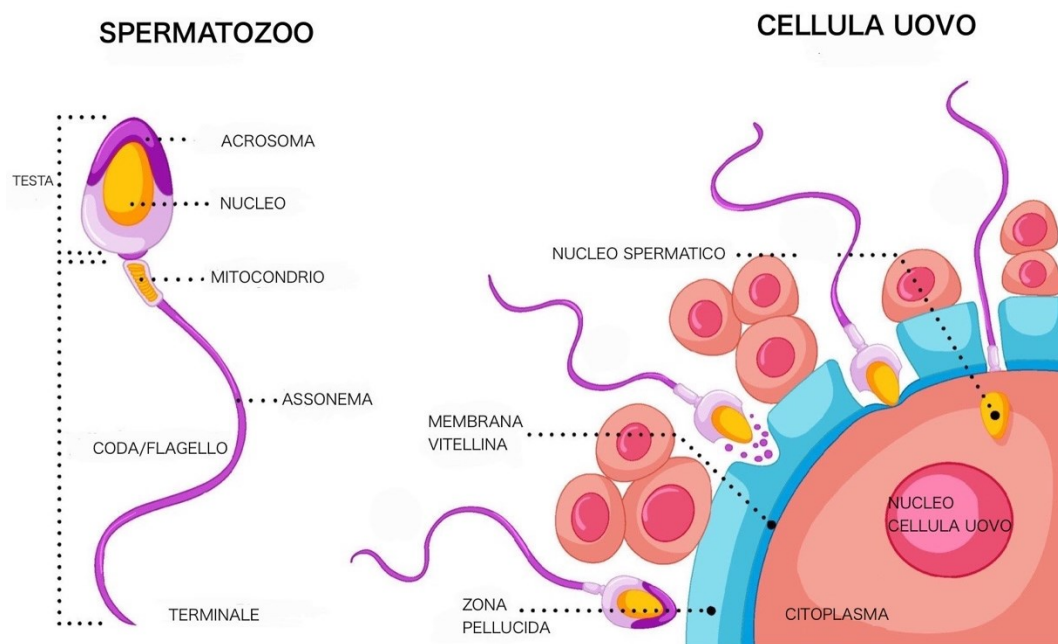


Figura 15: La fecondazione

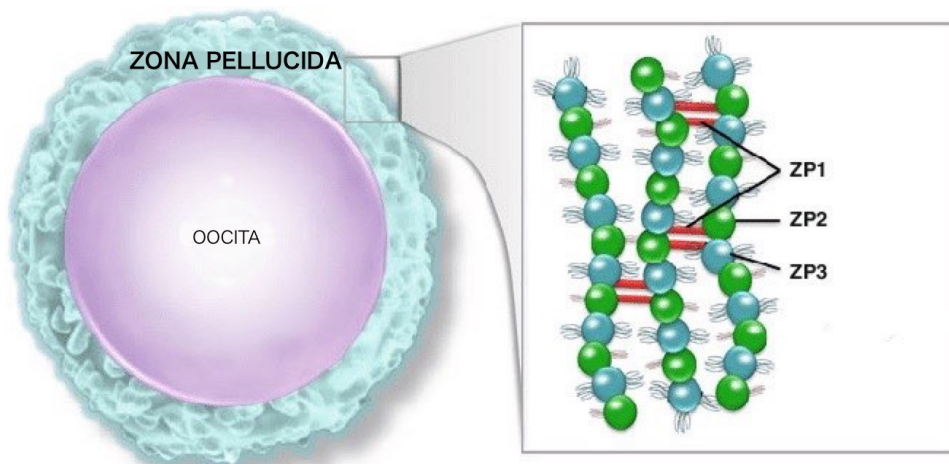


Figura 16: Zona pellucida nel topo

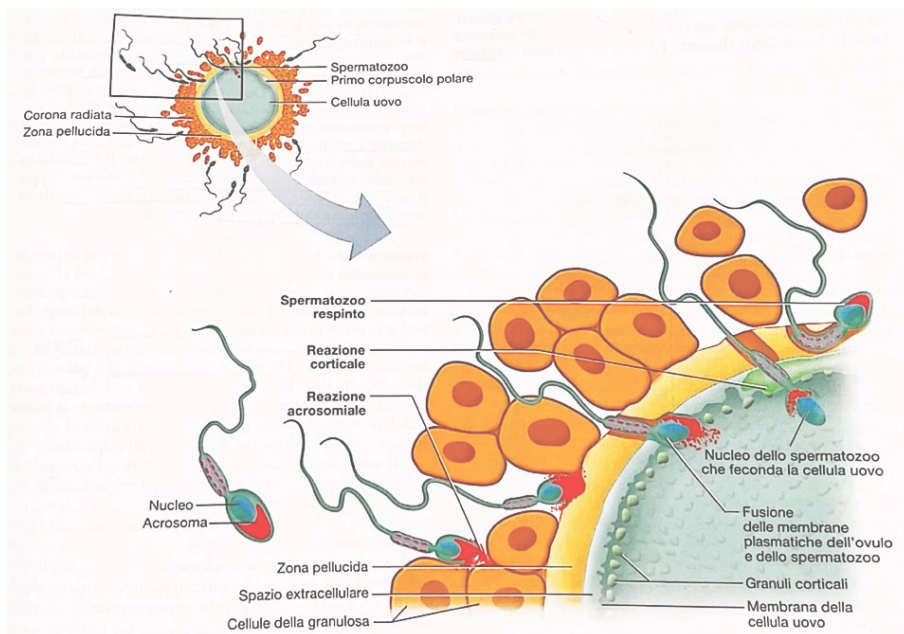


Figura 17: Reazione acrosomiale e corticale

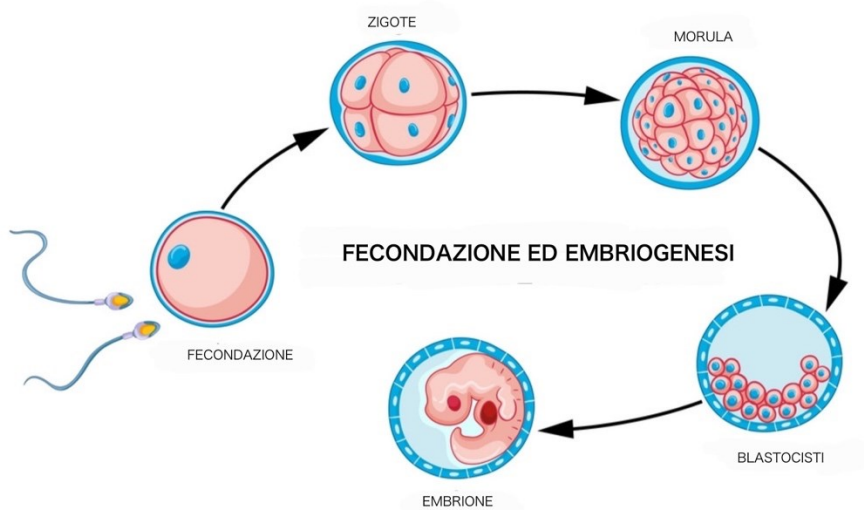


Figura 18: Fecondazione ed embriogenesi

2.1.2 LO SVILUPPO EMBRIONALE

L'ovocita fecondato assume, d'ora in poi, il nome di concepito e rimarrà nella tuba di Falloppio per circa 3-4 giorni, a seguito dei quali, la concentrazione di progesterone (ormone steroideo precursore degli ormoni della corteccia surrenale e degli ormoni androgeni; è prodotto dal corpo luteo, nell'ovaio e nella placenta e ha il compito di preparare l'apparato riproduttivo femminile alla gravidanza e mantiene l'utero in condizioni particolari necessarie per lo sviluppo dell'embrione [18]) aumenterà permettendo il passaggio lento verso l'utero a livello del quale si verificherà un processo noto come "segmentazione" secondo cui il concepito sarà protagonista di una serie di divisioni mitotiche durante le quali inizierà pian piano ad assumere una forma sferica, morula, Fig.19, formata da una serie di cellule identiche geneticamente, chiamate blastomeri. Successivamente, si presenterà all'utero allo stadio di 16-32 cellule totipotenti (cellule che possono differenziarsi in tutte le tipologie di tessuto). Queste cellule andranno presto incontro a differenziazione, a seguito della quale, diverranno cellule pluripotenti ossia cellule in grado di differenziarsi ma non in tutti i tipi di tessuto.

All'interno dell'utero, il concepito riceve nutrimento per circa 3 giorni in modo da completare le divisioni e raggiungere lo stadio di 100 cellule, noto come "blastocisti", Fig.20, che si insedierà, per il tramite di enzimi da essa secreti, fenomeno definito "impianto", a livello dell'endometrio il quale, a sua volta, tenderà a circondare la blastocisti. La fase di impianto può verificarsi solo nel momento in cui l'utero è pronto a ricevere ed accogliere il nuovo stadio; il periodo di massima ricettività uterina è definito "finestra di impianto" (tra il ventesimo e il ventiquattresimo giorno di un ciclo regolare di 28 giorni, circa 6-10 giorni dopo l'ovulazione). Durante questa fase, infatti, per via della produzione di estrogeni e progesterone da parte del corpo luteo, l'endometrio subisce delle modificazioni strutturali che lo rendono pronto per accogliere la blastocisti. Il primo punto di contatto a livello dell'epitelio è quello luminale la cui membrana plasmatica si trasforma da non adesiva ad adesiva e si sviluppano i pinopodi (estroflessioni che assorbono fluidi e macromolecole dalla cavità uterina; sono stati proposti come marcatori della ricettività uterina [19]). Successivamente, si va incontro ad un processo di decidualizzazione durante il quale le cellule endometriali iniziano a specializzarsi divenendo cellule deciduali; il processo è facilitato da cellule presenti nell'utero quali natural killer uterine, cellule T e cellule dendritiche. [20]

Lo stadio blastocisti è formato da uno strato esterno, trofoblasto (*trophos+blasto* =cibo, precursore), da uno interno, massa cellulare interna, e da una cavità centrale piena di liquido, blastocoele (dal greco *koiloma*, cavità). Il primo, dal quale emergeranno due popolazioni di cellule (citotrofoblasto e sinciziotrofoblasto), si occuperà di circondare l'embrione e di nutrirlo per le prime due settimane a seguito delle quali verrà sostituito dalla placenta, Fig.21. Dalla separazione tra massa cellulare interna e trofoblasto, si origina la cavità amniotica.

In particolare, le fonti nutritive come i contenuti della cavità uterina e il secreto delle ghiandole endometriali, ricche di glicogeno, raggiungono la blastocisti a seguito della secrezione di enzimi da parte del trofoblasto; questi, hanno il compito di creare un'apertura a livello della zona pellucida, processo definito hatching. Il secondo strato, detto anche trofoblasto sinciziale, darà invece origine all'embrione stesso e ad altre tre membrane extra-embryonali quali: amnios, che si occuperà della secrezione di liquido amniotico all'interno del quale crescerà il feto; allantoide che diventerà parte del cordone ombelicale e la sua base darà origine alla vescica e sacco vitellino, sede di formazione delle cellule di sangue. [17] In particolar modo, queste membrane derivano dai foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma) originati attraverso la gastrulazione.

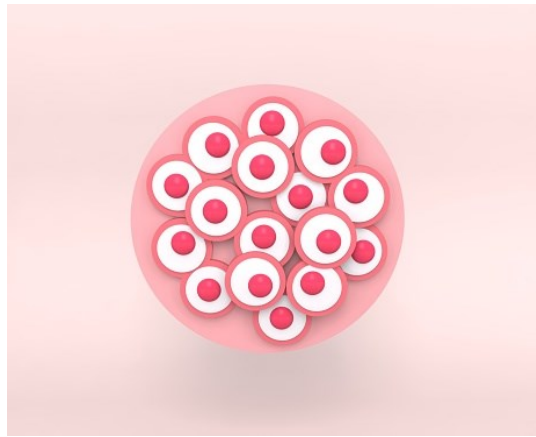


Figura 19: Morula

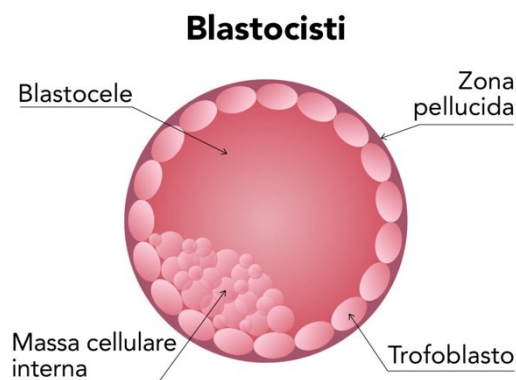


Figura 20: Blastocisti

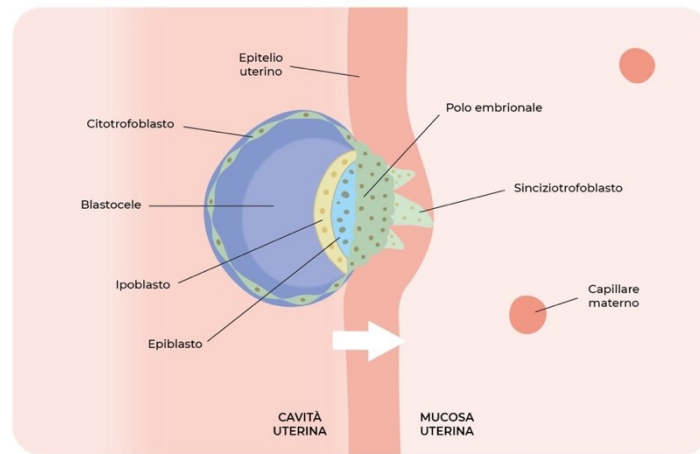


Figura 21: Citotrofoblasto e sinciziotrofoblasto

2.1.3 LO SVILUPPO FETALE

È opportuno iniziare a parlare di feto, Fig.22 e 23, invece che di embrione a seguito del decorso di 60 giorni durante i quali è possibile già individuare gli organi. Infatti, la differenza tra il periodo embrionale e fetale sta nel fatto che, nel primo, si assiste alla formazione dei vari apparati mentre, nel secondo, all'accrescimento degli stessi.

A seguito dei 60 giorni, si evidenzia una variazione delle dimensioni del feto, e di conseguenza dell'utero, passando da 3 cm a 50 cm e da 2.5 gr a 3330 gr al termine della gravidanza.

Il picco viene raggiunto nelle fasi finali; decorse le 38 settimane, il feto è pronto ad uscire anche in virtù del termine della crescita intrauterina intorno alla trentacinquesima settimana durante la quale si assiste all'interruzione dello sviluppo della placenta.

Il feto è ricoperto da uno strato di peli sottili chiamato lanugine e da uno strato di cellule epiteliali impermeabili, vernice caseosa, che lo protegge dal liquido amniotico considerato tossico.

Inoltre, si rileva un accumulo di tessuto adiposo sottocutaneo che funge da accumulo di sostanze nutritive e da isolamento termico.

In media, il peso del feto è di circa 3.250 gr per il sesso femminile e 3.300 gr per quello maschile.

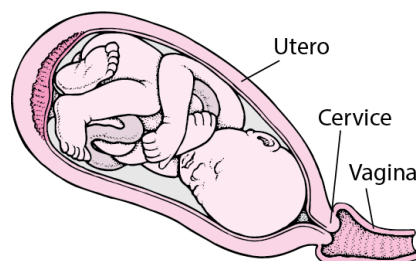


Figura 22: Il feto

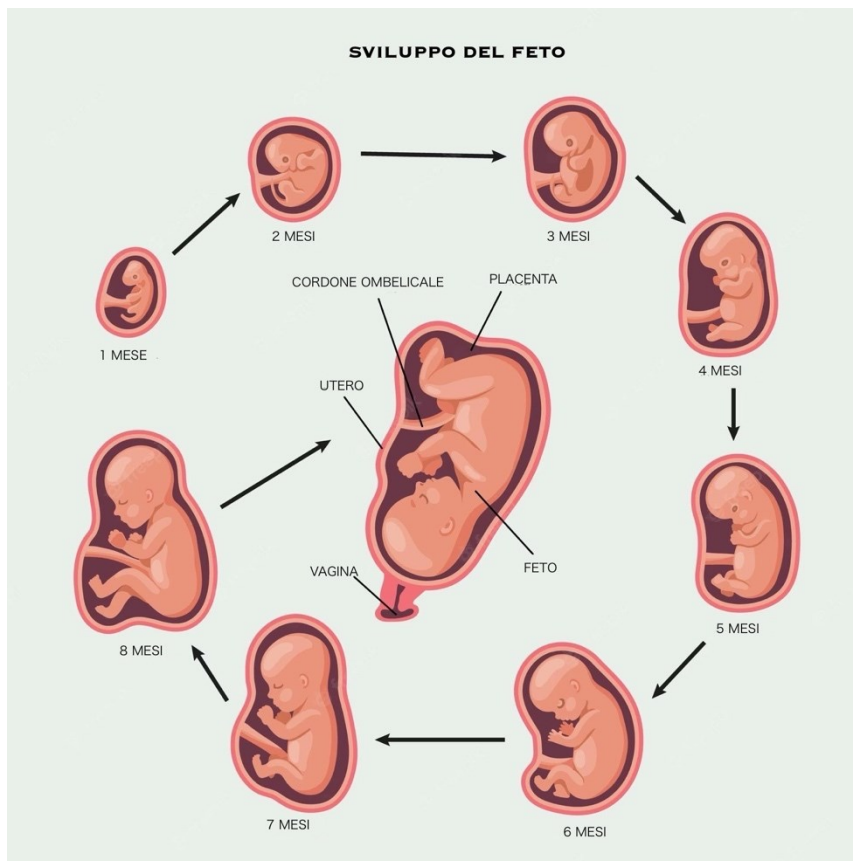


Figura 23: Sviluppo del feto

2.1.4 SISTEMA MADRE-FETO

Il complesso madre-feto, una volta definito e in via di sviluppo, risulta essere molto influenzabile da parte di una serie di fattori. In particolare, è necessario garantire quella che è una corretta nutrizione materna e di conseguenza del feto. Di contro, si racchiudono con il termine “teratogeno” tutti quei fattori come malnutrizione, fumo, carenza di vitamina B folato, rumore, radiazioni, virus, fumo e farmaci, che possono influenzare negativamente la crescita del feto causando crescita fetale ritardata o ridotta e disturbi futuri di apprendimento.

Bisogna tener conto della dipendenza, in toto, del feto dalla madre e di come questo legame possa anche indurre delle variazioni fisiologiche in quest’ultima come: ritmo respiratorio aumentato che determina un maggior ingresso di ossigeno nei polmoni; aumento del volume sanguigno in virtù della stimolazione di renina ed eritropoietina a seguito della diminuzione del volume in tutto il resto della circolazione, dato l’afflusso verso la placenta e dell’aumento della pressione di anidride carbonica nel sangue; aumento della filtrazione glomerulare come conseguenza dell’aumento del volume sanguigno; aumento delle dimensioni dell’utero e della ghiandola mammaria.

La convivenza madre-feto rappresenta di per sé un aspetto di straordinario interesse per via di quelli che sono i meccanismi adottati dalla madre per nutrire il feto pur essendo questo un organismo estraneo e soprattutto semi-allogenico (contiene cioè solo metà del patrimonio genetico della madre). Questo interesse fu suscitato per la prima volta da Sir Peter Brian Medawar nel 1953 il quale coniò il conetto di “paradosso della natura”. Per spiegare come la natura permettesse alla madre di nutrire per mesi un corpo estraneo dentro di lei permettendogli di crescere, egli si avvale di tre ipotesi: 1) La placenta funge da barriera; 2) le cellule fetali, trofoblasti, sono immature in modo che la madre non le riconosca come estranee e nocive; 3) la madre, durante la gravidanza, si trova in condizioni di immunosoppressione e quindi non è in grado di reagire ad un organismo estraneo. La prima ipotesi si basa sul fatto che la circolazione materna e quella fetale sono completamente separate ma, nonostante ciò, si vanno comunque a creare dei punti di contatto tra i villi fluttuanti e il sangue materno e tra le cellule del sistema fetale e quelle del sistema immunitario materno a livello del tessuto uterino. Ne segue, dunque, che la placenta non funge da barriera in maniera del tutto esclusiva. Nel secondo caso, invece, sono state analizzate le cellule fetali da un punto di vista immunologico e ci si è concentrati sulla presenza di antigeni HLA di tipo I e HLA-C; quest’ultimo, è differente da soggetto a soggetto ma è anche il punto di contatto tra il sistema materno e fetale (si trova sulle cellule del trofoblasto extravillioso migrate nella parete uterina) ed è soprattutto fortemente a rischio di reazione da parte del sistema immunitario materno. Per sostenere questa ipotesi, si è passati a valutare la terza: in particolare, secondo questa, dato lo stato di immunosoppressione, la madre dovrebbe essere più facilmente esposta ai virus; in realtà non è così. Studi recenti hanno infatti mostrato quello che è un cambiamento dello status materno da avverso a compiacente verso l’embrione che si verifica nella fase dell’impianto. In particolar modo, si insediano un particolare tipo di cellule, Natural Killer uterine, le quali instaurano un rapporto di collaborazione con il feto consentendone lo sviluppo. A conferma di ciò, si è aggiunta l’idea della produzione di molecole con funzione autocrino-paracrina che instaurano un vero e proprio network per permettere la convivenza dell’unità materno-fetale. [20]

La fig. 24 mostra gli adattamenti metabolici materni durante la gravidanza.

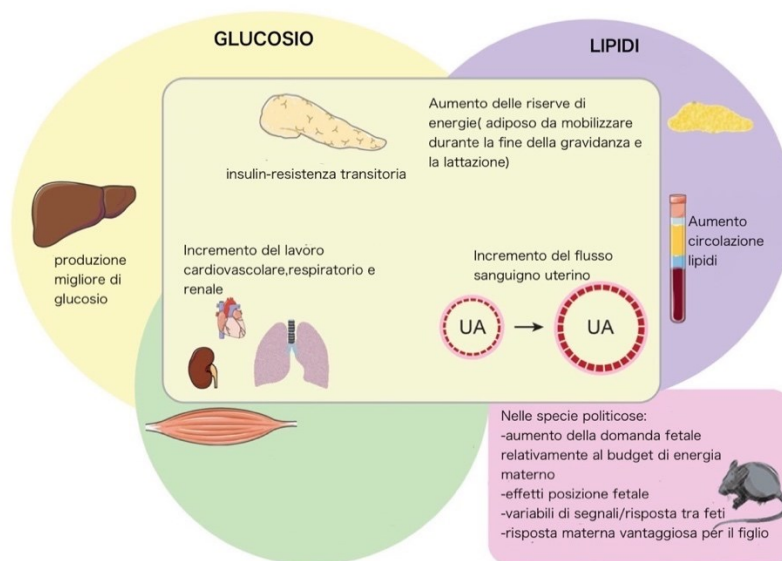


Figura 24: Adattamenti metabolici materni durante la gestazione

2.1.5 LA VALUTAZIONE DEL NEONATO E GLI SCREENING NEONATALI

Al momento del parto, vengono eseguiti degli esami per valutare le funzionalità fisiologiche ed anatomiche del neonato.

Un primo indice, che viene esaminato a un minuto e a cinque minuti dalla nascita, è l'Indice di Apgar, Fig. 25, ideato nel 1952 da Virginia Apgar, anestesista statunitense. Questo considera i cinque parametri vitali quali frequenza cardiaca, attività respiratoria spontanea, tono muscolare, riflessi e colorito cutaneo, andando ad assegnare un punteggio per ognuno, variabile da 0 a 2, come mostrato in Tab.1. Il punteggio totale, punteggio di Apgar, variabile da 0 a 10, è ritenuto normale se pari o superiore a 7. Al termine, viene riportato sulla cartella clinica come parametro fondamentale da tenere in considerazione per la crescita del neonato.

Un altro esame che viene effettuato consiste nel rilevamento del pH arterioso ombelicale per poter valutare l'acidemia fetale e, conseguentemente, poter riscontrare l'eventuale presenza di asfissia perinatale, una delle maggiori cause di mortalità neonatale e infantile. L'omeostasi dell'equilibrio acido-base, durante lo sviluppo fetale e anche del neonato stesso, viene mantenuto attraverso la produzione di acidi che vengono poi tamponati; questi possono essere volatili o meno. Un esempio di acido volatile è l'acido carbonico, prodotto dal metabolismo aerobico attraverso la fusione di anidride carbonica e acqua mediata dall'enzima anidrasi carbonica eritrocitaria; questo acido viene poi scisso in molecole di ossigeno e di anidride carbonica in modo che quest'ultima possa essere espulsa attraverso la membrana placentare. In caso contrario, ritenzione di anidride carbonica, s'innescava quella che vien definita acidosi respiratoria caratterizzata da una riduzione del pH e da un

aumento della pressione di anidride carbonica. Contestualmente, un esempio di acidi non volatili sono quelli organici, come l'acido lattico, originati dal metabolismo anaerobico attivato in caso di ipossia fetale; questi si accumulano a livello dell'interfaccia placentare fetale perché non riescono a diffondere. In caso di accumulo eccessivo, si prospetta un quadro di acidosi mista (pH basso, idrogenocarbonato basso e anidride carbonica elevata) o di acidosi metabolica (pH basso, idrogenocarbonato alto e anidride carbonica normale); in entrambi, si rileva un abbassamento del pH dovuto all'eccessiva concentrazione di acido lattico.

Il Royal College of Obstetricians and Gynecologists e il Royal College of Midwives raccomandano l'esecuzione della misurazione dell'emogas funicolare venoso e arterioso a seguito del parto; la misura del pH arterioso è preferibile in quanto riesce a mappare meglio l'equilibrio acido-base fetale. Questo tipo di analisi permette, infatti, di poter conoscere la risposta fetale al parto, l'equilibrio acido-base fetale alla nascita e lo stato di ossigenazione intrapartum.

L'esame consiste, dunque, nel prelevare del sangue, a seguito di una tecnica di doppio clampaggio del cordone ombelicale, di provenienza fetale dal vaso arterioso e dalla vena ombelicale placentare. Il prelievo del sangue viene eseguito attraverso un ago e capillare o siringa, entrambi eparinati. Se non fosse possibile eseguire questa procedura, si procede con il prelievo di sangue da un capillare arterializzato, entro un'ora dalla nascita. I range di normalità relativi al pH, CO_2 , HCO_3 , BE (eccesso di basi, valore che permette di distinguere acidosi metabolica e respiratoria) su emogas funicolare arterioso, sono mostrati in Tab.2. La Tab.3 mostra i parametri che permettono la distinzione tra i vari tipi di acidosi. [22] Gli screening neonatali, dunque, rappresentano un importante intervento di prevenzione sanitaria secondaria che permette la diagnosi precoce di un ampio spettro di malattie congenite. In Italia, questi interventi sono obbligatori e gratuiti, nel rispetto del DPCM 12 gennaio 2017, in modo da garantire le prestazioni necessarie e appropriate. [23]

Si distinguono: lo screening uditivo, visivo ed esteso. Il primo viene effettuato durante i primi giorni di vita eseguendo un'indagine breve e soprattutto non invasiva, spesso svolta durante il sonno spontaneo, in modo da inviare al bambino gli stimoli acustici di diversa intensità ed eventualmente poter permettere l'inizio di un processo riabilitativo mediante apparecchi acustici e/o impianto cocleare. Il secondo, previsto dai nuovi Lea (livelli essenziali di assistenza), viene eseguito tramite il test del riflesso rosso quale esame semplice che valuta la presenza o meno del riflesso rosso dal fondo oculare (effetto che si nota nell'effettuare foto con flash). L'ultimo, invece, viene eseguito per poter diagnosticare l'eventuale presenza di malattie metaboliche, come ipotiroidismo congenito, fibrosi cistica e fenilchetonuria; è basato sul prelievo di poche gocce di sangue dal tallone del neonato, fra le 48 e le 72 ore di vita. Il test si esegue andando a riscaldare e sterilizzare il tallone del bambino ed effettuando una piccola puntura in modo che, le gocce di sangue fuoriuscite, possano entrare in

contatto con la carta assorbente, fin quando tutti i cerchi stampati sulla scheda conterranno dei campioni e possano essere esaminati. [24] Con l'avvento dei recenti decreti, questo screening è stato esteso anche a patologie metaboliche ereditarie e neuromuscolari e gli è stato assegnato il termine di test di Guthrie, Fig.26.

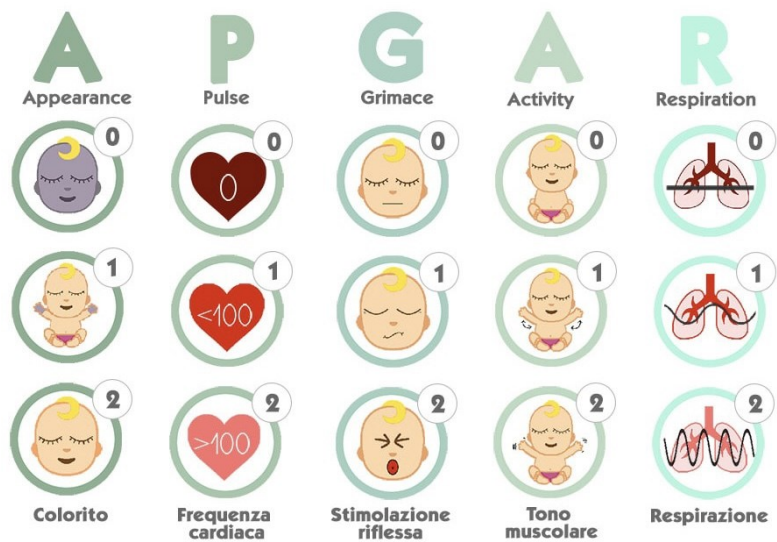


Figura 25: Indice di Apgar



Figura 26: Test di Guthrie

Tabella 2: Punteggio di Apgar

	PUNTEGGIO		
SEGNO	0	1	2
Frequenza cardiaca	Assente	Bassa (<100battiti/min)	>= 100 battiti/min
Attività respiratoria	Assente	Lenta, irregolare	Buona, pianto
Tono muscolare	Flaccido	Flessione modesta	Movimenti attivi
Irritabilità riflessa (catetere nelle narici, stimolazione tattile)	Nessuna risposta	Smorfie	Tosse, starnuti, pianti
Colorito	Cianotico o pallido	Corpo roseo, estremità cianotiche	Completamente roseo

Tabella 3: Range di normalità relativi al sangue prelevato dall'arteria ombelicale in neonati a termine

SANGUE ARTERIA OMBELICALE	MEDIA	5[^] PERCENTILE / 95[^] PERCENTILE
pH	7.27	7.15/7.38
pCO_2 (mmHg)	50.3	32/68
HCO_3 (mEq/L)	22	15.4/26.8
BE (mEq/L)	-2.7	-8.1/0.9

Tabella 4: Valori che permettono di differenziare i tre tipi di acidosi: respiratoria, metabolica e fetale

ACIDOSI	pCO_2	HCO_3	pH
RESPIRATORIA	>= 65	>=22	-6.4 ± 1.9
METABOLICA	<65	<22	-15.9 ± 2.8
MISTA	>=65	<22	-9.6 ± 2.5

2.2 LA PLACENTA

La placenta è un organo temporaneo che si forma nelle primissime fasi della gravidanza, pochi giorni dopo la fecondazione e permette gli scambi metabolici fra la madre e il feto attraverso quello che è definito cordone ombelicale, Fig.27. In virtù di questo, strutturalmente, presenta un'interfaccia fetale caratterizzata dal corion e dai villi ricchi di sangue materno, ed una materna, la decidua basale. Queste due zone sono tenute insieme dal guscio citotrofoblastico.

Durante le prime fasi dello sviluppo, si ha la formazione della placenta primitiva, la quale verrà poi sostituita da quella definitiva. La prima, è caratterizzata da una struttura sferica che avvolge completamente il corion mentre la seconda è un semplice disco che occupa solo una parte della superficie corionica. La formazione della placenta primitiva inizia intorno alla seconda settimana nel momento in cui la decidua inizia a circondare la blastocisti e il sangue materno raggiunge le lacune, permettendo la nutrizione isotrofica della stessa blastocisti; questa tipologia di nutrizione verrà poi soppiantata dalla nutrizione emotrofica quando si avrà la formazione dell'apparato circolatorio primitivo. Lo sviluppo completo placentare termina intorno alla dodicesima-tredicesima settimana di gestazione. Al termine della gravidanza presenta approssimativamente un diametro di circa 15-20 cm, uno spessore di circa 2/3 cm e un peso di circa 500/600 gr. Ricopre all'incirca il 15-30% della superficie interna dell'utero e la sua crescita rispecchia, infatti, quella dell'utero in sviluppo. [25]

A livello della placenta, si distingue una porzione embrionale, chiamata corion, rappresentata dagli strati più esterni del trofoblasto e una parte materna, decidua, costituita dall'endometrio posto alla base del corion.

La placenta, entrando nel dettaglio, si origina a seguito dell'invasione della blastocisti nella parete uterina; in particolare, il sinciziotrofoblasto incontra i vasi sanguigni materni in modo da raccogliere il sangue a livello di strutture dette lacune. Il sinciziotrofoblasto e le lacune vengono circondati da cordoni di citotrofoblasto dai quali emergono i villi coriali, ovvero proiezioni digitiformi contenenti una fitta rete di capillari che rappresentano l'apparato circolatorio dell'embrione e la via attraverso cui si effettua lo scambio di sostanze tra feto e madre. I villi sono circondati da una "pozza" di sangue materno per via di enzimi che rompono la parete dei vasi materni; ne deriva uno scorrimento lento del sangue materno all'interno delle lacune dovuto all'accrescimento dei villi. Infatti, il motivo per cui la formazione della placenta segue un processo celere, è dovuto al fatto che la formazione dei villi coriali e del corrispettivo spazio intervilloso, creando la tipica struttura "a cespuglio" della placenta primitiva, minimizzano lo spazio tra il sangue materno e fetale. I villi coriali, man mano che si allungano, formano i villi primari, cordoni costituiti da una parte interna di citotrofoblasto e da una esterna di sinciziotrofoblasto. Alcuni di questi, per via di uno stroma che si origina da cellule

mesenchimali provenienti dal mesoderma del corion, mutano in villi secondari; anche questi subiscono a loro volta un'evoluzione per via della comparsa di vasi sanguigni in seguito alla quale tramuteranno in villi terziari. In concomitanza con queste evoluzioni, le cellule citotrofoblastiche, contenute nei villi, continuano ad emergere andando a formare uno strato parallelo alla decidua, il disco trofoblastico; questo, assieme al disco corionico, divide il sincizio. I due dischi comunicano tramite villi ancoranti e sono separati da uno spazio intervilloso all'interno del quale può scorrere sangue materno. Si noti come è dai villi ancoranti che si formeranno colonne di cellule di trofoblasto dalle quali, le singole cellule, si staccano per invadere una parte del miometrio e costituire quella che è la placenta vera e propria. [20]

A questo punto, seguono due processi: il sinciziotrofoblasto si contrae attorno ai villi in modo da aumentare il volume disponibile per il sangue materno e, contemporaneamente, dai villi ancoranti si diramano i villi fluttanti i quali hanno accesso a tutte le sostanze presenti nel sangue materno, pur essendo separati dall'epitelio, e questo conferisce alla placenta la funzionalità di barriera. A seguito di questi fenomeni, l'intera decidua si differenzierà in: basale, capsulare e parietale; la prima è la parte adiacente ai villi e che non sporge nella cavità dell'utero, la seconda si trova tra i villi e la cavità uterina mentre la terza non è a contatto con i villi.

La placenta primitiva, pian piano muta per dare spazio a quella definitiva; il corion si allarga verso la cavità uterina e i villi vengono stirati dalla base che si espande, accorciandosi e riducendo dunque il flusso. I villi della decidua capsulare degenerano e al corion che li conteneva viene attribuito il nome di corion liscio. Nella parte della decidua basale, invece, i villi adiacenti, per compensare quanto accaduto, subiscono una rapida crescita di forma e volume dando vita al corion villosi. Questo, con la decidua basale, darà vita alla placenta definitiva la cui tipica forma umana è discoidale.

In concomitanza a ciò, anche l'amnios si allarga facendo sì che il sacco amniotico entri in contatto con esso dando forma alla membrana corioamniotica. Il sacco amniotico, inoltre, circonda anche il peduncolo ombelicale e il dotto del sacco vitellino dando origine al cordone ombelicale primitivo.

Al termine di tutto, la crescita di volume del corion continua ad aumentare, assieme a quella dell'amnios, in modo che la decidua capsulare e parietale entrino a contatto tra loro originando la decidua vera.

La crescita della placenta, durante la gravidanza, avviene per via della formazione di villi di secondo, terzo etc. ordine a partire dai tronchi dei villi di primo ordine; questi ultimi sono quelli che si erano originati, durante la formazione della placenta primitiva, sopra il corion frondoso e che suddividono il disco corionico in aree definite cotiledoni fetali. È l'aumento della superficie di queste aree che fa crescere la placenta. Si rileva come, durante questo progresso, il disco trofoblastico scompaia del tutto portando a diretto contatto la decidua basale e i villi a formare lo strato compatto; la restante

parte della decidua forma lo strato spongioso. Dallo strato compatto, invece, si originano i setti deciduali che dividono la decidua in zone convesse chiamate cotiledoni materni.

Nella placenta matura, Fig.28 e 29, il citotrofoblasto scompare in modo che la circolazione materna ed embrionale siano separate soltanto da una membrana basale, da un sottile strato citotrofoblastico e da capillari embrionali.

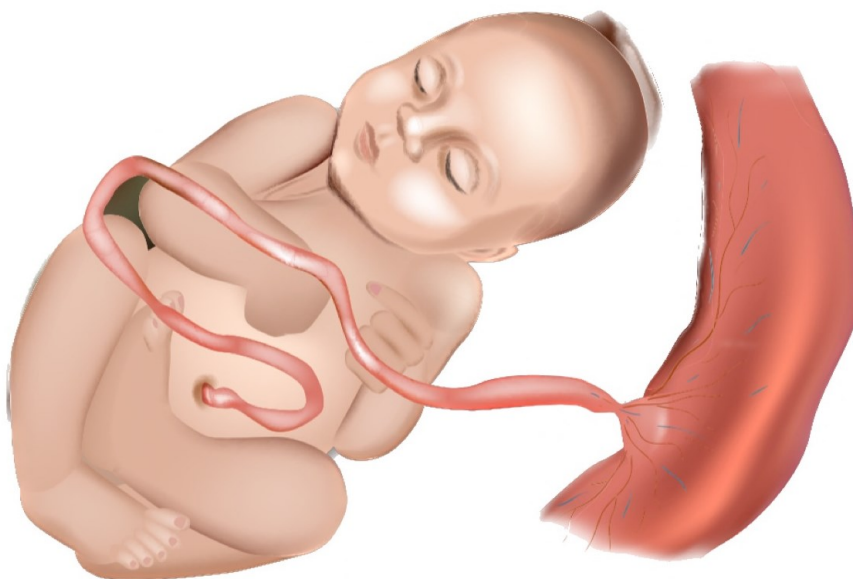
Intorno alla decima settimana, il feto abita nella cavità amniotica ed è connesso alla placenta tramite il cordone ombelicale contenente l'allantoide, i vasi placentari e il sacco vitellino. [14]

Al termine della gravidanza, la parte materna presenta una forma convessa ricoperta di decidua basale spongiosa caratterizzata da 10-30 cotiledoni; la parte fetale è rivestita dalla membrana corioamniotica che le conferisce un aspetto liscio ed è il punto di legame con il cordone ombelicale.

Il sito e l'ubicazione della placenta rappresentano un fattore di notevole rilevanza durante il periodo di gravidanza in quanto, nell'eventualità in cui la blastocisti dovesse essere troppo vicina alla cervice, nella parte inferiore dell'utero, ci si ritrova in una condizione definita placenta previa, Fig.30, che può comportare fenomeni emorragici che, a loro volta, possono essere anche dovuti ad abruption placentae, distacco della placenta dalla parete uterina, Fig.31.

La placenta, infine, per le sue caratteristiche strutturali e funzionali, è classificata in: discoidale (per la sua forma), emocoriale (sangue materno bagna i villi), deciduale e corio-allantoidea (vasi sanguigni che collegano embrione al corion si originano attorno all'allantoide).

Figura 27: La placenta



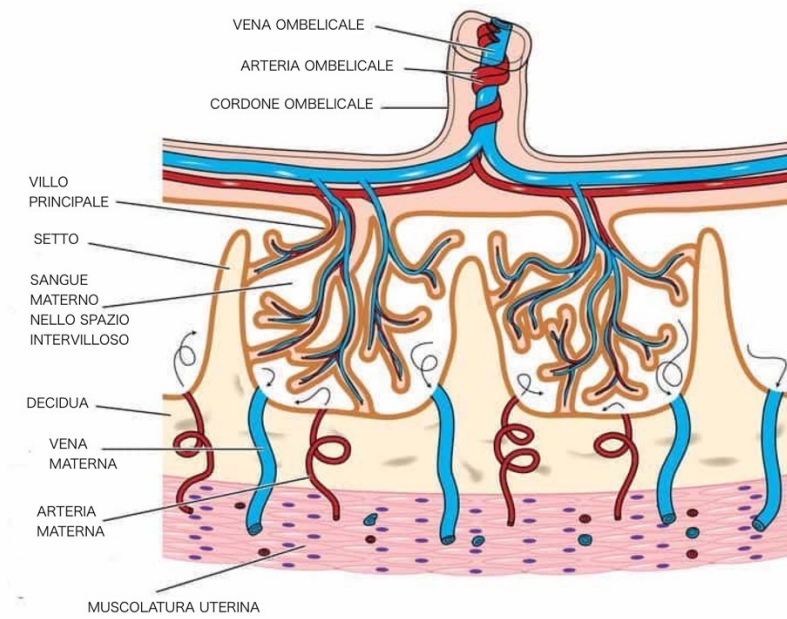


Figura 28: Struttura interna placentare

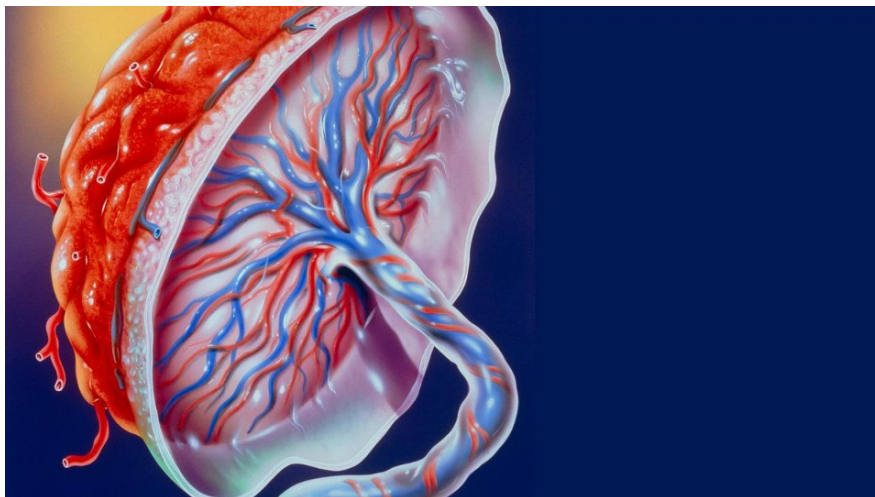


Figura 29: Circolazione placentare



Figura 30: Placenta previa

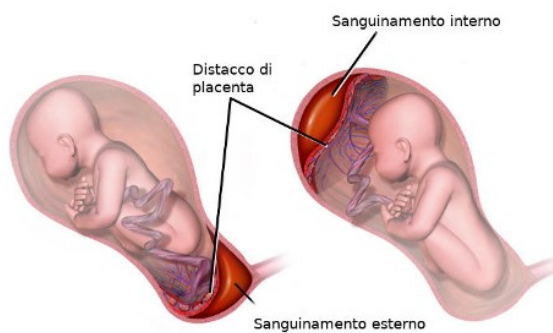


Figura 31: Distacco placenta

2.2.1 FUNZIONI

Le funzioni peculiari della placenta riguardano la respirazione e la nutrizione; oltre ad esse, svolge un ruolo fondamentale a livello del sistema immunitario.

In campo metabolico, la placenta è in grado di sintetizzare glicogeno, proteine, colesterolo e acidi grassi che fungono da energia e nutrienti per il feto. Ad esempio, il colesterolo materno, mentre la placenta è in fase di sviluppo, viene utilizzato ma poi inizia ad essere sintetizzato a partire dai depositi di acidi grassi. [25]

Il trasporto delle sostanze, Fig.32, attraverso la membrana placentare, è realizzato mediante una serie di meccanismi in modo che i nutrienti e l'ossigeno vengano riversati a livello del sangue fetale mentre i prodotti di scarto vengano espulsi attraverso il sangue materno. Lo scambio tra l'interfaccia materna

e fetale, tramite lo strato di sinciziotrofoblasto, può avvenire per mezzo di trasporto passivo (diffusione, diffusione facilitata, osmosi), trasporto attivo o vescicolare.

La placenta esplica la sua funzione attraverso il cordone ombelicale, composto da tre vasi sanguigni quali: una vena più grande che trasporta sangue ricco di ossigeno e sostanze nutritive verso il feto e due arterie più piccole che trasportano le sostanze di scarto verso la madre.

È opportuno, dunque, organizzare la funzione svolta dalla placenta nell'ambito del trasporto in: trasporto dei gas, trasporto di acqua, trasporto dei minerali, trasporto delle sostanze nutritive e trasporto di ormoni.

Nel primo caso, ossigeno e anidride carbonica confluiscono attraverso un meccanismo di diffusione semplice; purtroppo, questo trasporto incontra un limite nella barriera di sangue placentare il cui spessore e la cui superficie troppo piccola, rendono il passaggio più arduo (rispetto a quello che avviene a livello polmonare). Il feto, presentando una quantità maggiore di emoglobina rispetto alla madre, ha una maggiore affinità con l'ossigeno piuttosto che con l'anidride carbonica. Pertanto, l'ossigeno diffonde verso il sangue fetale mentre l'anidride carbonica verso il sangue materno. Quest'ultima può essere trasferita in diversi modi: in soluzione, sotto forma di ioni bicarbonato, di acido carbonico, di ioni carbonato o carbaminoemoglobina. A questo trasporto è associato l'effetto Haldane derivante dal fatto che l'emoglobina deossigenata presenta una maggiore affinità per l'anidride carbonica rispetto all'ossiemoglobina perché migliore accettore di protoni. Questo spiega il perché il sangue deossigenato può portare ad un aumento della anidride carbonica. In particolare, si evidenzia come, per via dell'effetto Bohr, l'attività di fumo materno diminuisca la capacità del sangue di trasportare ossigeno in quanto aumenta la concentrazione di anidride carbonica.

L'acqua, invece, attraversa la membrana per osmosi e, con l'azione di forze idrostatiche, passa attraverso il sangue e l'amnios a livello del quale si verifica il ricambio del liquido amniotico.

Per le sostanze minerali, si distingue una diffusione passiva per gli elettroliti quali sodio, potassio e cloro e una diffusione facilitata per calcio (diffusione regolata dall'ormone paratiroideo) e fosfati, essendo questi accumulati a livello del feto.

Per le sostanze nutritive, predomina un meccanismo di trasporto attivo per gli zuccheri tramite l'azione di specifici enzimi, propri della placenta, che permettono, ad esempio, la sintesi del glucosio (GLUT-1), quale fonte vitale per la crescita del feto.

Le proteine, di contro, non sono trasportate ma vengono direttamente scisse in aminoacidi a livello della placenta; questi ultimi sono poi trasportati attraverso meccanismi attivi a livello dei microvilli e della membrana basale del sinciziotrofoblasto. Un'eccezione è rappresentata dalle immunoglobuline G che vengono trasportate intatte mediante pinocitosi conferendo al feto un'immunità passiva contro alcune malattie infettive. A livello placentare, è presente anche una

capacità transaminasica; individuata a partire da uno studio condotto nel 1955 dove si è analizzata la sintesi dell'alanina ricercando cromatograficamente i composti che potevano entrare in gioco nella reazione con lo scopo di comprendere se, appunto, anche in placenta la sintesi degli aminoacidi coinvolgesse sistemi enzimatici e altri composti, previsti da uno schema dettagliato dello studioso Kritzmann. È stata, dunque, confermata l'esecuzione di queste reazioni con l'azione di determinati enzimi quali amidasi, transaminasi e trasportatori di idrogeno. [26]

I lipidi possono essere rilasciati dall'enzima lipoproteina lipasi presente sull'interfaccia placentare materna; mentre, gli acidi grassi e il glicerolo riescono ad attraversare la membrana con un meccanismo di diffusione semplice o facilitata. Le vitamine attraversano la membrana con una certa facilità.

Per quanto riguarda gli ormoni, si distinguono due diversi meccanismi in quanto gli ormoni steroidei liberi attraversano facilmente la membrana mentre quelli peptidici sono bloccati, ad eccezione della tiroxina.

La placenta, inoltre, funge da barriera protettiva contro una gran parte di agenti nocivi e, di contro, permette il passaggio, tramite diffusione semplice, di quelli che sono i farmaci utili per l'organismo il cui trasporto dipende dal peso molecolare, grado di ionizzazione, solubilità dei lipidi, legame proteico e flusso sanguigno. Il trasferimento di farmaci, durante i primi periodi di gravidanza, può infatti provocare l'insorgenza di malformazioni congenite; mentre, farmaci somministrati tra il secondo e il terzo semestre possono influenzare lo sviluppo del feto ed eventualmente, se somministrati in prossimità del parto, possono avere effetti sulle fasi di pre e post travaglio.

La placenta, infatti, permette l'eliminazione di prodotti di scarto come l'ammoniaca che viene convertita in acido urico e successivamente in urea e la bilirubina che, invece, sfrutta la diffusione passiva con l'utilizzo di proteine carrier. Inoltre, si occupa anche della secrezione del fattore di crescita endoteliale vascolare, del fattore di crescita placentare, delle citochine, chemochine ed eicosanoidi.

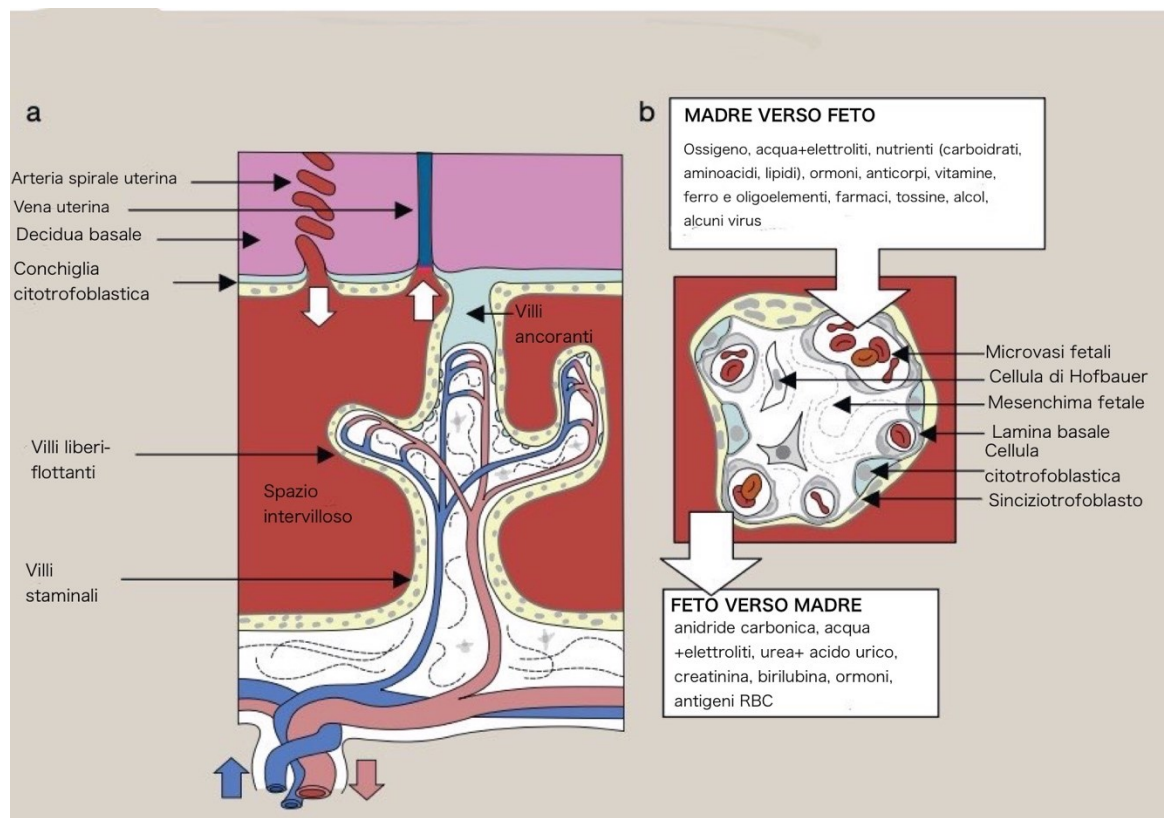


Figura 32: Trasporto placentare, A systems perspective on placental amino acid transport

La placenta funziona anche come ghiandola endocrina in quanto produce delle sostanze utili per il proseguimento della gravidanza. I principali ormoni prodotti sono i peptidici e gli steroidei; i primi (gonadotropina corionica umana, fattore di crescita, ormone di rilascio della corticotropina, ormone lattogeno placentare) sono prodotti prettamente dalle cellule del trofoblasto mentre i secondi, definiti ormoni steroidei, hanno come precursore comune il colesterolo che viene captato dal liquido extracellulare o sintetizzato da enzimi. Sono lipofili e di natura lipidica, infatti hanno un'elevata solubilità in acqua; in particolare, non vengono accumulati ma riescono ad attraversare facilmente la membrana cellulare. Le peculiarità dell'ormone finale steroideo dipendono dalla cellula e dagli enzimi, ad esempio: le cellule dell'ovaio presentano un'elevata quantità di enzimi che permettono la sintesi del testosterone in estradiolo; di contro, a livello delle cellule maschili, questo non succede e di conseguenza il testosterone è presente in elevate quantità. La placenta si occupa, essendo dotata di enzimi necessari, della sintesi del progesterone ma non degli estrogeni e, di conseguenza, riceve questi ultimi dalle ovaie e dalle ghiandole surrenali materne e fetali.

Gli ormoni elencati esplicano la loro principale funzione di controllo sulle ovaie, sulla secrezione di progesterone ed estrogeno da parte del corpo luteo, sul metabolismo e sulla crescita della ghiandola mammaria. Questi, secreti continuamente durante la gravidanza da parte del corpo luteo o della placenta, sono i responsabili dell'assenza di ciclo mestruale durante la gravidanza in quanto la loro

elevata concentrazione inibisce la secrezione delle gonadotropine ipofisarie. In particolare, gli estrogeni permettono la formazione dei dotti mammari utili per la lattazione mentre il progesterone è utile per il mantenimento dell'endometrio e per l'inibizione delle contrazioni uterine.

Gli ormoni maggiormente secreti dalla placenta, e importanti durante la gravidanza, risultano essere: la gonadotropina corionica umana (HCG), il lattogeno placentare umano (hPL) e la relassina. L'HCG è un ormone peptidico che permette il mantenimento del corpo luteo e l'aumento della sua concentrazione viene annoverato tra i parametri utili per rilevare la presenza di una gravidanza. In particolare, la sua secrezione determina quella che è la produzione, da parte del corpo luteo, del progesterone il cui compito è quello di far rimanere intatto l'endometrio durante il periodo di gravidanza. Il grafico, Fig.33, rileva quelli che sono i suoi valori elevati per i primi 60/80 giorni che iniziano poi pian piano a diminuire fino a rimanere costanti dando modo alla placenta di secernere estrogeni e progesterone. L'hPL è l'ormone peptidico responsabile della crescita della mammella e della lattazione; si occupa delle variazioni metaboliche materne del glucosio e degli acidi grassi per favorire la crescita del feto. La relassina permette l'espansione della pelvi durante il parto, la dilatazione del collo dell'utero per facilitare il passaggio del feto nel canale vaginale e inibisce il rilascio di ossitocina.

La placenta secerne anche ormoni che possono influenzare la madre come l'inibina, responsabile della maturazione dei follicoli o la relaxina che favorisce la vasodilatazione quindi il flusso sanguigno a livello dell'utero. All'attività di ghiandola endocrina della placenta, si affiancano anche degli aspetti negativi come l'evoluzione di alcune patologie: la tossiemia gravidica o la nausea gravidica. La prima rappresenta l'unione di altre due patologie quali la preeclampsia e l'eclampsia le quali differiscono per la presenza di convulsioni nel secondo caso. I sintomi frequenti sono edemi, proteinuria ed ipertensione e tra le possibili cause, non ancora del tutto note, rientra un'eccessiva ostruzione dei vasi sanguigni e un'anomalia a livello delle cellule del trofoblasto. La seconda, la cui causa precisa non è ancora del tutto nota, sembra essere attribuita ad elevate concentrazioni di estrogeni.

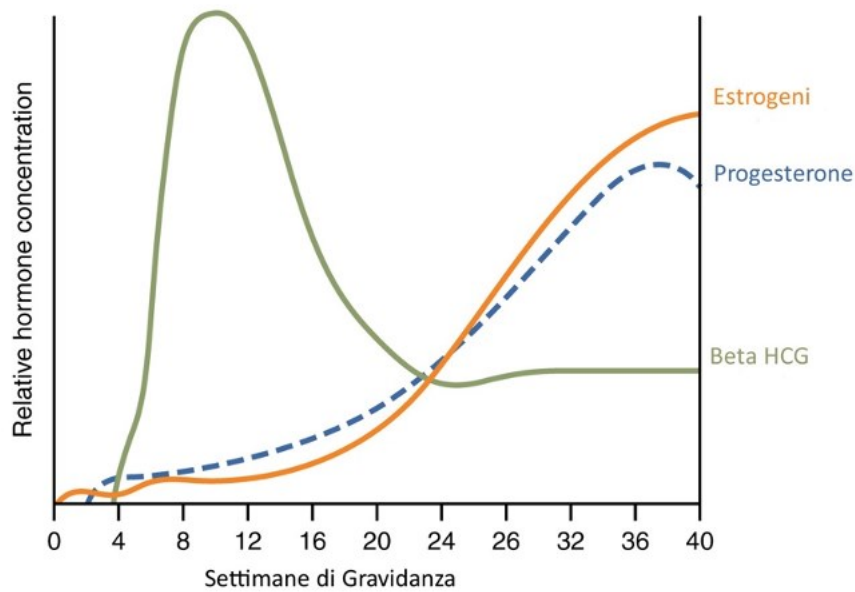


Figura 33: Concentrazione ormoni in gravidanza

2.2.2 LA CIRCOLAZIONE PLACENTARE

Durante l'evolversi della gravidanza, si assiste, a partire già dal primo trimestre, a modificazioni emodinamiche; si ha un aumento del volume plasmatico fino a circa il 50% in più rispetto a quello basale al quale consegue un aumento della massa dei globuli rossi. Anche la stessa frequenza cardiaca aumenta del 50% per favorire l'aumento di gittata cardiaca. Il flusso uterino aumenta parallelamente alla crescita della placenta facendo diminuire le resistenze periferiche e determinando un calo della pressione arteriosa, intorno al primo trimestre. [27]

La placenta viene irrorata dal 10% della gittata cardiaca totale materna e per questo motivo, un eventuale distacco della placenta per enorme flusso sanguigno, rientra tra le emergenze mediche.

I villi, che rappresentano l'apparato circolatorio dell'embrione, sono avvolti da un seno contenente sangue materno proveniente dalle arteriole materne. In particolare, il sangue materno raggiunge il seno tramite l'arteria uterina, attraversa il villo e fuoriesce tramite la vena uterina. Di contro, il sangue fetale raggiunge la circolazione materna passando attraverso le arterie e, successivamente, le vene ombelicali, contenute all'interno del cordone ombelicale. Il sangue materno e quello fetale sono separati da uno strato di cellule epiteliali dei villi e di cellule endoteliali dei capillari fetali. A livello del passaggio di sostanze nutritive, il sangue fetale e il sangue materno non si mescolano mai.

2.2.2.1 LA CIRCOLAZIONE MATERNA

La circolazione materna permette il passaggio di sostanze nutritive, ormoni e fattori di crescita: in particolare, l'anidride carbonica e l'ossigeno si muovono per diffusione mentre il glucosio utilizza

proteine trasportatrici. Il trasporto di ossigeno dal sangue materno a quello fetale è facilitato per la presenza, all'interno del sangue fetale, di emoglobina maggiormente affine con l'ossigeno che si differenzia dalla classica emoglobina umana per l'assenza del legame con il 2,3-bisfosfoglicerato e anche per la minor pressione di ossigeno nel sangue periferico fetale rispetto al placentare. La circolazione uterina materna fornisce al feto, tramite la placenta, gli aminoacidi (prodotti dagli strati cellulari di trofoblasti). Il sangue uterino scorre attraverso le arterie spirali nello spazio intervilloso placentare dove, non essendoci vascolarizzazione materna, è in contatto diretto con i villi fetali. La localizzazione e il numero di arterie e vene spirali che entrano ed escono dalla placenta, non sono ancora ben chiari ma influenzano il flusso e la miscelazione del sangue nello spazio intervilloso. È probabile che ci siano 30-40 arterie spirali per placenta, quindi una o due per lobulo. Il flusso sanguigno, in quest'ultimo, è determinato dal numero e dalla localizzazione delle arterie e vene uterine. In particolare, poco prima di entrare nella decidua, le pareti delle arterie spirali modificano il loro spessore perché le cellule endoteliali che le rivestono vengono sostituite da cellule colonnari alte. Questa variazione, seguendo la legge di Poiseuille, porta ad una restrizione delle arterie e ad un aumento della pressione sanguigna. Questo fa sì che il sangue materno venga letteralmente schizzato all'interno. All'interno dello spazio intervilloso, il sangue materno deve miscelarsi con quello già presente e questa miscelazione determina la concentrazione di aminoacidi disponibile; infatti, una scarsa miscelazione, come nel caso della preeclampsia, può compromettere il trasferimento. [28] Dopo essersi mescolato all'interno dello spazio intervilloso, il sangue materno rifluisce attraverso le aperture venose nella circolazione uterina acquistando una lentezza che gli permette di effettuare gli scambi; grazie alla presenza dei setti che delimitano i cotiledoni materni, il sangue evita di disperdersi. Alla fine, raggiunge la decidua basale che presenta le vene uterine le quali, per via della bassa pressione, risucchiano il sangue che fuoriesce dalla placenta.

Verso la fine della gravidanza, il sangue materno contenuto nella placenta presenta un volume di circa 150mL e viene ricambiato 3 o 4 volte al minuto. Ne segue un flusso, attraverso la placenta, elevato (da 400 a 600mL al minuto).

2.2.2.2 LA CIRCOLAZIONE FETALE

La circolazione fetale permette il passaggio di sangue povero di ossigeno e di prodotti di scarto dal feto alla madre, Fig.34 e 35. Il sangue fetale, attraverso le arterie, entra nei villi a livello dei quali la pressione media del sangue fetale deve essere superiore a quella a livello dello spazio intervilloso in modo da mantenere i vasi sempre ricchi e ne esce dirigendosi verso la vena ombelicale. Circola, dunque, solo passando dalle arterie alle vene essendo la pressione nelle arterie superiore a quella a livello della vena ombelicale. La pressione media del sangue fetale è di circa 30 mmHg; è opportuno

che rimanga tale in modo da mantenere i vasi ricchi di sangue e impedire alle pareti di accollarsi. Al termine della gravidanza, la superficie dei villi è esposta al sangue materno affinché si crei una vasta zona per l'effettuazione degli scambi.

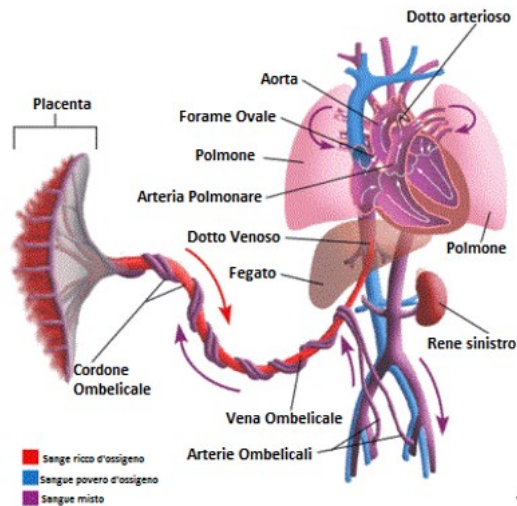


Figura 34: Circolazione fetale

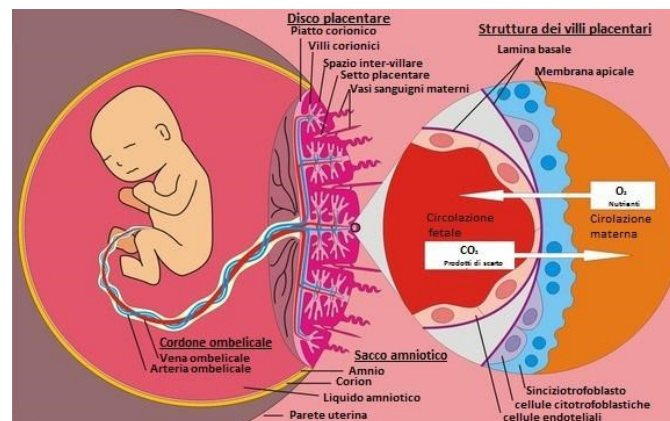


Figura 35: Meccanismo di trasporto

2.2.3 LA MEMBRANA PLACENTARE

Con il termine membrana placentare si tende a racchiudere l'insieme di membrane in grado di separare in maniera drastica il sangue materno con quello fetale. [13] Nell'uomo essa si compone solo ed esclusivamente di tessuti fetali essendo quelli materni distrutti dal sinciziotrofoblasto; per tale motivo la placenta umana è definita emocoriale.

Da un punto di vista strutturale, la sua formazione inizia in concomitanza con l'apparato circolatorio primitivo mantenendo una struttura primitiva che viene poi sostituita da una definitiva intorno al sesto mese. La struttura primitiva vede la presenza di quattro strati che separano l'ambiente fetale e materno: sinciziotrofoblasto, citotrofoblasto, tessuto connettivo ed endotelio dei vasi sanguigni. Di contro, il passaggio dalla primitiva alla definitiva è segnato dalla scomparsa del citotrofoblasto e del tessuto connettivo a seguito di uno spostamento dei vasi sanguigni verso il sinciziotrofoblasto.

Nonostante la membrana, negli ultimi tre mesi di gravidanza, presenti un'area molto estesa ed uno spessore esile per ottimizzare gli scambi, questi sono molto pochi e si accentuano solo durante il parto, durante il quale la madre entra a contatto con il sangue fetale e le proteine del feto possono maggiormente innescare una risposta immunitaria, ad esempio attraverso la produzione di anticorpi anti-Rh.

2.3 TRASPORTO DEGLI AMINOACIDI A LIVELLO PLACENTARE

Tra le funzioni della placenta annoverate, si è discusso dell'importanza della stessa in campo metabolico e nutrizionale in quanto interfaccia per gli scambi che avvengono tra madre e feto. Tra le sostanze nutritive che vengono trasportate a livello della placenta, rientrano anche gli aminoacidi necessari per la crescita del feto.

Conoscere il meccanismo con cui questi vengono trasferiti è fondamentale per seguire la crescita del feto e predire eventuali patologie. Il trasporto degli aminoacidi a livello placentare risponde a quella che è la richiesta e quindi al fabbisogno del feto. In particolare, si sottolinea l'importanza degli aminoacidi sia essenziali per il feto, non essendo in grado di sintetizzarli, sia non essenziali in quanto, pur potendo il feto procedere con la sintetizzazione, questa non soddisfa la richiesta.

Nel corso degli anni, data l'importanza, si sono susseguiti numerosi studi condotti, in prima analisi, sugli animali con l'intento di ottenere una serie di delucidazioni in primis su come avvenisse il trasporto placentare per poi soffermarsi sul trasporto degli aminoacidi in generale, sul comportamento dei singoli e sui fattori che lo regolano. Un primo studio, condotto nel 1968 sui porcellini d'India, ha studiato il trasporto placentare sia in vivo che in vitro: attraverso l'infusione di un aminoacido non metabolizzato in cavie gravide per circa 2-4 ore, si è assistito ad un aumento sia della concentrazione

plasmatica fetale rispetto a quella materna sia della concentrazione nella decidua piuttosto che nel plasma materno. [29] Questo ha suggerito che il trasporto placentare segua due passaggi, un primo assorbimento placentare e un rilascio nel plasma fetale. Gli studiosi, a seguito del parto, hanno adottato una tecnica di perfusione placentare con il fine di dimostrare il ruolo primario della placenta nello stabilire il gradiente di concentrazione. Hanno anche scoperto come il trasporto avvenga prettamente in un'unica direzione, verso il feto. In seguito, studi in vitro hanno rivelato un assorbimento dell'aminoacido più efficace da parte dei villi placentari. Con il susseguirsi degli studi, si è visto che la placenta umana presenta un maggior assorbimento di insulina e, successivamente, si è iniziata a cercare una corrispondenza tra il trasporto placentare e il diabete mellito gestazionale, patologia che colpisce dal 3% al 5% le donne gravide associata ad una crescita eccessiva del feto ed obesità. E' stata, in particolare, negli anni, individuata una relazione evidenziando un aumento, di circa il 70% di un aminoacido, ornitina, nelle donne affette da GDM. Confrontando il plasma venoso ombelicale, invece, le concentrazioni di metionina, isoleucina, fenilalanina, ornitina, prolina e alanina sono risultate molto elevate rispetto a quella di glutammina. Stessa rilevazione anche nel plasma arterioso ombelicale. Questo aumento di concentrazione, solo a livello fetale, suggerisce che il trasporto di aminoacidi e il metabolismo feto/placentare, in donne affette da GDM, risulta alterato. [30] Altro studio, risalente al 1973, si è invece approcciato all'aspetto più cinetico dell'argomento avvalendosi di frammenti di tessuto villosa provenienti da placenta umana rilevando come il tessuto placentare presenti il potenziale per aumentare notevolmente la sua capacità di concentrare gli aminoacidi in risposta a stimoli ambientali. [31]

Nel 1974, invece, son stati studiati l'assorbimento, l'accumulo di tessuto e il rilascio relativi a 10 aminoacidi a partire da fettine di placenta umana. [32] Son state rilevate discrepanze di comportamento tra i singoli aminoacidi: ad esempio, l'assorbimento di glutammato, aspartato e serina è stato rapido e continuo a dimostrazione di come l'efflusso sia meno efficace dell'assorbimento; di contro, l'assorbimento di lisina e arginina, quali aminoacidi basici, è stato meno rapido con, quindi, un miglior efflusso. Gli aminoacidi neutri quali alanina, glicina e prolina hanno mostrato tassi di assorbimento simili a quelli basici. La leucina ha mostrato un rapido efflusso. Con il susseguirsi degli studi, ci si è anche accorti di come l'assorbimento placentare degli aminoacidi sia regolato da aminoacidi intracellulari. [33]

Il trasporto degli aminoacidi (AAs), dunque, attraverso il trofoblasto, segue principalmente uno schema suddivisibile in tre step: 1) la membrana microvillosa assorbe gli AAs dalla circolazione materna; 2) attraversamento del citoplasma trofoblastico; 3) trasporto dal trofoblasto fino alla circolazione ombelicale passando attraverso la membrana basale.

Gli studi dimostrano, pertanto, una maggior concentrazione degli aminoacidi a livello del plasma fetale piuttosto che materno a conferma dell'esistenza di un trasporto attivo a livello placentare. Di conseguenza, son stati effettuati vari esperimenti a livello di animali quali pecore, ratti, porcellini d'India e anche sugli uomini andando ad ottenere un rapporto tra la concentrazione a livello fetale e quella a livello materno maggiore di 1.

Durante il primo trimestre, infatti, la concentrazione degli aminoacidi a livello materno è più bassa rispetto ai livelli normali di circa 20-25%; si ha infatti che tutti gli aminoacidi, eccetto il triptofano, sono presenti a livello dello spazio intervilloso con una concentrazione più elevata rispetto al sangue venoso materno e questo è in accordo con l'idea secondo cui il trasporto degli aminoacidi, tra madre e feto, segua un meccanismo di tipo attivo.

2.3.1 SISTEMI DI TRASPORTO

I sistemi di trasporto che permettono alla circolazione ombelicale di assorbire gli aminoacidi sono stati per la prima volta definiti da Christensen e Van Winkle esaminando tipi di cellule epiteliali e non epiteliali [34]. La differenziazione di questi ricade nella scelta tra sodio dipendenti o indipendenti, sul tipo di substrato e quindi di aminoacido che preferiscono: cationici, anionici o zwitterionici e sulla struttura, se monomerici o eterodimerici. Questi ultimi si presentano strutturalmente sotto forma di catena pesante, spesso un particolare tipo di glicoproteina, e una leggera.

Tuttavia, è opportuno evidenziare come, già qualche anno prima, furono condotti diversi esperimenti con il fine di scoprire quali fossero i meccanismi di trasporto placentari interessati prettamente agli aminoacidi neutri. I tre esperimenti riguardavano: l'incubazione di frammenti di tessuto villosa intatto in mezzo ossigenato chimicamente per studiare l'assorbimento delle membrane plasmatiche nello spazio intercellulare; la misurazione dell'assorbimento mediante perfusione a singolo passaggio; l'incubazione della membrana plasmatica vescicolare isolata dalle superfici materne o fetali del sinciziotrofoblasto, per studiare l'assorbimento nello spazio vescicolare. Con questi studi, infatti, si è andati a definire i sottogruppi di aminoacidi, i rispettivi sistemi di trasporto e possibili inibitori sfruttando una tecnica di incubazione e tecniche di inibizione competitiva standard. [35]

I sistemi di trasporto monomerici a livello placentare includono la famiglia degli y^+ e degli X_{AG} - mentre quelli eterodimerici includono i sistemi L e i sistemi y^+L ; si individua anche la presenza di sistemi sodio-indipendenti, sistemi Asc.

Così come ci sono dei substrati che possono essere trasportati da differenti sistemi, ci sono sistemi, come il sistema β , che possono trasportare aminoacidi appartenenti a gruppi diversi.

Per comprendere meglio i meccanismi mediati dal trasportatore, si sono anche impiegate delle vescicole di membrana plasmatica isolate dalla placenta umana [36]. Questo approccio si è basato

principalmente sull'isolamento di ciascuna delle membrane plasmatiche del trofoblasto, MVM e BM. Il vantaggio di questa tecnica è stato quello di permettere la caratterizzazione dell'attività e dell'espressione del trasportatore specifico di una membrana, indipendentemente dal processo metabolico. Lo svantaggio, di contro, consisteva nel fatto che le attività del trasportatore di membrana erano misurate in assenza di fattori regolatori e quindi non rispecchiassero puntualmente il flusso in vivo. Metodo alternativo per descrivere l'assorbimento si è basato su frammenti di tessuto villosa placentare [36] attraverso i quali veniva valutata l'attività del sistema di trasporto β presente sulla MVM. Il vantaggio di questo modello, applicabile a tutti i trasportatori sodio-dipendenti, stava nel fatto che il metabolismo del sinciziotrofoblasto era mantenuto; tuttavia, i frammenti contengono così tanti tipi di cellule che l'assorbimento di aminoacidi mediati può avvenire in diversi compartimenti.

2.3.1.1 SISTEMI DI TRASPORTO PER AMINOACIDI NEUTRI

Si distinguono in: sistema A, sistema ASC, sistema B° , sistema β , sistema L, sistema N e sistema Gly. Il primo è un sistema sodio-dipendente, unidirezionale, presente a livello della membrana microvillosa e basale; la sua attività è incrementata a seguito di un esaurimento, a livello cellulare, di alcuni substrati aminoacidici. È presente sottoforma di: ATA-1, ATA-2, ATA-3 e SA-1. Il primo predomina a livello placentare e cardiaco per il trasporto di aminoacidi neutri a catena corta come alanina, serina, metionina, asparagina e glutammina; il secondo è presente in più tipi di tessuti, tra cui quelli mammari; il terzo (attualmente definito anche SNAT-4) predomina a livello epatico e dei tessuti muscolari mentre la presenza dell'ultimo a livello placentare non è ancora stata dimostrata. La serina e la glicina sfruttano prettamente questa tipologia di trasportatori; in particolare, si è visto come l'assorbimento della serina sia maggiore rispetto a quello della glicina contrariamente alla richiesta del feto.

Il sistema ASC si occupa del trasporto di aminoacidi quali alanina, serina e cisteina; è sodio-dipendente ed è localizzato a livello della membrana basale. Si presenta sotto forma di ASCT-1 la cui presenza a livello placentare è scarsa o ASCT-2. Di contro, è stata constatata la presenza di questo sistema di trasporto a livello della placenta del ratto. A livello placentare, però, è stata riportata la presenza di un meccanismo di trasporto sodio-indipendente, Asc.

Il sistema B° , localizzato nei microvilli dei ratti e nella membrana basale umana, è responsabile del trasporto degli aminoacidi neutri. Il suo nome è abbastanza indicativo in quanto la lettera B rappresenta il tipo di substrato preferito e la lettera maiuscola la dipendenza dal sodio. Il pallino in alto, invece, sta ad indicare che questo meccanismo di trasporto è accettato dagli aminoacidi zwitterionici e neutri. Il sistema $B^{\circ,+}$ accetta anche i cationici.

Questi si differenziano dal sistema $b^{o,+}$ che trasporta aminoacidi neutri e cationici ma è sodio-indipendente.

Il sistema β è associato all'aminoacido β -taurina, presente maggiormente a livello placentare piuttosto che nel sangue materno a conferma della sua importanza per l'accrescimento del feto, ed è sodio-dipendente. È attivo sia a livello dei microvilli che delle vescicole presenti sulla membrana basale. Una minor concentrazione di taurina può essere sintomatica per l'IUGR.

Il sistema L è sodio-indipendente ed è situato al livello di entrambe le interfacce del trofoblasto. Si occupa prettamente del trasporto di aminoacidi essenziali e si presenta sotto forma di LAT-1, non influenzabile dal pH, presente a livello dei microvilli e del sinciziotrofoblasto e LAT-2 la cui attività aumenta al decrescere del pH, presente nella membrana basale. Attraverso uno studio recente condotto in ambito immunologico e farmacologico, si è però colta, in LAT-1, un'espressione proteica delle cellule tumorali; questa scoperta porterebbe dunque al risultato secondo cui, iniettando inibitori di questo trasportatore, si potrebbe conseguentemente limitare la proliferazione di cellule tumorali.¹ [37] Successivamente, sono stati individuati anche LAT-3 e LAT-4, quest'ultimo presente a livello placentare. Individuato anche un sistema L-tirosina presente in forma di sistema L o sistema T, quest'ultimo (TAT1 mRNA) in placenta. [38] Relativamente a questi, si è anche indagata, nel 2011, la relazione che potesse coesistere tra il loro funzionamento e la crescita fetale; si è misurato, pertanto, il trasferimento placentare in cinque cotiledoni placentari perfusi isolati ottenendo come i trasportatori TAT1, LAT3 e LAT4, presenti a livello della BM, svolgano un ruolo importante non solo nel trasporto di aminoacidi ma, in particolare, l'espressione mRNA di TAT1 e LAT3 ha mostrato associazioni positive con le dimensioni del bambino alla nascita. [39]

Il sistema N si differenzia dai sistemi A e ASC in quanto preferisce legarsi agli aminoacidi con catene laterali contenenti azoto come glutammina, asparagina e istidina. In ultimo, il sistema Gly è sodio dipendente ed è localizzato a livello della membrana microvillosa; si presenta come GLYT-1 presente nei tessuti periferiali e GLYT-2 a livello del sistema nervoso centrale.

2.3.1.2 SISTEMI DI TRASPORTO PER AMINOACIDI BASICI O CATIONICI

La tipologia per eccellenza che si occupa del trasporto degli aminoacidi cationici è il sistema y^+L . Caratterizzato da una bassa capacità di trasporto, è sodio-dipendente, si occupa di effettuare uno scambio tra gli aminoacidi cationici e quelli neutri ed è presente a livello dei microvilli e della membrana basale. A questo sistema è assegnato il compito di rifornire il feto di aminoacidi cationici attraverso l'assorbimento di aminoacidi neutri dalla circolazione fetale, in cambio di aminoacidi

cationici dalla placenta. Si presenta sottoforma di $y^+LAT - 1$ e $y^+LAT - 2$; solo il primo presente in placenta.

Si distingue da questo, il sistema di trasporto y^+ per la maggior capacità di trasportare aminoacidi cationici come l'arginina e la lisina e soprattutto perché sodio-indipendente. Localizzato nei microvilli, si ritiene anche che sia quello più presente a livello placentare per il trasporto degli aminoacidi cationici.

2.3.1.3 SISTEMI DI TRASPORTO PER AMINOACIDI ANIONICI O ACIDI

Per quanto concerne gli aminoacidi anionici come l'acido glutammato o l'acido aspartico, nonostante ci siano studi che sostengano l'assenza di questi a livello placentare, è stata dimostrata la presenza di un sistema di trasporto X_{AG}^- , sodio/potassio-dipendente, presente sottoforma di cinque isoforme (Trasportatori eccitatori di aminoacidi, EAAT 1-5) a livello di entrambe le interfacce del sinciziotrofoblasto. La concentrazione di questi due aminoacidi, a livello materno, è maggiore rispetto a quella fetale a conferma dell'idea secondo cui la glutammina venga assorbita dal fegato fetale e metabolizzata in glutammato, per poi essere assorbita dalla placenta. Esiste anche il sistema x_c^- che si occupa dell'ingresso della cistina e dell'uscita del glutammato.

La Tab.5 riassume i sistemi di trasporto più comuni che si individuano a livello placentare con annesso substrato preferito e codifica di proteina, ovvero in che forma si presentano.

SISTEMI DI TRASPORTO	PROTEINA	SUBSTRATO
<i>Sistemi Na⁺ dipendenti</i>		
A	SNAT(1,2,4)	Alanina, serina, prolina, glicina
ASC	ASCT(1,2)	Alanina, Serina, Cistina
N	SN1	Istidina, Asparagina, Glutamina
X_{AG}^-	EAAT(1-3)	Glutammato, Aspartato
β	TAUT	Taurina
$\beta^{\circ,+}$	GLYT1	Glicina, Sarcosina
<i>Sistemi di trasporto aminoacidi cationici</i>		
γ^+	CAT 1-4	Aminoacidi cationici
<i>Sistemi di trasporto associati a glicoproteine</i>		
asc	asc1/4F2hc	Aminoacidi neutrali piccoli e D-serina
$b^{\circ,+}$	$b^{\circ,+}/rBAT$	Aminoacidi neutrali e cationici
L	LAT1,LAT2/4F2hc	Aminoacidi neutrali, triptofano, aminoacidi a catena ramificata
γ^+L	$\gamma^+LAT1/4F2hc$	Aminoacidi cationici
x_c^-	xCT/4F2hc	Scambio glutammato/cistina
T	TAT1	Aminoacidi aromatici

Tabella 5: Sistemi di trasporto

I sistemi di trasporto, descritti in Tab.5, possono a loro volta essere classificati in: accumulatori o scambiatori di aminoacidi [40], Tab.6. I primi mediano l'influsso degli aminoacidi per incentivare l'aumento di concentrazione; gli altri, scambiano di posizione un aminoacido presente al di fuori della cellula con uno presente all'interno senza variare del tutto la concentrazione ma alterando solo la composizione degli stessi a livello cellulare. Questo è importante per la cellula in quanto le permette il riassorbimento di alcuni aminoacidi essenziali, poco presenti, senza apporre modifiche in termini di concentrazione. Si vedrà, di seguito, come tra i sistemi di trasporto se ne annovera una nuova tipologia, facilitati; questi mediano il trasporto bidirezionale. A differenza dei precedenti, sono prettamente presenti a livello della BM dove mediano l'efflusso netto di alcuni aminoacidi contro gradiente. [39]

Tabella 6: Meccanismi di trasporto aminoacidi a livello placentare

SISTEMA	POSIZIONE	MECCANISMO
A	Membrana microvillosa e sinciziotrofoblasto	Na^+ /AA cotrasporto
$X \overline{AG}$	Membrana microvillosa e sinciziotrofoblasto	$3Na^+/1H^+$ /AA-cotrasporto/ $1K^+$ -scambiatore
y^+	Membrana microvillosa e sinciziotrofoblasto	Uniporto
asc	Sinciziotrofoblasto	Scambiatore; Na^+ -dipendente scambiatore
$b^{\circ,+}$	Membrana microvillosa	Scambiatore
L	Membrana microvillosa e sinciziotrofoblasto	Scambiatore
y^+L	Membrana microvillosa e sinciziotrofoblasto	Na^+ - dipendente scambiatore
T		Diffusione facilitata

2.4 PATOLOGIE FETALI

2.4.1 IL RITARDO DI CRESCITA INTRAUTERINO (IUGR)

Il ritardo di crescita intrauterino (IUGR: intra uterine growth restriction) è una patologia, diagnosticata durante la gravidanza indicante un ritardo di crescita del feto o una crescita costante, ma minima, dello stesso.

Inizialmente i feti IUGR erano associati ai feti SGA (Small for Gestational Age); questo ultimo termine venne introdotto nel 1963 da parte di Gruenwald il quale considerò “neonati piccoli per l’età gestazionale” i bambini il cui peso si discostava di 2 deviazioni standard dal peso medio per l’età gestazionale. [40] Successivamente, lo studioso Lubchenco, coadiuvato da ostetrici e pediatri, si è discostato da quello che si era ritenuto fino a quel momento andando a riconoscere la presenza di un gruppo di neonati che non raggiungevano il loro potenziale di crescita e che questo comportasse un aumento della morbidità perinatale e mortalità infantile. [41] Egli, inoltre, si avvale dei percentili piuttosto che delle deviazioni standard definendo “neonati piccoli per l’epoca gestazionale” i bambini il cui peso alla nascita fosse inferiore al decimo percentile della popolazione normale. [42] Il decimo percentile è risultato essere il parametro che meglio coniuga sensibilità e specificità. Con il passare degli anni, son state introdotte nuove misure al fine di classificare i feti con ritardo intrauterino; in particolare, la circonferenza addominale risulta essere il parametro migliore per valutare l'accrescimento durante la gravidanza. [43] Si sottolinea che alcuni neonati piccoli per l’età gestazionale possono risultare costituzionalmente piccoli ma non presentare le caratteristiche attribuibili al ritardo di crescita intrauterino. Questo perché, attraverso delle curve standard di crescita fetale, Fig. 36, si è dimostrato come la crescita possa essere influenzata anche da fattori come razza, sesso, ambiente socioeconomico ed altitudine. Attualmente, in virtù della standardizzazione, si sta cercando di avvalersi di un’unica curva standard, comune a tutte le aree geografiche. Le curve, come quella mostrata, permettono di differenziare i feti piccoli costituzionalmente da quelli patologici e, pertanto, di migliorare l’efficienza della diagnosi.

È opportuno evidenziare come un feto IUGR possa essere o meno SGA; caso contrario non rilevato. La differenza tra un feto SGA ed uno IUGR sta nel fatto che, nel primo caso, attraverso una singola misura è possibile individuare l’anomalia mentre, nel caso di interesse, sono richieste più misure nel corso della gravidanza. In particolare, la patologia SGA risulta essere una condizione prettamente post-natale rispetto alla IUGR che si presenta come processo fisiopatologico che avviene in utero ed inibisce la crescita fetale. Inoltre, il termine SGA è associato ad una crescita fetale non influenzata dalla funzionalità placentare che, anzi, risulta essere normale; cosa che non si verifica nel caso IUGR.

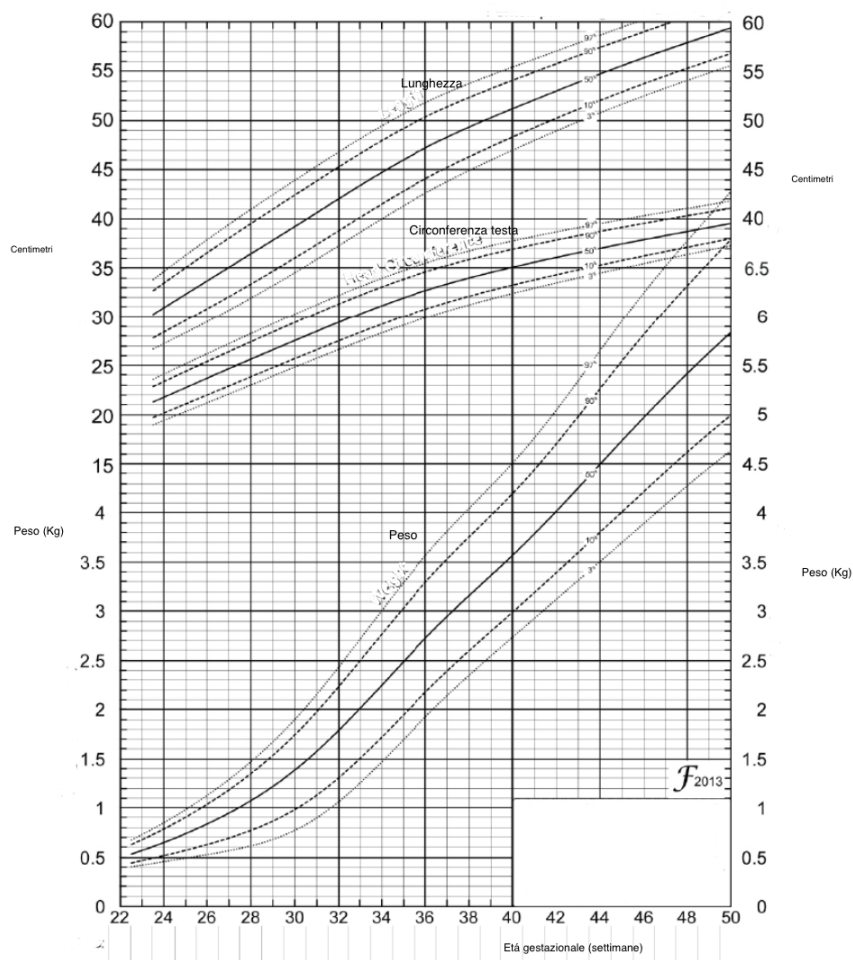


Figura 36: Curve di crescita

2.4.1.1 CAUSE

Il ritardo di crescita intrauterino risulta essere non una entità patologica assestante ma coniuga, invece, la manifestazione di possibili disturbi sia fetali che materni.

Le cause attribuibili a questa patologia coinvolgono aspetti prettamente materni ma anche placentari e fetali, non indipendenti tra di loro. Le prime possono riguardare: età materna avanzata, patologie croniche (diabete, disordini ipertensivi, patologie renali, ipertiroidismo, patologie cardiache, pre-eclampsia), obesità, deficit nutrizionali da parte del sistema materno-placentare, riscontrabili durante la fine della gravidanza, per via di patologie placentari o per lo stile di vita materno (fumo, alcool, esposizione ad agenti chimici, uso di chemioterapici etc.), assunzione di farmaci.

Tra le cause fetali rientrano: le gravidanze gemellari ma anche anomalie cromosomiche e genetiche. In particolare, l'aneuploidia, variazione del numero di cromosomi rispetto a quello che normalmente caratterizza le cellule [42], colpisce circa il 5-20% dei feti IUGR; la correlazione è stata dimostrata dagli studi di Snijders. Si annoverano anche infezioni virali (rosolia, herpes, HIV), batteriche,

protozoarie o quelle causate da spirochete. Le anomalie più comunemente associate sono la trisomia 18 e l'anencefalia.

Le alterazioni placentari, tuttavia, rappresentano un fattore di notevole rilevanza. Infatti, un'alterazione nella successione degli step che portano alla formazione della placenta, potrebbe causare una riduzione degli scambi gassosi e del rifornimento nutrizionale al feto. L'insufficienza placentare può anche essere legata alla ridotta capillarità. [44] Patologie vascolari materni, infatti, con annessa riduzione della perfusione uteroplacentare rappresentano una delle cause più comuni. Infatti, è stato provato, confrontando i tessuti placentari, che le madri affette da ipertensione, sono maggiormente a rischio; conseguentemente, il rischio di verifica di infarto placentare risulta essere maggiore. Questo a dimostrazione di come, un'alterazione della circolazione materna e intervillosa sia una delle cause scatenanti. Rientrano anche condizioni legate alla morfologia placentare come la placenta bilobata o la placenta piccola. La restrizione di crescita fetale potrebbe essere correlata a condizioni definite "mosaicismo intraplacentare": condizione rilevabile tramite un esame dei villi coriali durante il primo trimestre che mostra linee cellulari normali associate a quelle di cariotipo alterato.

Si stima che la patologia, in Italia, interessi circa il 7% della popolazione e sia una delle principali fonti di morbilità e mortalità perinatale.

2.4.1.2 CLASSIFICAZIONE

In virtù del momento in cui la patologia insorge, analizzando la scala temporale delle varie fasi di gestazione, si differenziano casi di IUGR simmetrico e casi di IUGR asimmetrico.

Quello simmetrico, detto anche proporzionato o precoce, è caratterizzato da un ritmo di crescita sempre al di sotto della norma andando a penalizzare tutti i parametri biometrici. Dovuto ad infezioni congenite, patologie genetiche ma anche da anomalie del flusso arterioso ombelicale ed uterino. Potrebbe causare la morte del feto. Caratterizzato da una bassa incidenza.

Quello asimmetrico o sproporzionato, tardivo, è invece associato ad un difetto di crescita che interviene dopo la ventesima settimana di gestazione; generalmente associato ad una insufficienza utero-placentare e ad asimmetria durante la crescita; può presentare una flussimetria delle arterie uterine alterata. [45]

Nei feti simmetrici sono influenzate, dunque, le dimensioni e il peso; nei feti asimmetrici, di contro, è inibita la crescita muscolare e la formazione di grasso.

2.4.1.3 DIAGNOSI E MONITORAGGIO

Inizialmente, l'unico metodo diagnostico in grado di rilevare la patologia era la valutazione ecografica in quanto offriva stime precise sul peso fetale e permetteva anche di seguire gli intervalli di crescita e conseguentemente di poter procedere con la classificazione. Le variabili standard che occorre tenere in considerazione sono la circonferenza addominale, la circonferenza della testa, il diametro biparietale e la lunghezza del femore; questi vengono poi, attraverso delle formule, relazionati al peso fetale. Tuttavia, l'esame ecografico non permette la distinzione tra feto SGR e feto IUGR. Occorre procedere con analisi relative al volume del liquido amniotico (riduzione di questo è un indice importante) ed esami seriali utili per monitorare la crescita come velocimetria Doppler, test da sforzo di contrazione, profili biofisici e misurazione dell'altezza sinfisi-fondale. [46] Viene anche eseguita la palpazione addominale con le manovre di Leopold ma la sua capacità diagnostica è limitata pertanto viene eseguita prima di qualsiasi altro esame al fine di avanzare l'ipotesi relativa al basso peso. Risulta essere utile anche eseguire una ultrasonografia tridimensionale assistita da computer al fine di incrementare la precisione diagnostica nello stimare eventuali malformazioni.

Nel 2013, in Irlanda, è stato condotto uno studio, denominato Prospective Observational Trial to Optimize Pediatric Health in Intrauterine Growth Restriction (PORTO Study), con l'obiettivo di valutare quali risultati ecografici fossero associati alla morbidità e alla mortalità perinatale nelle gravidanze affette dalla patologia. Si è concluso che un esame Doppler anomale dell'arteria ombelicale e un peso stimato fetale minore del terzo percentile fossero associati ad avversità perinatali. [47]

Il Congresso Delphi 2016 ha stabilito quelli che sono i parametri standard relativi al peso del feto alla nascita e alla circonferenza addominale che permettono la classificazione del feto.

Per il feto SGA si è dinanzi ad una circonferenza addominale compresa tra il quinto e il decimo centile, curva di crescita regolare, liquido amniotico regolare e dopplerflussimetria arterie uterine ed ombelicali nella norma; per il feto IUGR si ha una circonferenza addominale minore del quinto centile, una curva di crescita in flessione, liquido amniotico ridotto e dopplerflussimetria arterie uterine ed ombelicali patologiche. [48] Secondo le norme contenute nel lavoro di studio TRUFFLE (studio europeo pubblicato il 5 marzo 2015 sulla rivista Lancet al fine di valutare quali fossero i migliori indicatori per il parto nei feti di basso peso affetti da IUGR [49]), è necessario che la valutazione circa la biometria fetale venga eseguita in un intervallo di almeno due settimane. In questo studio, son stati distinti markers cronici come l'arteria ombelicale, l'arteria cerebrale media e markers acuti come la cardiocografia e il dotto venoso. La biometria addominale risulta essere un importante parametri di riferimento: un feto circonferenza addominale inferiore al decimo percentile o con una diminuzione di oltre 40 percentili rispetto al controllo precedente, indica una crescita rallentata.

Pertanto, il percorso diagnostico include esame ecografico, biometria fetale, dopplerflussimetria delle arterie ombelicali, uterine e del dotto venoso. In quest'ultimo, infatti, si evidenzia un aumento dell'indice di pulsatilità delle arterie ombelicali con riduzione rapporto cerebro-placentare e successiva comparsa di assenza di flusso in diastole. Ne segue la comparsa del flusso reverse a livello delle arterie ombelicali e un aumento dell'indice di pulsatilità nel dotto venoso.

In virtù dell'insorgenza della patologia durante le diverse età gestazionali, il monitoraggio tende a variare. Si differenziano infatti tre gruppi di feti: fino a 26 settimane, da 26 a 32 settimane e oltre 32 settimane. La Fig. 37 mostra il confronto relativo all'esame di dopplerflussimetria normale e patologico delle arterie uterine ad indicare l'aumento di resistenza. Nei feti sani, il picco di flusso indica la sistole; nei feti patologici, il picco sistolico risulta essere più alto. La Fig. 38 mostra lo stesso esame condotto sulle arterie ombelicali.

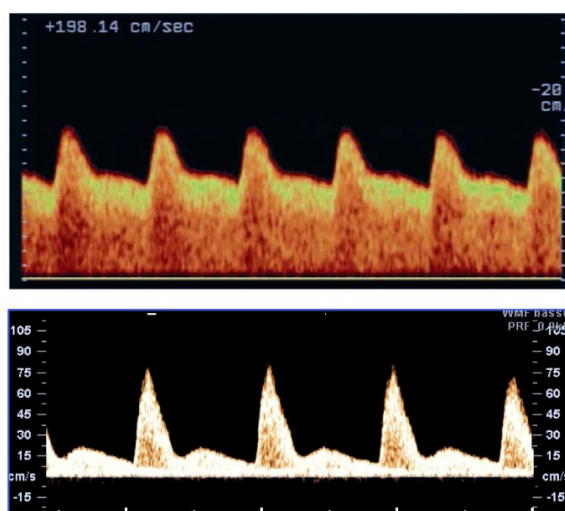


Figura 37: Dopplerflussimetria arterie uterine: in alto sani, in basso patologici

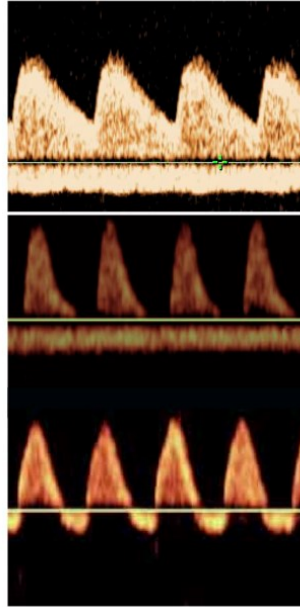


Figura 38: Dopplerflussimetria arteria ombelicale, in alto sani e in basso patologici

2.4.1.4 IL TRASPORTO DI AMINOACIDI IN GRAVIDANZE IUGR

L'insufficienza placentare rappresenta una delle cause del ritardo di crescita intrauterino in quanto determina quelli che sono i difetti nella circolazione e nel trasporto di nutrienti che vanno ad inficiare sulla crescita del feto stesso. Diversi modelli su animali hanno infatti dimostrato come la crescita fetale venga compromessa se rimossa una metà della massa placentare questo perché, sempre su modelli animali, si è riscontrato come il peso placentare sia ridotto del 24% rispetto a quello di un feto cresciuto normalmente.

Si è visto come, in gravidanze sane, la placenta media lo scambio dei nutrienti assicurando crescita e sviluppo fetali. Il trasporto, come ampiamente analizzato, avviene a livello del sinciziotrofoblasto il quale, a sua volta, presenta due membrane: una diretta verso lo spazio microvilloso, membrana microvillosa (MVM) e una membrana basale (BM) diretta verso i capillari fetali. Il trasporto può essere influenzato dal flusso sanguigno, dai gradienti di concentrazione, spessore e area di scambio. Mentre ossigeno e anidride carbonica sono permeabili alla membrana e il loro trasporto dipende molto dal flusso sanguigno, gli aminoacidi, essendo impermeabili, si affidano a proteine trasportatrici tipiche di ogni membrana e classificabili in base al substrato, omologia di sequenza e funzione fisiologica. Gli acidi grassi attraversano la placenta in un processo che consta di più fasi e vede come attive alcune lipoproteine lipasi. Il glucosio viene trasportato tramite le sue tipiche proteine trasportatrici GLUT; si rileva un aumento della concentrazione di glucosio a livello materno piuttosto che fetale.

A livello della placenta IUGR, tutte queste funzioni appena descritte sono alterate per via di cause ambientali, materne e fetali come l'alta quota, la giovane età, la denutrizione, il fumo, l'uso di droghe e le malformazioni congenite. Anche fattori esterni come il livello di ossigeno, le specie reattive all'ossigeno, l'insulina, la leptina e l'angiotensina II limitano il trasporto.

Ancora oggi, ci si chiede se la riduzione del trasporto placentare di aminoacidi sia una conseguenza della patologia o un suo fattore di causa. Valutare la riduzione del trasporto degli amminoacidi negli umani, da sempre, è risultato abbastanza complicato; per questo motivo, in passato, si è proceduto andando a testare vari modelli animali o andando ad effettuare degli studi in vitro.

Successivamente, in alcuni casi, è stato possibile confrontare i risultati sugli umani potendo, conseguentemente, confrontare i dati ricavati con quelli dei precedenti modelli. Ad esempio, è risultato, negli umani, contrariamente agli animali che, uno stato ipometabolico all'interno del feto, in caso di ipossia, funge da meccanismo di difesa nei confronti della riduzione della concentrazione degli amminoacidi essenziali, andando a mantenere costanti le concentrazioni di questi. In generale, secondo quanto detto, e data anche l'importanza che riveste il flusso sanguigno, studi attuali cercano sempre di più di studiare l'interdipendenza che vi è tra la riduzione della concentrazione dell'ossigeno e degli amminoacidi. [50]

I primi studi relativi alle disfunzioni placentari sono stati condotti sfruttando il cosiddetto "esperimento naturale" rappresentato dalla carestia olandese, periodo di carestia durato circa sei mesi negli anni della Seconda Guerra Mondiale nelle province occidentali dei Paesi Bassi. Analizzando le gravidanze in quel periodo, fu dimostrato come la denutrizione materna inibisse la crescita placentare. Si rilevi come, ancora oggi, nei Paesi industrializzati dove le famiglie di basso reddito vivono una situazione di insicurezza alimentare, questo problema risulta essere di primaria importanza. Una denutrizione materna, di conseguenza, va ad inficiare la crescita placentare. Purtroppo, non essendo disponibili dati relativi al trasporto placentare in gravidanze caratterizzate da denutrizione materna, le informazioni sono state fornite da modelli animali. In particolare, in un modello di babbuino, il peso placentare e fetale son risultati ridotti come anche l'espressione dei meccanismi di trasporto quali quelli del glucosio e della taurina (GLUT1, TAUT, SNAT2, LAT1 e LAT2), del sistema A a livello della MVM e del sistema L andando conseguentemente a ridurre la concentrazione degli aminoacidi fetali. In particolare, l'attività del sistema A a livello MVM risulta più bassa ed è anche correlata alla gravità della patologia. I feti IUGR a termine sono meno colpiti rispetto a quelli pretermine. [51] [52] Studi condotti su modelli ovini, invece, hanno riscontrato una diminuzione del flusso uteroplacentare della leucina e di treonina.

Come affermato in precedenza, dati relativi al trasporto placentare umano scarseggiano; per tale motivo, son stati condotti studi in vitro partendo da vescicole ottenute da placente IUGR. È stato

riportato un ridotto assorbimento di leucina e lisina indicante una riduzione dell'attività dei trasportatori di aminoacidi neutri e cationici a livello MVM; ma anche di taurina e quindi riduzione del suo sistema di trasporto β e del sistema A. [53]

Secondo quanto riportato in precedenza, l'IUGR potrebbe essere correlato alla pre-eclampsia; essendo entrambe le patologie caratterizzate da un rimodellamento anormale delle arterie materne, si è indagata l'attività del sistema di trasporto A in due sottogruppi di gravidanze: IUGR e pre-eclampsia, IUGR senza pre-eclampsia ottenendo risultati significativamente distinti in quanto, solo nel secondo caso si è assistito ad una riduzione dell'assorbimento placentare di amminoacidi. [54] Il sistema A risulta, dai vari studi, essere quello più compromesso. Infatti, studi condotti sui babbuini, hanno riscontrato una variazione dell'attività del sistema A a livello MVM; contemporaneamente si è vista una diminuzione della concentrazione fetale della leucina e dell'isoleucina. Questi amminoacidi, di contro, non sfruttano il sistema A ma il sistema L e questo potrebbe dimostrare una correlazione tra i due meccanismi. [55] Seguono i sistemi di trasporto per la taurina, leucina e fenilalanina.

Tutti gli studi, in generale, convergono all'idea secondo cui la riduzione del flusso sanguigno placentare determini l'insufficienza placentare stessa e quindi il mancato trasporto; i motivi di questa correlazione, non sono ancora del tutto chiari. In particolare, si è anche pensato che la placenta percependo la diminuzione del flusso, risponda a questo con una down-regulation dei meccanismi di trasporto causando la IUGR. [56]

2.4.2 IL DIABETE MELLITO GESTAZIONALE (GDM)

Il diabete mellito gestazionale è il diabete diagnosticato per la prima volta in gravidanza e che comprende sia forme diabetiche la cui insorgenza è avvenuta in gravidanza, sia forme precedenti non diagnosticate. È una condizione non così infrequente nelle donne gravide, se ne stima la presenza nel 7-8% di tutte le gravidanze. Si tratta di una condizione che fa considerare la gravidanza "a rischio" per una maggior frequenza di complicanze materno-fetali e richiede pertanto che la donna si attenga scrupolosamente a un dato stile di vita e che sia costantemente sotto controllo medico. [58] Con il termine di diabete mellito gestazionale (*gestational diabetes mellitus*, GDM) si definisce un disordine della regolazione del glucosio di entità variabile, che inizia o viene diagnosticata per la prima volta in gravidanza e, nella maggior parte dei casi, si risolve non molto tempo dopo il parto, pur potendo ripresentarsi a distanza di anni come diabete di tipo 2. [23]

È dovuto, nella maggior parte dei casi, ad una incapacità delle beta cellule pancreatiche di sopperire, attraverso un adeguato aumento della secrezione insulinica, alla fisiologica insulino-resistenza indotta dagli ormoni dell'unità feto-placentare.

Le complicanze fetali più frequenti nel diabete mellito gestazionale sono: la morte intrauterina, la macrosomia, la sindrome da distress respiratorio, l'ipoglicemia neonatale, l'iperbilirubinemia, l'ipocalcemia e l'ipomagnesemia. Le complicanze materne, di contro, riguardano un aumento dell'incidenza di tagli cesarei, di ipertensione, di parto pretermine e di infezioni genito-urinarie. La morte intrauterina rappresenta purtroppo la complicanza più pericolosa; l'evento è frequente dopo la 36esima settimana.

2.4.2.1 DIAGNOSI

In Italia, da decenni ormai, è presente un acceso dibattito relativo alla corretta strategia da adottare per diagnosticare la patologia. Dal 2011, si seguono le Linee Guida Ministeriali sulla Gravidanza Fisiologica elaborate dal Sistema Nazionale Linee Guida (SNLG), dall'Istituto Superiore di Sanità (IIS), dall'Associazione Medici Diabetologici (AMD) e dalla Società Italiana di Diabetologia (SID). [59] La prima visita che viene condotta su donne gravide prevede la determinazione della glicemia plasmatica al fine di identificare casi di diabete già esistente. Infatti, in caso di riscontro relativo alla glicemia plasmatica a digiuno ≥ 126 mg/dL o di una glicemia plasmatica random ≥ 200 mg/dL, viene diagnosticato il diabete pregravidico. Inoltre, è raccomandato lo screening per il diabete gestazionale per le pazienti le quali, a 16-18 settimane di età gestazionale, presentano una di queste condizioni: diabete gestazionale in gravidanza precedente, indice di massa corporea pregravidico (IMC) ≥ 30 kg/m², riscontro precedente di valori di glicemia plasmatica compresi fra 100 e 125 mg/dL. Lo screening prevede una curva di carico con 75g di glucosio (OGTT 75g) e un ulteriore

OGTT 75g a 28 settimane di età gestazionale, se la precedente è risultata normale. Viene diagnosticato il diabete gestazionale a donne con valori di glicemia plasmatica relativi a quelli presenti in Tab. 7.

Tabella 7: Livelli decisionali per la diagnosi di diabete mellito gestazionale mediante curva di carico orale con 75g di glucosio

<i>Glicemia Plasmatica</i>	mg/dL	mmol/L
A digiuno	≥ 92	$\geq 5,1$
Dopo 1 ora	≥ 180	$\geq 10,0$
Dopo 2 ore	≥ 153	$\geq 8,5$

Lo screening, di contro, può anche essere condotto durante il periodo 24-28 settimane di età gestazionale alle donne che presentano almeno una di queste condizioni: età ≥ 35 anni, IMC pregravidico $\geq 25\text{kg/m}^2$, macrosomia fetale in gravidanze precedenti, diabete gestazionale in gravidanza precedente, anamnesi familiare di diabete, famiglia originaria di aree ad alta prevalenza di diabete (Asia meridionale, Caraibi, Medio Oriente, Egitto). Anche in questo caso, ci sia avvale di un OGTT 75g. [60] [61] Sono previsti anche altri esami di laboratorio come: il dosaggio dell'emoglobina glicata (HbA1c), la valutazione della funzionalità renale, il livello di chetoni urinari o ematici.

2.4.2.2 MONITORAGGIO

In caso di diagnosi, la prima fase prevede un approccio di tipo educativo al fine di impostare un nuovo stile di vita che preveda un'alimentazione corretta ma anche un sano esercizio fisico. La paziente viene anche informata di tutte le possibili complicanze che possono insorgere durante il periodo di gravidanza in modo che riesca a fronteggiarle nel migliore dei modi. Successivamente, si procede con l'automonitoraggio glicemico; alle pazienti viene insegnato come effettuarlo tramite strisce reattive e reflattometri al fine di poter correttamente valutare la glicemia e riportare i valori nell'apposito diario. A ciò si aggiungono i comportamenti (alimentazione, somministrazione di insulina) che aiutano la paziente a mantenere in equilibrio i valori; tutto ciò risulta essere fondamentale per una corretta crescita del feto. Particolare attenzione deve essere posta alle escursioni glicemiche post-prandiali, a un'ora dal pasto, che possono influenzare la crescita fetale. Per il monitoraggio, è utile anche il controllo della pressione arteriosa in quanto, in donne GDM, è sovente

il rischio di sviluppare ipertensione. Segue, ovviamente, un controllo del peso ed uno ecografico in quanto, un aumento del peso è indice di un corretto metabolismo. [62]

2.4.2.3 IL TRASPORTO DI AMINOACIDI IN GRAVIDANZE GDM

La correlazione tra le sostanze nutritive, quali gli aminoacidi, e il rischio di obesità, insulino-resistenza e diabete gestazionale, è stato scoperto all'incirca 40 anni fa. Al momento, la diatriba è relativa al ruolo che gli aminoacidi possono avere come biomarcatori precoci circa lo sviluppo del diabete mellito gestazionale. Alcuni studi, infatti, hanno mostrato alcune alterazioni circa le concentrazioni dei rispettivi aminoacidi quali isoleucina, leucina, alanina e fenilalanina; questi risultavano aumentati durante il primo trimestre di gravidanze in pazienti che hanno poi ricevuto una diagnosi positiva di GDM. Altri, invece, coinvolgendo donne con indici di massa corporea eterogenei, hanno mostrato l'insorgenza del GDM associata ad un aumento di concentrazione di alanina e valina ma non di aminoacidi a catena ramificata. Alla luce di tutto questo, è comprensibile il motivo per cui, tra i test che vengono condotti durante una gravidanza, rientra anche la misurazione degli aminoacidi. Si noti come, alcuni aminoacidi come leucina, isoleucina, tirosina, triptofano, fenilalanina ed alanina son risultati essere predittori anche dello sviluppo del diabete di tipo 2. Infatti, è stato dimostrato come il passaggio al diabete di tipo 2 sia legato ad un aumento di alanina. [63] Altri studi, invece, analizzando il liquido amniotico hanno riscontrato direttamente un aumento di concentrazione relativamente a glicina, glutammina, istidina, lisina, fenilalanina, triptofano ed arginina. [64] Relativamente ai vari meccanismi di trasporto analizzati in precedenza, uno studio condotto nel 2002 ha mostrato come il trasporto degli aminoacidi mediato dal sistema A sia marcatamente aumentato in associazione con le gravidanze GDM. Come ampiamente evidenziato, gli aminoacidi coinvolti sono alanina, serina e glutammina. Questo si traduce in un aumento dell'assorbimento di aminoacidi a livello della MVM. Nonostante questo, il sistema di trasporto A risulta essere, tra tutti, quello più influenzato da fattori ormonali e non; questo, a dimostrazione di quanto, la sua variazione di attività sia il risultato di un preciso e definito processo metabolico che interessa le gravidanze patologiche. Si rileva che, contemporaneamente a questa variazione, anche i trasportatori del glucosio risultano subire delle anomalie rispetto alle gravidanze sane. [65]

3. MODELLIZZAZIONE DEL TRASPORTO DEGLI AMINOACIDI NEL SISTEMA MADRE-FETO

Compresa, dunque, la rilevanza del trasporto di sostanze e in particolare di aminoacidi che si verifica a livello placentare tra madre e feto, nel corso degli ultimi anni numerosi gruppi di ricerca hanno cercato di introdurre diversi modelli computazionali per poter comprendere come i vari sistemi di trasporto, precedentemente citati, cooperino per permettere l'accrescimento del feto e il suo sostentamento. Questi studi, si noti, non hanno solo lo scopo esplicativo ma a questo se ne affianca anche uno diagnostico in quanto, comprendere il funzionamento alla base dello scambio di nutrienti, permetterebbe al clinico di poter predire eventuali patologie, nel caso in cui il sistema non lavori come dovrebbe, come IUGR (intra-uterine growth restriction).

I protagonisti di questo scambio sono 15 o più trasportatori e 20 aminoacidi, essenziali o meno.

Per giungere al feto, gli aminoacidi, come già analizzato, dovrebbero prima attraversare la membrana microvillosa a livello dell'interfaccia materna (MVM), e successivamente il sinciziotrofoblasto per poi poter facilmente diffondere nel tessuto connettivo e nell'endotelio fetale, in particolare nella membrana basale (BM) per arrivare al sangue fetale. Segue un aumento di concentrazione di aminoacidi a livello del plasma fetale, indice del meccanismo di trasporto attivo. Diversi studi hanno evidenziato la presenza, a livello placentare, di un altro meccanismo di trasporto quale diffusione paracellulare.

Nel corso degli anni, infatti, differenti gruppi di studio hanno tentato di approcciarsi, sempre con scopi diversi e soprattutto traendo da quanto già ottenuto, alla modellizzazione computazionale del trasporto placentare.

3.1 REVISIONE DELLA LETTERATURA SUI MODELLI COMPUTAZIONALI, JANE K. CLEAL (2018)

Uno studio del 2018, condotto da Jane K. Cleal et al., ha cercato di riassumere quanto svolto al fine di poter evidenziare quelli che dovrebbero essere i nuovi punti di partenza della ricerca. [66] In particolare, come si analizzerà dettagliatamente, ogni modello ha cercato inizialmente di studiare il meccanismo con un'ottica semplicistica per poi, successivamente, integrare quanto ottenuto a dimostrazione di quello che è il vero sistema complesso che opera a livello placentare. In questa revisione della letteratura, infatti, gli studiosi si sono soffermati sulla rilevanza che hanno tutti quei fattori (flusso sanguigno e metabolismo) che possono limitare la velocità di trasferimento e la disponibilità del substrato. Tutto questo per sottolineare quanto ora il focus debba concentrarsi sull'interdipendenza di tutti i processi. La modellizzazione computazionale fornisce uno strumento

utile e valido per interrogare la complessa attività del sistema; risulta utile quando si basa su dati sperimentali facendo previsioni su esperimenti futuri. Un modello può esser infatti considerato valido nel momento in cui riesce ad adattare i dati sperimentali a una gamma di diverse condizioni sperimentali; in caso contrario, avrebbe comunque uno scopo informativo. In Tab.8, sono delineati i parametri tipici, individuati nella revisione, di un modello compartimentale includendo anche le differenze arterovenose materne e fetali. Gli studiosi hanno evidenziato come, un modello con parametri non noti, sia limitato.

Presupposto per intraprendere la progettazione del modello è quello di considerare i compartimenti ben mescolati considerando anche le scale temporali che interessano il processo studiato. Si è inoltre assunto, nel corso degli anni, il modello di trasporto tipo “carrier”. Modelli attuali non riflettono ancora la regolazione ormonale o di feedback. L’obiettivo attuale della ricerca è quello di sviluppare una placenta virtuale come parte di una madre e di un feto virtuali. La placenta dunque, si è visto, come abbia una struttura ben complessa e come numerose caratteristiche quali flusso sanguigno, superficie di scambio, distanza su cui avviene la diffusione etc. possano influenzare la sua attività di trasporto.

Un punto di partenza che interessa il trasporto degli aminoacidi parte dalla dimensione della placenta stessa e dalla superficie della MVM. Studi passati, infatti, effettuati sul topo knockout P0 hanno rilevato come una placenta piccola sia limitante; questi, di conseguenza, per sopperire alla dimensione, hanno aumentato l’attività del trasportatore. Nonostante ciò, con il progredire della gestazione, si è assistito ad una restrizione della crescita fetale sottolineando come, giunti ad un valore soglia, l’attività sola del trasportatore, seppur elevata, non basti più. Anche l’intervento del flusso sanguigno può limitare il trasporto di aminoacidi: un basso flusso sanguigno o una miscelazione inefficiente può comportare la formazione di regioni a bassa concentrazione nello spazio intervilloso. Di contro, attraverso altri studi risalenti al 2016, si è visto come il flusso materno e fetale non fossero limitanti per il trasferimento; tuttavia, a basse concentrazioni di substrato, è stato dimostrato che il flusso materno limiti l’assorbimento, indicando dunque l’interdipendenza tra flusso e disponibilità del substrato stesso. Per quanto riguarda l’influenza sulla velocità del trasporto, ci son poche prove che dimostrano quanto il trasferimento avvenga rapidamente e che quindi la diffusione non influenzi la velocità. Il trasferimento è inoltre suscettibile alla diffusione paracellulare per via dell’elevata concentrazione fetale; i tassi di perfusione paracellulare nelle placente sane sono abbastanza costanti, cosa che non si verifica in stati di malattia.

L’attività del singolo trasportatore dipende dalla concentrazione totale di aminoacidi disponibili per il trasporto e dalle concentrazioni relative. Il metabolismo può dunque influenzare il trasferimento agendo sulle concentrazioni. Parlare in generale di metabolismo è limitativo: anche il metabolismo

fetale e materno possono influenzare le concentrazioni nel plasma. Ad esempio, il consumo fetale di aminoacidi aumenta il gradiente materno-fetale, incrementando di conseguenza la richiesta; la sintesi proteica placentare riduce il pool di aminoacidi disponibili per il trasporto mentre la scomposizione delle proteine ne aumenta la disponibilità. Infatti, studi passati hanno riscontrato come non sia possibile modellizzare il trasporto senza tener conto del metabolismo; questo perché gli aminoacidi non vengono subito resi disponibili per il feto ma è necessario attendere il riciclo della proteina.

Dato lo scopo diagnostico e predittivo del perché è opportuno modellizzare la placenta, sono in fase di sviluppo nuove tecnologie, che forniscono farmaci mirati, o terapia genica; gli interventi, dunque, devono mirare agli aspetti della funzione placentare che limitano la crescita. L'identificazione di questi processi non è sempre facile: potrebbero essere necessari approcci di medicina personalizzata basati su fenotipi placentari.

Tabella 8: Parametri tipici adottati per la modellizzazione del trasporto placentare

PARAMETRI	COMPARTIMENTO	ORIGINE DA CUI VENGONO DETERMINATI I VALORI
<i>Volume del compartimento</i>	Spazio intervilloso; placenta; volume dei capillari fetali	Letteratura o esperimenti
<i>Tasso di flusso</i>	Arteria materna e fetale	Design sperimentale
<i>Concentrazione iniziale del substrato</i>	Spazio intervilloso materno e capillari fetali	Uguale al tampone di perfusione iniziale
<i>Concentrazione dell'input arterioso</i>	Arteria materna e fetale	Design sperimentale
<i>Tipo di trasporto</i>	Madre ↔ Placenta; Placenta ↔ Feto	Determinati da modelli basati su dati sperimentali
<i>Tasso metabolico</i>	Tessuto placentare	Predetti da modelli basati su dati sperimentali
<i>Diffusione paracellulare</i>	Madre ↔ Feto	Misure sperimentali

I presupposti di partenza degli studi riguardano quello che è il percorso che l'aminoacido deve seguire ovvero attraversare, come ampiamente già definito, la membrana microvillosa a livello dell'interfaccia materna, il sinciziotrofoblasto per poter diffondere facilmente nel tessuto connettivo e l'endotelio fetale fino ad arrivare al sangue fetale; inoltre, i vari studi hanno avuto pensiero comune circa la classificazione dei meccanismi di trasporto in: accumulatori, scambiatori, facilitatori.

3.2 STUDIO J.K. CLEAL, R.M.LEWIS

Uno dei primi studi risale al 2008 e fu condotto da J.K.Cleal e R.M.Lewis i quali proposero, come mostrato in Fig.40, un meccanismo di trasporto a livello del quale, inizialmente, gli aminoacidi aa1, presenti nel sangue materno, attraverso delle proteine trasportatrici, raggiungono la parte apicale della placenta, il sinciziotrofoblasto, all'interno del quale vengono metabolizzati per produrre nuove sostanze. Vengono fatti poi attraversare la membrana basale per diffondere all'interno del sangue fetale dove vengono ripresi da trasportatori cumulativi, Ac, (influsso) o scambiatori, X, (mediando l'efflusso di alcuni aminoacidi ma non permettono il loro netto trasferimento, il quale potrebbe essere eseguito da un trasportatore non-scambiatore di efflusso attraverso la membrana basale, ET). Gli aminoacidi seguono un tipo di trasporto attivo, contro gradiente che determina una maggior concentrazione di questi a livello fetale piuttosto che a livello materno; nonostante ciò, sarebbe opportuno parlare di un trasporto selettivo in quanto la concentrazione presente a livello fetale non rispecchia quella materna. Studi condotti su porcellini d'India, hanno evidenziato un trasferimento netto degli aminoacidi dalla madre al feto ma, nel caso umano, vi sono alcuni aminoacidi che possono eventualmente far ritorno alla circolazione materna; la serina, ad esempio, non viene del tutto trasferita al feto ma rimane a livello placentare per contribuire all'assorbimento di alcuni aminoacidi. Di contro, è opportuno comprendere come questi aminoacidi riescano ad attraversare il sinciziotrofoblasto per raggiungere finalmente il feto che necessita di un rifornimento continuo per il suo sviluppo. È nota la presenza sia dei sistemi di trasporto accumulatori che scambiatori a livello del sinciziotrofoblasto; i primi mediano l'assorbimento degli aminoacidi seguendo il gradiente del Na^+ e sfruttando la $Na^+/K^+ATPase$ mentre i secondi l'efflusso degli stessi. Ne segue dunque un meccanismo combinato tra i due.

Per poter spiegare meglio questi meccanismi con un approccio diverso, J.K. Cleal e R.M. Lewis, si sono avvalsi della perfusione isolata a livello dei cotiledoni placentari (def: Ognuna delle piccole aree del corion in cui si sviluppano ciuffi isolati di villi, caratteristici della placenta [41]); in particolare, a seguito della perfusione, hanno posto la loro attenzione su un aminoacido, etichettato, per poter valutare la sua presenza a livello del sangue fetale e poter dunque trarre informazioni su quello che è stato il suo percorso. Si è osservato uno scambio, Tab.8, di aminoacidi sfruttando sistemi asc e L (in particolare LAT2) e un non-scambio di L-leucina a conferma del fatto che sistemi di trasporto non scambiatori servono per potere aumentare la concentrazione a livello fetale mentre quelli scambiatori per alterare la composizione del plasma fetale. La leucina, infatti, a livello del sangue fetale viene poi resa disponibile per eventuali scambi con altri aminoacidi. Tra i sistemi non-scambiatori si annoverano: sistema N, LAT3, LAT4, TAT1 (questi ultimi due trasportano leucina).

La Tab.9 mostra le coppie di aminoacidi che vengono scambiate a livello della placenta. Con il termine *yes*, si fa riferimento a quegli aminoacidi materni che subiscono uno scambio a livello della vena placenta-fetale seguendo il bolo di aminoacidi nell'arteria placenta-fetale; con *no* si indica l'assenza di scambio. [67] [68]

Tabella 9: Scambio di aminoacidi tra la placenta e la circolazione placento-fetale [67]

AMINOACIDI MATERNI	BOLO DI AMINOACIDI VERSO LA CIRCOLAZIONE PLACENTO-FETALE							
	GLU	TIR	SER	GLI	GLU	LIS	LEU	TRO
Glicina	No	No	No	No	No	No	No	No
Leucina	No	No	No	No	Si	No	Si	Si
Serina	No	Si	Si	No	Si	No	No	No

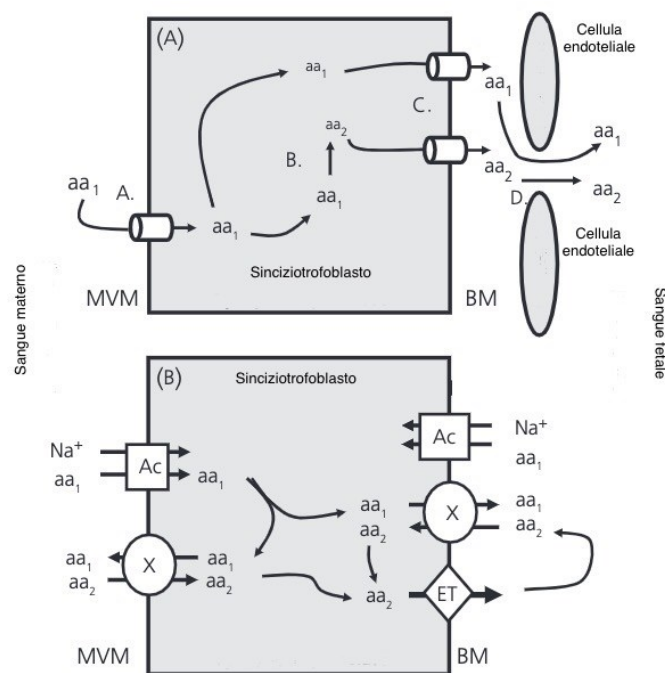


Figura 40: Meccanismo di trasporto degli aminoacidi

Questo primo studio, inoltre, ha iniziato anche a ricercare l'interconnessione che sussiste tra il trasporto placentare e la regolazione ormonale, in virtù anche di quelle che possono essere le gravidanze compromesse. La regolazione endocrina della placenta, infatti, potrebbe plausibilmente avvenire sia dalla madre che dal feto. Livelli materni bassi di insulina, ad esempio, osservati nel modello materno di un ratto, possono segnalare lo stato nutritivo materno portando alla

sottoregolazione dei trasportatori e conseguentemente all'insorgenza di alcune patologie. Inoltre, l'attività locale del sistema renina-angiotensina funge da regolatore nella circolazione feto-placentare promuovendo il flusso sanguigno placentare a favore dell'ossigenazione e nutrizione fetale. La placenta, dunque, agisce come "sensore di nutrienti" regolando la sua attività di trasporto in base alla disponibilità degli stessi nutrienti; se rileva un ambiente nutrizionale sfavorevole, la crescita fetale è sostenuta da una maggior rimozione di sostanze dal sangue materno. Se la placenta rileva un ambiente favorevole, attraverso recettori o meccanismi intracellulari come SNAT2, potrebbe aumentare la regolazione di glucosio e dei principali trasportatori.

Dunque, questo studio ha cercato di iniziare a dare una spiegazione ai vari meccanismi di trasporto, in presenza e assenza di sostanze, attraverso un modello di perfusione ex-vivo andando ad isolare la placenta umana e verificando come, introducendo un bolo di aminoacidi nella circolazione fetale, veniva attivata una risposta di scambio con conseguente rilascio di aminoacidi specifici, utilizzati per elaborare dei meccanismi. A seguito di questo, si sono susseguite alcune proposte di modellizzazione matematica/computazionale con l'intento di poter fornire un'analisi su questo tipo di meccanismo di trasporto complesso in modo da poter considerare gli aminoacidi non come semplici partecipanti di uno scambio, ma come veri protagonisti. [69]

3.3 STUDIO B.G.SENGERS

Uno studio, risalente al 2010, presentato da B.G.Sengers et al., [70] si è posto l'obiettivo di sviluppare un modello computazionale specifico per il trasporto di aminoacidi a livello placentare, considerando il complesso sistema dei vari meccanismi di trasporto. L'obiettivo è stato dunque quello di modellizzare le interazioni fra i diversi sistemi di trasporto agenti a livello di MVM e BM e soffermarsi su come il loro connubio governi il trasporto placentare di aminoacidi multipli. Il modello si è basato su relazioni semplificate non includendo la biochimica dettagliata di per sé complessa, Fig.41. Inizialmente, hanno strutturato un modello relativamente semplice al fine di descrivere in linee generali il trasporto senza soffermarsi sulla struttura e sulla geometria andando, di conseguenza, a ridurre i parametri di interesse. La zona studiata è stata suddivisa in tre aree quali: materna (m), sinziotrofoblasto (s), fetale (f), Fig. 42.

Si è partiti con la modellizzazione dei compartimenti interessati dal trasporto: come prima assunzione, queste tre aree sono state considerate come mischiate e ognuna è stata definita dal volume contenente un insieme di diversi aminoacidi a determinare il valore di concentrazione; queste, nel corso del tempo, possono variare per via del flusso di sangue o del trasporto stesso.

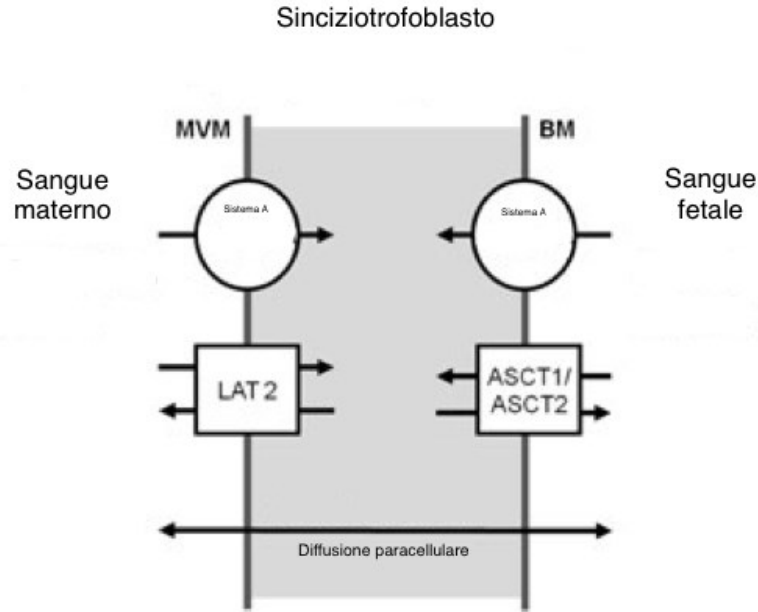


Figura 41: Overview trasporto aminoacidi

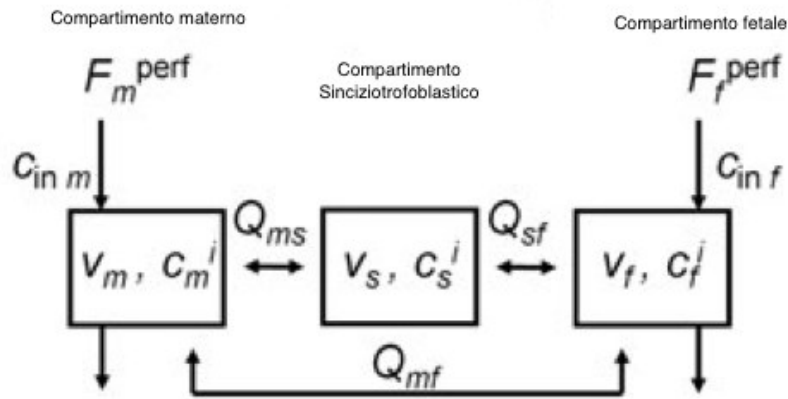


Figura 42: Modello computazionale dei compartimenti interessati al trasporto placentare

Il trasporto di aminoacidi in generale, pertanto, è dato da tre equazioni, ognuna delle quali, rappresenta: la variazione di concentrazione nel compartimento materno, Eq.1, nel sinciziotrofoblasto, Eq.2, e nel compartimento fetale, Eq.3.

$$\frac{dc_m^i}{dt} = \frac{1}{v_m} (Q_{m,perf}^i - Q_{ms}^i - Q_{mf}^i) \quad (1)$$

$$\frac{dc_s^i}{dt} = \frac{1}{v_s} (Q_{ms}^i - Q_{sf}^i) \quad (2)$$

$$\frac{dc_f^i}{dt} = \frac{1}{v_f} (Q_{f,perf}^i + Q_{sf}^i + Q_{mf}^i) \quad (3)$$

dove c_k^i ($mol\ m^{-3}$) indica la concentrazione dell'aminoacido i nel compartimento k ; v_k (m^3) è il volume del compartimento; Q_{kl}^i ($mol\ s^{-1}$) è il flusso netto dell'aminoacido i dal compartimento k al compartimento l ; $Q_{k,perf}^i$ ($mol\ s^{-1}$) è l'influsso netto dovuto alla perfusione. Di conseguenza, il flusso Q è ottenuto dalla combinazione dei singoli contributi dei diversi tipi di trasporto distinti nel modello. Successivamente, data la differenziazione tra meccanismi di trasporto accumulatori e scambiatori, si è proceduto modellizzando quelli accumulatori, ognuno dei quali è stato definito dalla sua massima capacità di trasporto V_{acc}^{max} ($mol\ s^{-1}\ s^{-2}$). Per semplicità, si è assunto che il trasporto segua la relazione Michaelis-Menten in modo da poter enunciare l'equazione che regola il trasporto di aminoacidi in virtù della loro concentrazione:

$$Q_{acc}^{tot} = A_{tot} V_{acc}^{max} \frac{c_m^{tot}}{K_{acc} + c_m^{tot}} \quad (4)$$

$$c_m^{tot} = \sum_{i=1}^{N_{acc}} c_m^i \quad (5)$$

$$Q_{ms,acc}^i = Q_{acc}^{tot} \frac{c_m^i}{c_m^{tot}} \quad (6)$$

dove Q_{acc}^{tot} ($mol\ s^{-1}$) è il flusso totale molecolare dal compartimento materno al sinciziotrofoblasto dello specifico trasportatore; A_{tot} (m^2) è l'area di scambio; c_m^{tot} ($mol\ m^{-3}$) è il valore che comprende tutti gli aminoacidi contenuti nella zona materna e che determina, quindi, il flusso totale; K_{acc} ($mol\ m^{-3}$), costante di Michaelis-Menten, indica la concentrazione a livello della quale si ha la velocità di trasferimento semi-massima; $Q_{ms,acc}^i$ è la frazione del flusso totale netto di un particolare aminoacidi ed è dettata dalla differenza di tasso di concentrazione tra il compartimento materno e quello del sinciziotrofoblasto. Per quanto riguarda i meccanismi di trasporto scambiatori che, come detto in precedenza, possono alterare la composizione, è necessario che l'aminoacido sia presente su entrambi i lati della membrana; pertanto, sfruttando sempre le equazioni relative al modello Michaelis-Menten, si è ricavata un'equazione indicante la concentrazione totale esterna ed una indicante quella interna:

$$Q_{exc}^{tot} = A_{tot} V_{exc}^{max} \left(\frac{c_m^{tot}}{K_{exc} + c_m^{tot}} \right) \left(\frac{c_s^{tot}}{K_{exc} + c_s^{tot}} \right) \quad (7)$$

$$c_m^{tot} = \sum_{i=1}^{N_{exc}} c_m^i \quad c_s^{tot} = \sum_{i=1}^{N_{exc}} c_s^i \quad (8)$$

$$Q_{ms,exc}^i = Q_{exc}^{tot} \left(\frac{c_m^i}{c_m^{tot}} - \frac{c_s^i}{c_s^{tot}} \right) \quad (9)$$

dove Q_{exc}^{tot} (mol s^{-1}) è il flusso totale molecolare in una direzione; V_{exc}^{max} (mol $m^{-2} s^{-1}$) è il tasso di scambio massimo; K_{exc} (mol m^{-3}) è la costante di Michaelis-Menten pari per tutti gli aminoacidi. Ne segue un meccanismo di trasporto contro gradiente di concentrazione e soprattutto, il flusso totale è dato dalla sommatoria del flusso eseguito con i meccanismi di trasporto scambiatori e quello con gli accumulatori.

In ultima analisi, è opportuno considerare anche il flusso sanguigno che attraversa i compartimenti e che determina una variazione di concentrazione:

$$Q_{m,perf}^i = F_m^{perf} (c_{in,m}^i - c_m^i) \quad (10)$$

dove $Q_{m,perf}^i$ (mol s^{-1}) è il flusso netto; F_m^{perf} ($m^3 s^{-1}$) è il tasso di perfusione e $c_{in,m}^i$ è la concentrazione dello specifico aminoacido in ingresso.

Per poter validare il modello, gli studiosi lo hanno confrontato con quello che si otterrebbe con un esperimento. La Fig.43 mostra un confronto tra le predizioni del modello e i dati sperimentali relativi ad uno studio effettuato sul rilascio di serina fetale (A) e sulla fuoriuscita di serina materna (B). La linea continua indica l'output del modello mentre i quadrati e la linea tratteggiata i dati sperimentali. La serina radiomarcata è stata convertita in serina totale in base al rapporto di input materno dello 0.6%, come nell'esperimento. Le frecce indicano gli orari in cui è stato somministrato un bolo di alanina nella circolazione fetale.

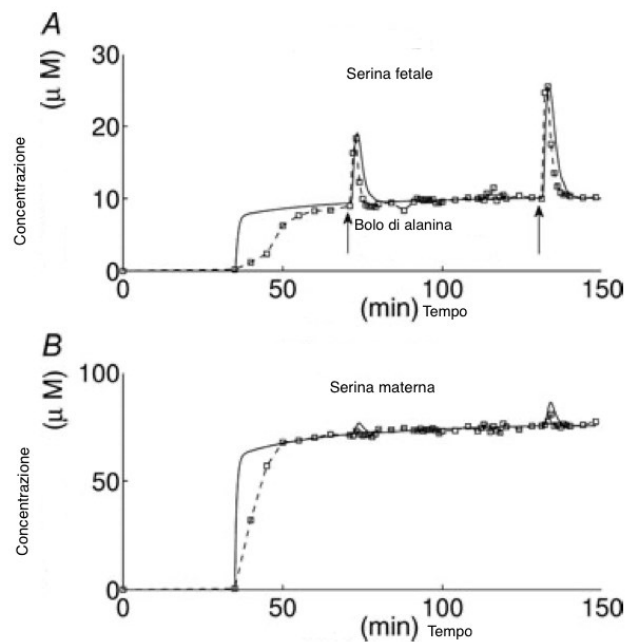


Figura 43: Validazione del modello confrontandolo con dati sperimentali

Complessivamente, si è osservato che il modello fornisce un'eccellente rappresentazione dei livelli di serina materna e fetale come risposta alla somministrazione di alanina fetale, ad eccezione della fase iniziale tra l'inizio della perfusione del substrato e il raggiungimento dell'equilibrio diffusivo iniziale, in cui il modello presentava un notevole eccesso di produzione. Il modello ha dunque confermato l'idea secondo cui, a livello placentare, agisca un complesso sistema basato sulla cooperazione di meccanismi di trasporto scambiatori e accumulatori. Il vantaggio del modello computazionale sta nel poter stimare le capacità massime di trasporto fisiologico fornendo informazioni importanti e non ancora disponibili. Il risultato più importante ricavato ha riguardato le capacità di scambio rilevando come, quella nella BM del lato fetale, sia di un ordine di grandezza inferiore rispetto a quella nel MVM sul lato materno.

La modellizzazione può fornire una preziosa panoramica su come funziona il sistema di trasporto di aminoacidi identificando le fasi limitanti la velocità del processo e determinando gli effetti dei cambiamenti fisiologici nelle concentrazioni di aminoacidi placentari, livelli di teletrasporto, flusso sanguigno o struttura placentare. Il modello, in combinazione con gli esperimenti, ha il potenziale di chiarire le interazioni complesse tra gli aminoacidi e di fornire informazioni su fattori chiave della crescita fetale potendo quindi agire in modo mirato sulla crescita fetale compromessa.

3.3 STUDIO R.M. LEWIS

Un ulteriore studio, risalente al 2012, condotto da R.M. Lewis et al., è nato come studio di recensione di un modello in precedenza presentato, andando a valutare quelli che sono i fattori più importanti

per la crescita fetale. [71] Il modello generale e complesso, come visto anche per lo studio precedente, considera tutti quei fattori che rientrano nel trasporto di aminoacidi come i vari tipi di meccanismi di trasporto e il flusso sanguigno. In questo caso, si è scelto prima di dimostrare che questi fattori possono essere modellati individualmente per poi poterli convogliare in un'organizzazione complessa.

Come mostrato in Fig.44, e come già ampiamente analizzato, gli aminoacidi attraversano la MVM (membrana microvillosa plasmatica) e la BM (membrana plasmatica basale) del sinciziotrofoblasto placentare attraverso un meccanismo di trasporto attivo contro gradiente di concentrazione in direzione fetale. In figura sono infatti rappresentati i tre differenti meccanismi di trasporto: accumulativi, scambiatori e facilitati. I primi mediano l'assorbimento secondario di aminoacidi nella cella guidati da gradienti elettrochimici attraverso la membrana plasmatica, presenti prettamente a livello della MVM; i secondi trasportano un aminoacido in cambio di un altro alternando le concentrazioni senza compromettere l'osmolalità della cellula, presenti a livello della MVM e della BM mediando il trasporto di quelle sostanze che non sfruttano gli altri due; gli ultimi mediano il trasporto bidirezionale degli aminoacidi attraverso un trasporto netto secondo gradiente, presenti prettamente a livello della BM.

Il fattore predominante è la concentrazione nella circolazione materna, fetale e all'interno del sinciziotrofoblasto; questo, a sua volta, è determinato dalla struttura placentare e dal flusso sanguigno. La struttura placentare, per essere inclusa nel modello, è stata definita da parametri come la dimensione in quanto una placenta più grande avrà una maggiore superficie di scambio e quindi una maggior capacità di trasferimento, dal modo in cui la sua struttura influenza il flusso, dalla miscelazione delle due circolazioni e dall'allineamento relativo dei due sistemi che influisce sull'efficienza del trasferimento. Anche le distanze di diffusione tra la circolazione materna e fetale possono essere importanti. Nel modello, pertanto, la struttura placentare è rappresentata da misure sommarie come la superficie di scambio, volumi del compartimento e lunghezza capillare. Il modello iniziale, formulato dagli stessi studiosi, si basava sulla cinetica fenomenologica di Michaelis Menten; l'attuale modello tende invece ad essere più meccanicistico. Si basa su molecole trasportatrici di tipo "carrier" a livello delle quali l'aminoacido deve legarsi; si distinguono diversi stati variabili in termini di configurazione e conformazione in modo che lo specifico aminoacido possa legarsi non permettendo la stessa azione ad un altro aminoacido. La Fig.45, mostra il funzionamento di una singola proteina "carrier" dedita al trasporto di aminoacidi: il singolo aminoacido è schematizzato con la lettera A mentre X rappresenta la proteina trasportatrice e AX denota il complesso aminoacido-carrier. Le frecce mostrano le direzioni verso cui prosegue il flusso. Come disegnato, il modello del "carrier" rappresenta un trasportatore facilitato. Per lo scambiatore si individuerebbe la stessa

schematizzazione se non fosse per l'eventualità di "ribaltamento" quando si lega. Per compiere un ciclo completo, lo scambiatore deve legarsi ad un aminoacido e trasportarlo da un lato della membrana dove poi si legherà ad un altro. Per quanto riguarda i trasportatori cumulativi, dipendenti dal sodio, il modello differisce in quanto l'AX può formarsi solo se si lega anche al sodio; il potenziale di membrana e la bassa concentrazione ionica intracellulare permettono il trasferimento netto. Matematicamente questo si traduce in una singola equazione per il flusso netto in funzione delle concentrazioni su ciascun lato della membrana. Il modello è stato testato in laboratorio dove ci si è avvalsi di vescicole presenti a livello dei MVM e di gradienti elettrochimici che regolano il trasporto. Modellando il singolo trasportatore e assumendo, anche in questo caso, la cooperazione, è possibile iniziare a strutturare il sistema in modo più complesso. Anche in questo caso, il modello è stato testato inizialmente nella placenta perfusa isolata aumentando man mano la complessità. Si è scelto di utilizzare in primis un modello compartimentale, simile a quello visto in precedenza, a livello del quale la concentrazione del singolo aminoacido è variabile ed è regolata da equazioni specifiche del trasportatore e dai flussi in ingresso e in uscita.

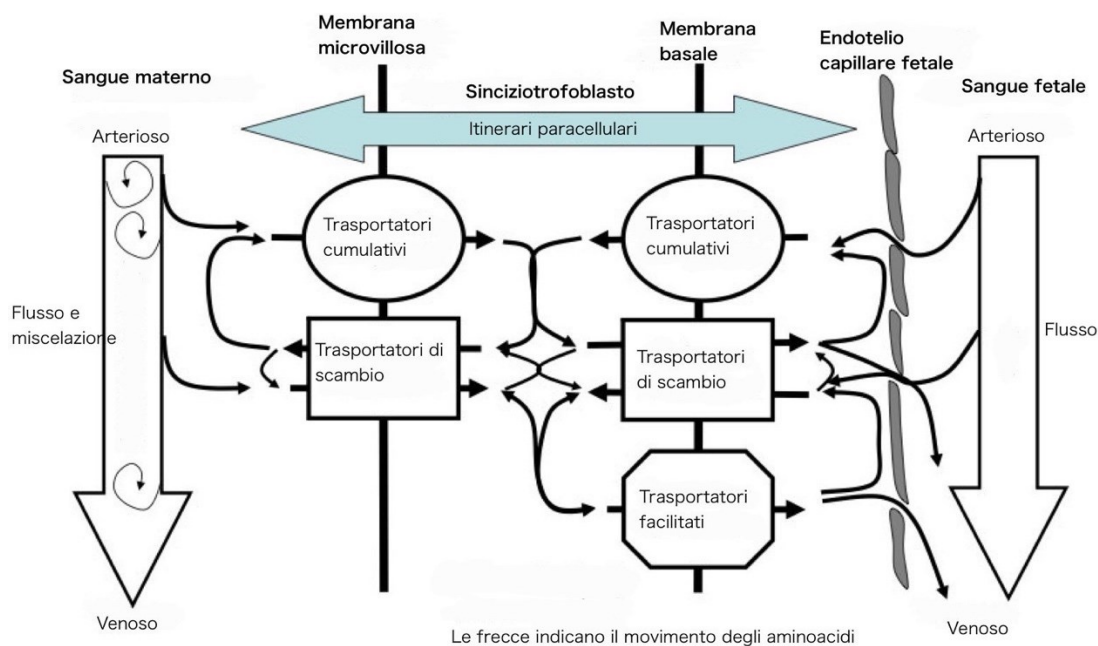


Figura 44: Il trasporto placentare di aminoacidi coinvolge numerosi meccanismi

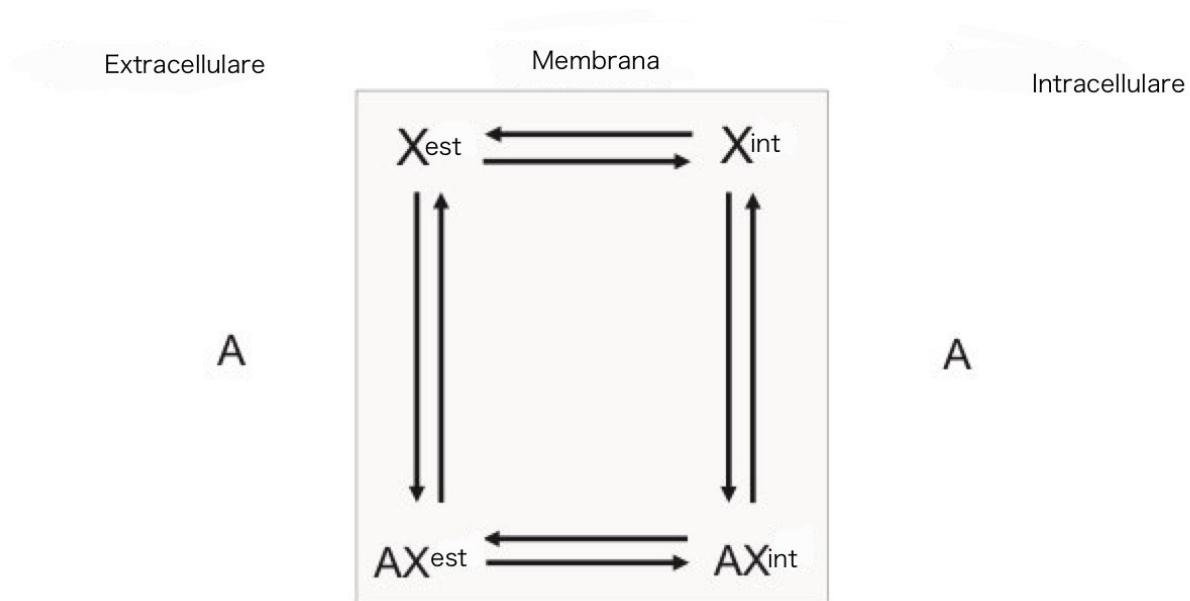


Figura 45: Modello di un generico trasportatore di aminoacido

Il secondo passo verso la complessità del sistema, si è basato sul considerare miscelati i compartimenti e sull'introduzione di altri fattori come flusso sanguigno, convezione e diffusione dei substrati. In questo caso, gli studiosi hanno considerato, rifacendosi a studi passati, il flusso sanguigno, attraverso lo spazio intervilloso, come mezzo poroso e integrato con modelli per le reti vascolari e capillari fetali.

La Fig.46 mostra l'effetto dell'aumento di V_{max} del trasportatore cumulativo presente su MVM sul trasferimento di aminoacidi; questo aumento avrebbe un effetto significativo se il valore di V_{max} si trovasse al di sotto di quelli relativi agli altri tipi di trasportatori. Al di sopra di questi invece, l'effetto diminuisce man mano che gli altri trasportatori divengono limitanti. Nel modello rappresentato ci sono tre aminoacidi e tre trasportatori: uno cumulativo (A) sulla MVM che trasporta AA1, uno scambiatore presente sia su MVM che su BM e trasporta tutti e tre gli aminoacidi e uno facilitato, sulla BM, che trasporta solo AA3. Per la modellizzazione, il flusso sanguigno è stato imposto come uguale nelle due circolazioni e la concentrazione arteriosa di tutti e tre gli aminoacidi era di 100mmol/l nella circolazione materna e di 150mmol/l nella fetale. Tutti i valori di K_m erano pari a 100mmol/l e l'attività dello scambiatore e del facilitato sono state supposte uguali. I volumi dei tre compartimenti si basavano su quelli ottenuti da analisi morfometriche.

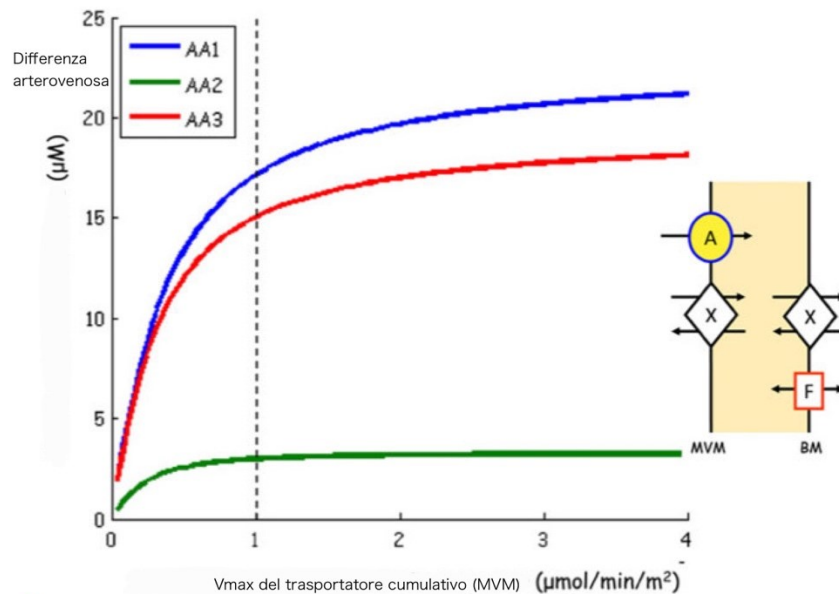


Figura 46: Effetti dell'aumento di V_{max} di un trasportatore cumulativo presente su MVM

Per validare il modello, son stati condotti esperimenti di perfusione placentare, analisi morfometriche sui lobuli perfusi e analisi di sensibilità andando a variare ciascuno dei parametri. Testando il modello, è stato possibile comprendere quelli che sono i parametri significativi, cioè quelli utili per poter predire eventuali patologie, e quelli che invece è possibile scartare. Si evidenzia come questo testato sia solo un modello predittivo; il modello completo permetterebbe di poter misurare un elevato numero di parametri, tra cui le concentrazioni di aminoacidi nel plasma venoso e arterioso e nel sangue, escludendo quella nella vena ombelicale, in gravidanze. L'importanza del modello, si ribadisce, sta nel poter evidenziare quelli che sono i parametri significativi per l'accrescimento del feto e conseguentemente valutare quelli limitati in crescita abnormi di feto (FGR) o macrosomia fetale (termine usato per indicare un neonato molto più grande della media).

3.4 STUDIO E.M. LOFTHOUSE, STUDIO PERAZZOLO S.

Mentre questi studi si sono soffermati prettamente sugli aspetti più generali e su quelli che sono i fattori che influenzano il trasporto di tutti gli aminoacidi, senza alcuna distinzione, ci sono stati anche gruppi di ricerca che hanno focalizzato la loro attenzione su alcuni aminoacidi specifici. Ad esempio, in uno studio condotto nel 2015 da E. M. Lofthouse et al., ci si è concentrati sul trasferimento placentare di fenilalanina attraverso la perfusione di una placenta umana isolata. Lo studio è stato eseguito a determinate velocità di flusso materno e fetale: per il primo 10, 14 e 18 ml/min per 1h ciascuno; per il secondo 3, 6 e 9 ml/min per 20min. I campioni sono stati ricavati dagli essudati (liquido prodotto dal corpo come risultato di un processo infiammatorio, risultato di una intensa attività cellulare [72]) venosi materni e fetali. Si è proceduto con la modellazione computazionale per confrontare i dati

sperimentali con quanto previsto. Si è ricavato un aumento di assorbimento placentare di fenilalanina (mol/min) con il flusso materno; il rilascio dell'aminoacido non era, invece, associato al flusso. Si è giunti alla conclusione, basandosi sull'assenza di relazione tra l'assorbimento placentare e il flusso netto dello stesso nella circolazione fetale, dell'esistenza di altri fattori che mediano il trasporto. Gli studiosi hanno, pertanto ritenuto che possa dunque coesistere una regolazione dei livelli di aminoacidi liberi all'interno della placenta o dalle proprietà dei trasportatori facilitati che si occupano del trasporto di fenilalanina. [73] A conferma della continua ricerca, anche la stessa modellazione computazionale è stata protagonista di revisioni; nel 2016, infatti, Perazzolo S. et al, hanno pubblicato un nuovo modello computazionale 3D, a differenza dei precedenti in 2D. È stata raccolta e ricostruita una pila di immagini al microscopio confocale dei villi terminali placentari e il framework ottenuto è stato testato per il trasporto di ossigeno. I risultati preliminari hanno identificato zone locali di stagnazione e aree, invece, con maggior trasferimento di nutrienti nei capillari fetali in virtù di una miglior perfusione e di uno spessore inferiore della barriera tissutale. Questo modello potrebbe eventualmente servire, per valutare le condizioni di gravidanza influenzate da un'alterata morfologia placentare. [74]

La tecnica di perfusione placentare rappresenta tutt'oggi una delle tecniche maggiormente utilizzate per studiare i molteplici aspetti di questa struttura complessa e misteriosa. Questa tecnica, basata sulle teorie del professor Henning Schneider, prevede l'analisi sia di un cotiledone intatto prelevato da una placenta espulsa sia di una arteria e di una vena fetale che irrorano il lobulo perfuse con tampone fisiologico. La perfusione può durare anche ore mantenendo costanti i parametri metabolici. A seconda delle esigenze, la circolazione può essere stabilita sul lato materno e fetale con configurazione aperta o chiusa. Le due circolazioni sono tipicamente perfuse in modo indipendente in modo da poter variare la portata, la miscela di gas e la composizione del tampone a proprio piacimento. I parametri biologici analizzati variano in base alle apparecchiature e ai test disponibili. I campioni di tampone vengono prelevati da un sensore le cui sonde sono posizionate ai lati dei vasi oppure nello spazio intervilloso. Questa, infatti, è stata la metodologia che ha permesso di comprendere il funzionamento dei diversi meccanismi di trasporto a livello placentare. [75] Il connubio tra modellazione computazionale e perfusione placentare rappresenta l'avanguardia in quella che è la ricerca in questo campo.

Nel corso della trattazione modellistica, due concetti chiavi son stati ampiamente ripetuti in virtù del fatto che son stati i punti di partenza dei vari gruppi di ricerca con il fine di fornire sempre una più ampia spiegazione circa la placenta e le sue funzioni. [76] Il connubio tra perfusione placentare e modellazione matematica rappresenta il modo attuale con cui è possibile fornire un quadro generale sul sistema che opera a livello placentare. La perfusione, infatti, fornisce un controllo sulle condizioni

sperimentali e di misurazione di parametri funzionali come pressione, concentrazioni di soluto e pH nel tempo. Questo, in comunione con la modellazione, permette l'esecuzione di numerosi test. Con questi, infatti, si è scoperto quanto il metabolismo non sia qualcosa di astruso ed estraneo al trasporto placentare. Con il passare degli anni si è dunque assistito ad una progressione di modelli analitici, modelli rappresentativi o idealizzati e modelli computazionali, Fig.47. In figura sono mostrati una pila di immagini confocali 2D di un villo placentare terminale e la corrispondente ricostruzione tridimensionale che illustra le anse capillari fetali interne e la superficie di diffusione esterna del tessuto in contatto con il sangue materno nello spazio intervilloso. Inoltre, sottostante, sono rappresentati dei modelli generati al computer delle reti vascolari di una placenta sana e normale a dimostrazione di come, da queste, sia possibile predire una patologia. Strabiliante notare come la ricerca in questo ambito vada di pari passo con l'avanzare della bioingegneria. Di recente si è passati a modelli che hanno incluso scansioni di sezioni trasversali placentari, immagini di scansione laser confocal 3D e tomografie computerizzate avvalendosi di calchi polimerici. Alcuni approcci hanno anche generato reti vascolari multiscala in silicio basandosi su reti vascolari in vivo. L'unica limitazione, tuttavia, è rappresentata dalla scarsa disponibilità di tessuto patologico. Un'ulteriore sfida associata ai modelli computazionali è collegata anche alla questione di validazione sperimentale: ci si è avvalsi di oggetti a geometria noti per convalidare l'imaging ottenuto e anche della conversione di dati immagine su scala micrometrica in domini geometrici computazionali quantitativi. Le stesse tecniche di stampa 3D e di velocimetria del flusso di particelle appartenenti a flussi reali sono state usate per confermare la validità delle simulazioni di flusso microvascolare. In particolare, nel 2017, S.Perazzolo et al., hanno proposto una modellazione degli effetti del flusso intervilloso sul trasporto dei soluti basandosi su tecniche di imaging 3D della struttura placentare umana, valutando come per una diffusione libera di piccoli soluti, il flusso del sangue materno attraverso lo spazio intervilloso possa essere limitante. Per modellare il flusso si sono avvalsi di leggi termodinamiche quali Darcy, Stokes e di diffusione [77]. La ricerca futura si sta soffermando sulla conversione delle scale usate nell'imaging medico in scale micrometriche, a dimensione delle unità funzionali per lo scambio placentare quali i villi.

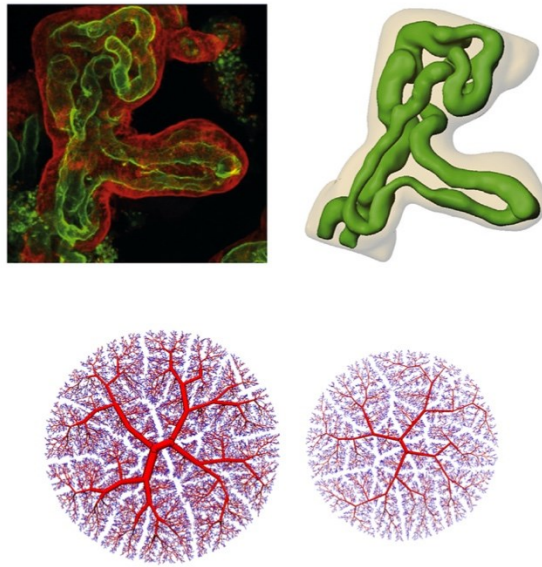


Figura 47: Intervento della bioingegneria e dell'ingegneria tissutale nella ricerca

4. MODELLIZZAZIONE MATEMATICA DEL TRASPORTO PLACENTARE DI AMINOACIDI IN GRAVIDANZE SANE O COMPLICATE DA PATOLOGIE

4.1 METODI

L'obiettivo di questo lavoro di tesi, partendo da un modello implementato nel 2016, è stato quello di simulare la variazione di concentrazione degli aminoacidi nei compartimenti materno e fetale. A differenza del modello di partenza, nello studio ci si è soffermati su singoli aminoacidi valutando come variano nei diversi compartimenti. Successivamente, si è applicato lo stesso modello in caso di gestazioni patologiche, aspetto non evidenziato in precedenti studi, al fine di descrivere le variazioni di concentrazione degli stessi aminoacidi. In particolare, l'intento è stato quello di verificare se il modello risulti essere valido anche in casi diversi, rispetto a quelli presentati in letteratura e, soprattutto, se gli aminoacidi possano assumere, in futuro, un ruolo più predominante tra i marcatori metabolici al fine di predire e seguire eventuali patologie.

4.1.1 MODELLO DI PARTENZA

Nel 2016, N.Panitchob et al., [78] traendo spunto da modelli precedenti ([79]) e testati solo su determinati aminoacidi quali serina ed alanina, ha esteso questi ad un'ampia classe di aminoacidi. Il modello in questione, per verificarne la validità, è stato poi confrontato con valori ricavati dalla letteratura. In particolare, i dati provenivano da uno studio dove si valutava il trasporto di aminoacidi in una paziente sana ed in una affetta da diabete mellito [80]; in questo modello, invece, si è valutata la correlazione tra il trasporto di aminoacidi e la fenilchetonuria. Questa è una malattia metabolica di origine genetica dovuta ad un difetto nel gene che codifica la fenilalanina-idrossilasi, l'enzima che converte l'aminoacido essenziale fenilalanina in tirosina, a sua volta precursore della dopamina. La mancata conversione provoca un accumulo di fenilalanina che porta a gravi e sparsi deficit cerebrali.[79] Partendo dalla semplice modellizzazione strutturale della placenta in tre aree, si è giunti alla conclusione, come per gli altri, secondo cui ci sia un complesso ed integrato sistema alla base del trasporto di aminoacidi. La Fig.48 mostra il modello compartimentale della placenta basato su quelli che sono i parametri di cui ci si è avvalsi per la modellizzazione matematica.

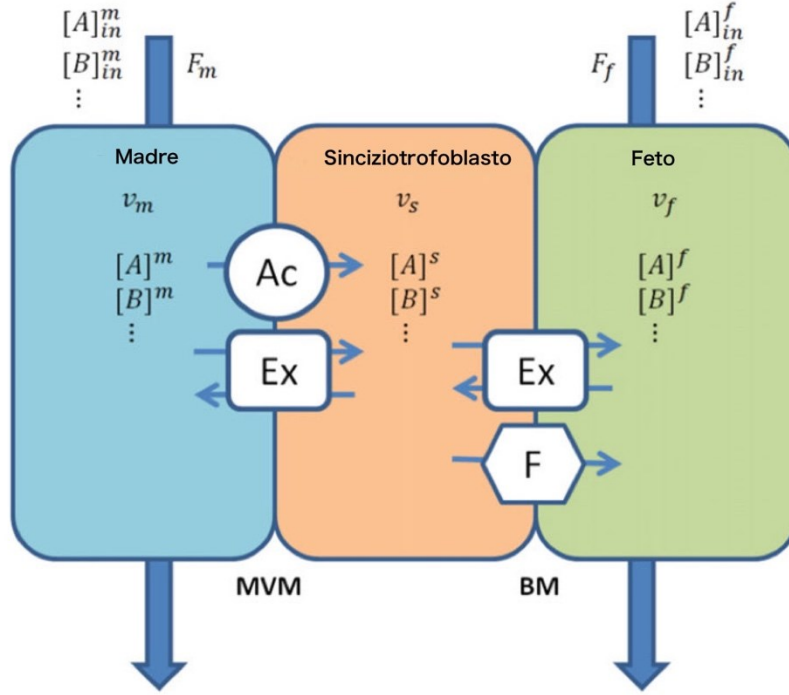


Figura 48: Modellizzazione compartimenti placentari

L'obiettivo è stato quello di apprendere nozioni circa la cooperazione dei diversi sistemi di trasporto, della loro composizione e di come questi possano permettere il trasferimento netto di aminoacidi. Il primo step è stato quello di modellizzare la struttura placentare: partendo dal primo studio analizzato, secondo cui la placenta è rappresentata come tre distinti compartimenti (spazio materno intervilloso, sinciziotrofoblasto e zona capillare fetale) considerati miscelati, il trasporto è stato modellato come flusso mediato da diversi trasportatori; in particolare, l'area MVM materna comprende trasportatori accumulatori e scambiatori, l'area BM fetale gli scambiatori e i facilitati. Il tasso di variazione della concentrazione di un determinato aminoacido A in ciascun comparto placentare è dato dalle seguenti equazioni: Eq.11 compartimento materno, Eq.12 sinciziotrofoblasto, Eq.13 compartimento fetale.

$$\frac{d[A]^m}{dt} = \frac{1}{v_m} (J_{A,flow}^m - J_{A,ac}^{m \rightarrow s} - J_{A,ex}^{m \rightarrow s}) \quad (11)$$

$$\frac{d[A]^s}{dt} = \frac{1}{v_s} (J_{A,ac}^{m \rightarrow s} + J_{A,ex}^{m \rightarrow s} - J_{A,ex}^{s \rightarrow f} - J_{A,fa}^{s \rightarrow f}) \quad (12)$$

$$\frac{d[A]^f}{dt} = \frac{1}{v_f} (J_{A,flow}^f + J_{A,ex}^{s \rightarrow f} + J_{A,fa}^{s \rightarrow f}) \quad (13)$$

dove $[A]^i$ è la concentrazione (mol l^{-1}) del substrato A nel compartimento i, v_i è il volume dello specifico compartimento (l) e $J_A^{i \rightarrow j}$ indica il flusso netto molecolare (mol min^{-1}) di A dal

compartimento i al j; m,s,f indicano rispettivamente il compartimento materno, sinciziotrofoblastico e fetale mentre ac, ex, fa denotato il tipo di trasporto (accumulatore, scambiatore, facilitato); $J_{A,flow}^i$ è il flusso molecolare netto (mol min^{-1}) dovuto al flusso sanguigno.

Successivamente, si è passati alla classificazione degli aminoacidi in virtù di quelli che sono i meccanismi di trasporto: AcEx per meccanismi di trasporto accumulatori e scambiatori, Ex per gli scambiatori, ExF per scambiatori e facilitati, AcExF per tutti i tipi. Glutammato e aspartato non sono inclusi in quanto si legano a specifici trasportatori, EAATS, e la lor interazione con il trasferimento di altri aminoacidi è limitata. Anche gli studiosi hanno pensato di modellizzare inizialmente il singolo sistema di trasporto, inteso come “carrier”, per poi poter coadiuvare le azioni di tutti come un vero e proprio sistema. Infatti, inizialmente, si riteneva che il sistema di trasporto scambiatore e il tasso di traslocazione facilitato dello stesso fossero affinità simmetriche e di legame uguali su entrambi i lati della membrana plasmatica e che i substrati di un certo tipo di trasportatore avessero tutti identiche proprietà cinetiche e leganti. Il secondo step ha compreso la modellizzazione dei vari sistemi di trasporto, precedentemente classificati; per i meccanismi di trasporto scambiatori, il flusso netto del substrato A dal compartimento I al II (mol min^{-1}) è dato da:

$$J_{A,ex}^{I \rightarrow II} = V_{ex} \frac{[A]^I [R]^{II} - [A]^{II} [R]^I}{\frac{K_{ex}([Tot]^I + [Tot]^{II})}{2} + [Tot]^I [Tot]^{II}} \quad (14)$$

dove $[A]^i$ è la concentrazione (mol l^{-1}) del substrato A nel compartimento I o II, $[Tot]^i$ è la sommatoria di tutti i substrati che utilizzano questo meccanismo di trasporto, $[R]^i$ è sempre la somma di tutti i substrati ma escludendo il substrato A; K_{ex} è la costante di dissociazione (mol l^{-1}) assunta uguale per tutti i substrati e V_{ex} è il tasso massimo di trasporto (mol min^{-1}).

Per i meccanismi di trasporto facilitati, invece, il flusso netto (mol min^{-1}) è dato da:

$$J_{A,fa}^{I \rightarrow II} = V_{fa} \left(\frac{[A]^I}{K_{fa} + [Tot]^I} - \frac{[A]^{II}}{K_{fa} + [Tot]^{II}} \right) \quad (15)$$

dove $[A]^i$ è la concentrazione (mol l^{-1}) del substrato A nel compartimento i, $[Tot]^i$ è la sommatoria delle concentrazioni di tutti i substrati che utilizzano questo meccanismo di trasporto, K_{fa} è la costante di dissociazione (mol l^{-1}) assunta uguale per tutti i substrati e V_{fa} è il tasso massimo di trasporto (mol min^{-1}).

In ultimo, i trasportatori cumulativi funzionano tramite trasporto attivo secondario guidato dal gradiente elettrochimico del sodio; in passato, fu adottato questo modello di cotrasporto in cui si

presumeva che il sodio si legasse per primo al cotrasportatore seguito dall'aminoacido e che solo il trasferimento del complesso carrier-sodio-substrato fosse elettrogenica; anche in questo caso, il flusso netto (mol min^{-1}), distinguendo due substrati, è dato da:

$$J_{A,ac}^{I \rightarrow II} = \frac{V_{ac}}{D} \left\{ \varepsilon \varepsilon' [Na]^I [Na]^{II} ([A]^I [B]^{II} - [A]^{II} [B]^I) + K_{ac} K_{Na} (\varepsilon'^I [A]^I [Na]^I - \varepsilon [A]^{II} [Na]^{II}) \right\} \quad (16)$$

$$D = [Na]^I [Na]^{II} \left(\varepsilon'^I [Tot]^I ([Tot]^{II} + K_{ac}) + \varepsilon [Tot]^{II} ([Tot]^I + K_{ac}) \right) + K_{ac} K_{Na} ((\varepsilon' + 1) [Tot]^I [Na]^I + (\varepsilon + 1) [Tot]^{II} [Na]^{II}) + K_{ac}^2 K_{Na} ([Na]^I + [Na]^{II}) + 2(K_{ac} K_{Na})^2 \quad (17)$$

$$\varepsilon = e^{\left(\frac{\beta z F}{RT} \Delta \psi\right)} \quad \varepsilon' = e^{\left(\frac{(\beta-1) z F}{RT} \Delta \psi\right)} \quad (18)$$

dove $[A]^i$ e $[B]^i$ sono le concentrazioni (mol l^{-1}) del substrato A e B nel compartimento i, $[Tot]^i$ è la sommatoria dei substrati A e B, K_{ac} e K_{Na} rappresentano le costanti di dissociazione (mol l^{-1}) del substrato di aminoacido e del sodio, V_{ac} è il tasso costante di trasporto (mol min^{-1}). La polarizzazione indotta dal potenziale elettrico è data da ε e ε' per il tasso di trasporto rispettivamente in avanti e indietro; β rappresenta la costante di polarizzazione elettrica, z è la carica del sodio, F è la costante di Faraday, R la costante di gas, T la temperatura assoluta, $\Delta \Psi$ è la differenza di potenziale di membrana tra il lato I e il lato II.

Anche il flusso sanguigno all'interno e all'esterno del compartimento materno e fetale è stato modellato come costante (non pulsante); i compartimenti sono stati considerati miscelati e il flusso risultante molecolare netto (mol min^{-1}), è dato da:

$$J_{A,flow}^i = F_i ([A]_{in}^i - [A]^i) \quad (19)$$

dove $[A]_{in}^i$ è la concentrazione (mol l^{-1}) del substrato A in ingresso nel compartimento i mentre $[A]^i$ è la concentrazione nel compartimento, F_i è il rapporto tra il flusso che entra e che esce dal compartimento i (l min^{-1}).

I parametri selezionati, sono stati poi rapportati ad una singola unità funzionale placentare (cotiledone) che è stata modellata con un volume di 30ml; per i modelli del trasportatore, invece, le costanti relative al flusso di trasporto sono state inizialmente considerate uguali per ciascuna classe di aminoacidi al fine di valutarne l'influenza sul trasporto complessivo degli stessi.

Il modello è stato poi implementato in MatLab, come nei casi precedenti.

I risultati ottenuti da questo studio è opportuno schematizzarli e discuterli man mano. Per quanto concerne l'assorbimento di aminoacidi materni e quindi il trasporto attraverso la zona microvillosa, i

trasportatori cumulativi e scambiatori giocano un ruolo importante; in particolare, mentre i primi pompano attivamente gli aminoacidi nel sinciziotrofoblasto, gli altri sono responsabili del mantenimento dell'equilibrio della loro composizione relativa. Inizialmente, il trasporto attraverso la BM è stato disattivato per dimostrare chiaramente il potenziale di assorbimento attraverso la MVM; il modello ha mostrato un aumento di concentrazione nel sinciziotrofoblasto rispetto alla zona materna per i MVMAcEx e MVMEEx. Questo dimostra che la commistione dei sistemi di trasporto cumulativi e scambiatori ha permesso un giusto assorbimento e trasporto di aminoacidi a livello del sinciziotrofoblasto. Si noti che, in questo caso, il modello ha considerato solo l'attività dei trasportatori a livello MVM senza includere l'efflusso attraverso BM. Le concentrazioni stazionarie sono state raggiunte nel momento in cui si è assistito ad un equilibrio dei gradienti opposti nel substrato del trasportatore cumulativo, nel potenziale elettrochimico del sodio e la frazione dei substrati dello scambiatore è stata equiparata. Dunque, i cambiamenti nell'attività del trasportatore non hanno influenzato le concentrazioni ma solo il tasso di assorbimento e la velocità alla quale è stato raggiunto l'equilibrio. Si deduce che, una maggiore attività dello scambiatore potrebbe promuovere lo scambio di MVMAcEx sul lato materno comportando un accumulo più lento di MVMAcEx e un assorbimento più rapido di MVMEEx nel sinciziotrofoblasto. Questo non è stato però adeguatamente dimostrato in quanto la composizione relativa in entrambi i compartimenti sembrava esser costante. La Fig. 49 mostra le simulazioni del modello delle interazioni di trasporto sulla MVM: MVMEEx è costituito dalla somma di tutti gli aminoacidi trasportati per scambio verso MVM mentre MVMAcEx indica tutti quelli trasportati dagli scambiatori e cumulativi. Le linee tratteggiate indicano l'attività di trasporto cumulativo aumentata di 10 volte senza influire sulle concentrazioni all'equilibrio.

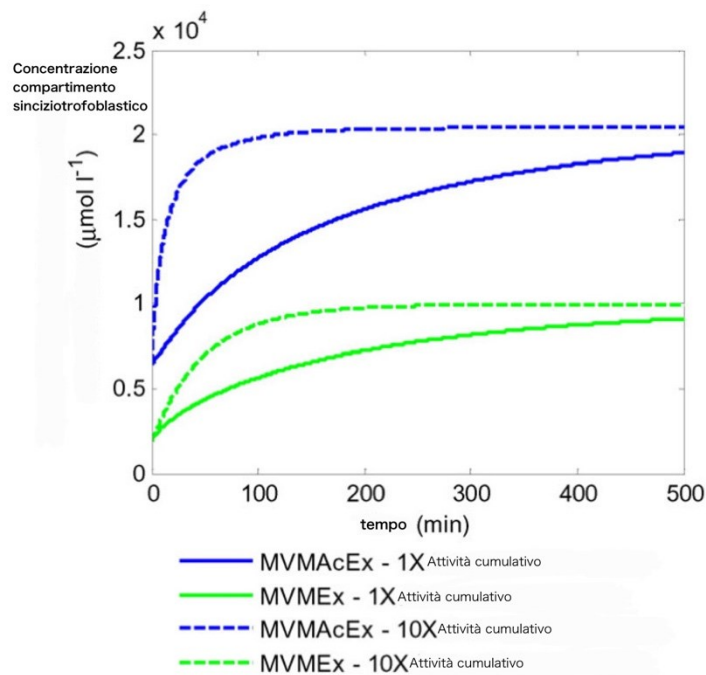


Figura 49: Modello di simulazione delle interazioni sul trasporto a livello di MVM

Di seguito, si è passati ad analizzare il trasporto attraverso la membrana basale: il trasporto di aminoacidi in questo punto è affidato ai trasportatori scambiatori e facilitati. Gli aminoacidi sono stati raggruppati in due categorie: BMEx, solo substrati associati a trasportatori di scambio e BMExF, comprendenti entrambi i meccanismi. In questo caso, i valori relativi alle concentrazioni arteriose ombelicali sono stati utilizzati come parametri iniziali di riferimento per indicare le concentrazioni in ingresso al compartimento fetale mentre le concentrazioni nel sinciziotrofoblasto sono state considerate costanti. Nella Fig.49 si mostra una simulazione delle interazioni che sussistono a livello di BM. Nel modello, la concentrazione del compartimento fetale è uguale a quella nella vena ombelicale. Le linee continue indicano un'uguale attività tra scambiatore e facilitato mentre quella tratteggiata, un aumento di circa 10 volte del trasporto facilitato. A parità di attività, il livello di stato stazionario di BMEx alla fine è leggermente inferiore alla concentrazione iniziale e di ingresso implicando un trasporto inverso, da feto a sinciziotrofoblasto. Un aumento nella zona fetale di BMExF, per via dell'aumento di concentrazione nella vena ombelicale e una leggera diminuzione di BMEx, implicano un trasporto inverso nel sinciziotrofoblasto. Questo è dovuto alla maggiore frazione in ingresso di BMEx nel compartimento fetale rispetto a quello del sinciziotrofoblasto che ha determinato un trasporto inverso, contro gradiente. Tuttavia, un aumento dell'attività dei meccanismi facilitativi potrebbe indirettamente aumentare il rilascio verso il feto di BMEx in quanto l'efflusso di BMExF, da parte dei facilitati, riduce il tasso di BMEx nella parte fetale rispetto alla zona del sinciziotrofoblasto e determina il trasferimento netto. Questa riduzione di BMEx fetale provoca un aumento di BMExF oltre i valori fisiologici relativi alla vena ombelicale.

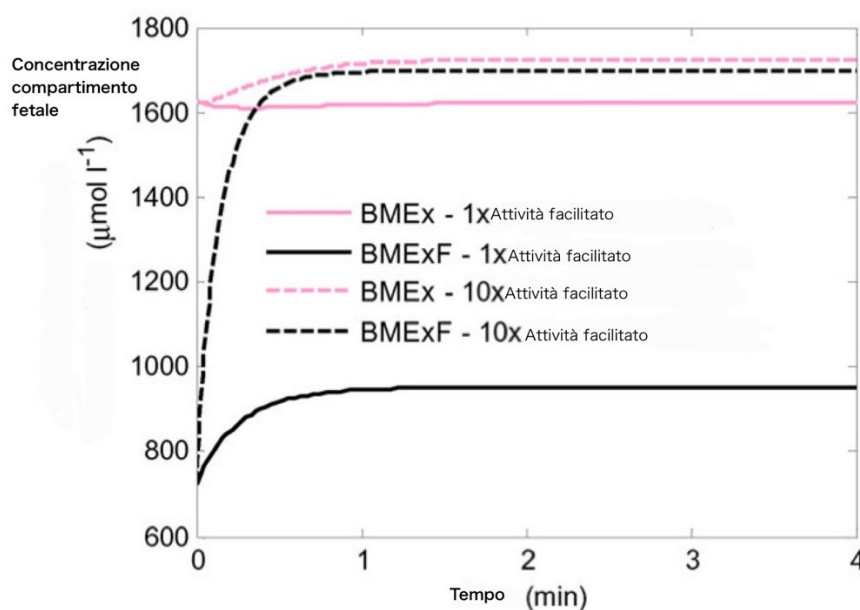


Figura 49: Modello di simulazione delle interazioni sul trasporto a livello di BM

Avendo analizzato i tre compartimenti separatamente, gli studiosi hanno proceduto a considerarli simultaneamente. Il modello ha dimostrato, analizzando le concentrazioni a livello della vena ombelicale, che tutti gli aminoacidi vengono trasferiti in maniera efficiente verso il feto. Il modello, testato allo stato stazionario, è stato poi confrontato con i valori presenti in letteratura dimostrando una corretta analogia con questi, nonostante la sovrastima del trasferimento di AcExF e ExF e la sottostima di AcEx ed Ex.

Un altro obiettivo dello studio era comprendere quanto la variazione dell'attività di un meccanismo di trasporto potesse inficiare sugli altri. Variando i parametri, si è scoperto come l'aumento dell'attività dei trasportatori cumulativi e facilitativi ha promosso il trasferimento placentare così come, l'aumento dell'attività di alcuni meccanismi favorisce il trasferimento di alcuni e non di altri. La Fig.50, mostra la simulazione del trasporto di aminoacidi.

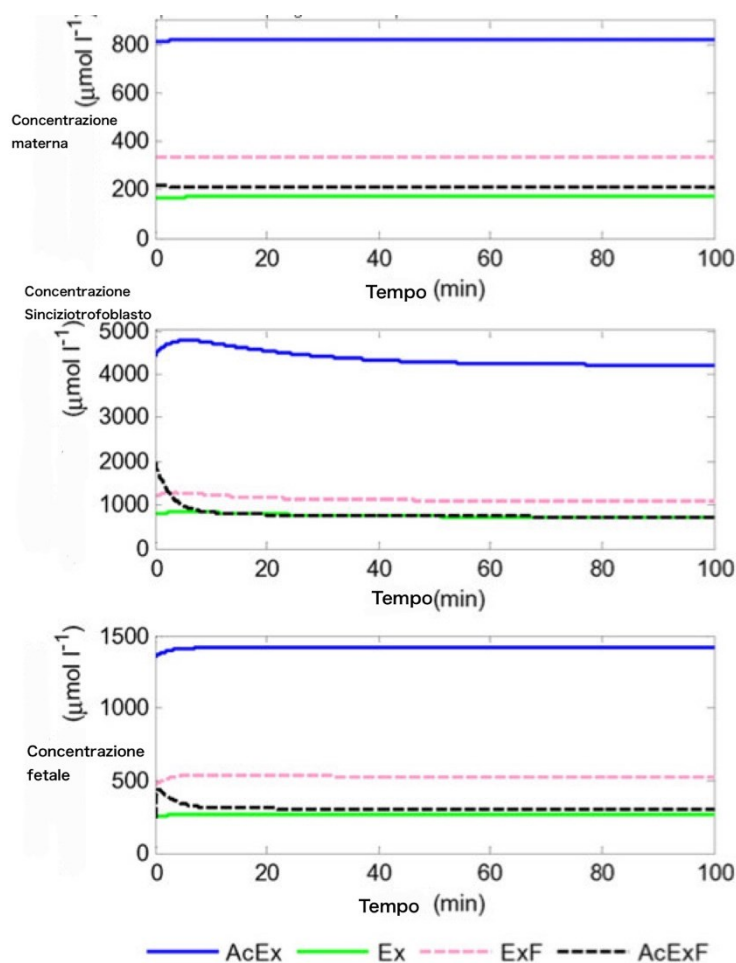


Figura 50: Modello di simulazione del trasporto di aminoacidi

Ad esempio, Fig.51, l'aumento dello scambiatore BM comporta una diminuzione della consegna fetale di ExF e AcExF perché promuove uno scambio nel sinciziotrofoblasto; inoltre, l'aumento dello scambiatore in MVM promuove l'assorbimento e la consegna fetale di Ex ed ExF a discapito di AcEx che viene, invece, scambiato nuovamente nel compartimento materno. L'incremento, dunque, dell'attività di scambio di MVM promuove l'assorbimento di AcExF nel compartimento sinciziotrofoblastico, aumentando a sua volta il trasferimento nella zona fetale.

Gli scambiatori MVM influenzano il trasferimento a livello di BM indirettamente e in modi opposti a seconda dei rapporti di concentrazione.

In ultima analisi, sono state analizzate le interazioni tra le attività multiple dei trasportatori, attraverso una serie di simulazioni durante le quali si sono andate a variare simultaneamente le attività. Inizialmente, è stata variata l'attività dello scambiatore in MVM e BM per comprendere quanto il meccanismo scambiatore influisse sul trasferimento placentare. Si è visto come, Fig.52, per l'aminoacido AcEx, un aumento di BM e una riduzione dell'attività di scambio su MVM determinerebbe un parto fetale ottimale; al contrario, per ExF e AcExF, facilitati, l'aumento di BM comporterebbe la ricaptazione a livello del sinciziotrofoblasto. Per AcExF, l'attività di BM ha avuto

effetti opposti sul trasferimento netto a seconda che l'attività di MVM fosse alta o bassa. Inoltre, una riduzione di entrambe le attività determina un ulteriore trasferimento di AcExF in quanto, per le attività a basso scambio, i cumulativi e i facilitativi dominano il trasferimento. Per Ex, aumentando entrambe le attività, si ottiene una maggior captazione nonostante, nel complesso, il trasferimento complessivo sia limitato.

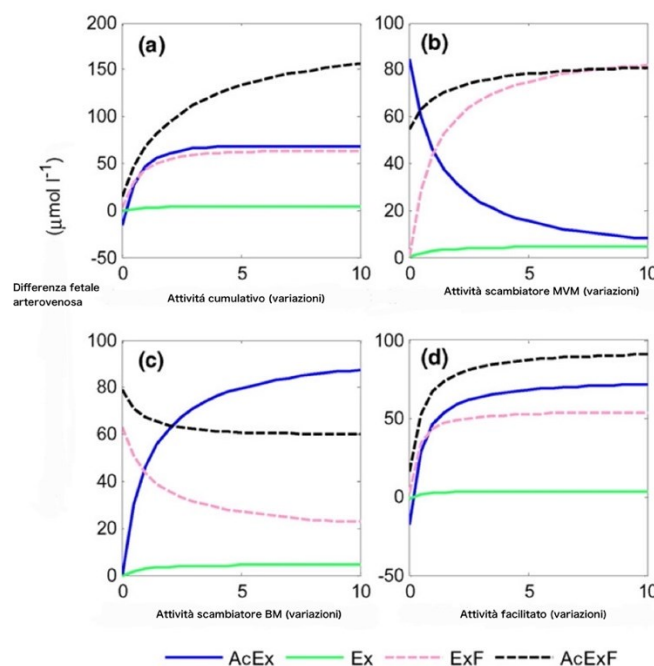


Figura 51: Analisi sull'attività dei trasportatori basata sulle differenze arterovenose

Successivamente, si è studiato quanto il trasporto complessivo sia influenzato dai trasportatori di MVM facendo variare simultaneamente le attività dei meccanismi di trasporto cumulativi e scambiatori, Fig. 53. I risultati hanno mostrato il massimo trasferimento placentare di AcEx e AcExF con l'aumento dell'attività cumulativa, promuovendo l'assorbimento nel sinciziotrofoblasto, e con la riduzione dell'attività di scambio, limitando il trasferimento all'indietro. Per Ex ed ExF, il massimo trasferimento si è verificato con l'aumento di entrambe le attività perché promuovono l'assorbimento, attraverso lo scambio nel sinciziotrofoblasto, aumentando le concentrazioni cellulari dei substrati guida. Nel caso contrario, trasporto al di fuori della zona fetale, si è però riscontrato, per AcEx, quando l'attività cumulativa era bassa.

L'influenza dei meccanismi nel lato BM è stata valutata variando l'attività dello scambiatore e dei facilitati in BM, Fig. 54. Si è ricavato che, per ExF e AcExF, il parto fetale è ottimale in caso di attività facilitativa elevata e quella di scambio bassa. Per AcEx ed Ex, invece, il parto fetale è ottimale quando entrambe sono elevate perché, un aumento dell'attività facilitata, determina, indirettamente, una promozione dell'attività di scambio che determina il trasferimento.

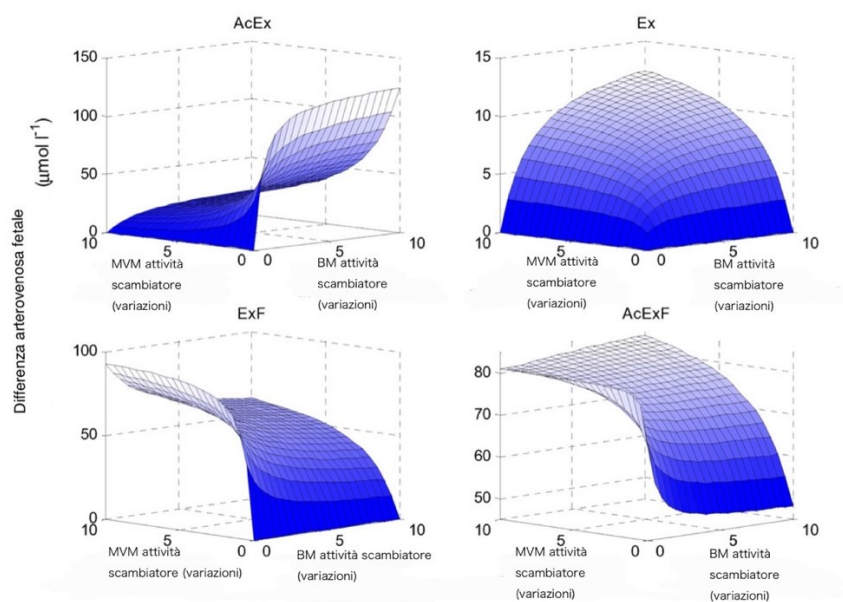


Figura 52: Effetti dell'attività del sistema di trasporto di scambio

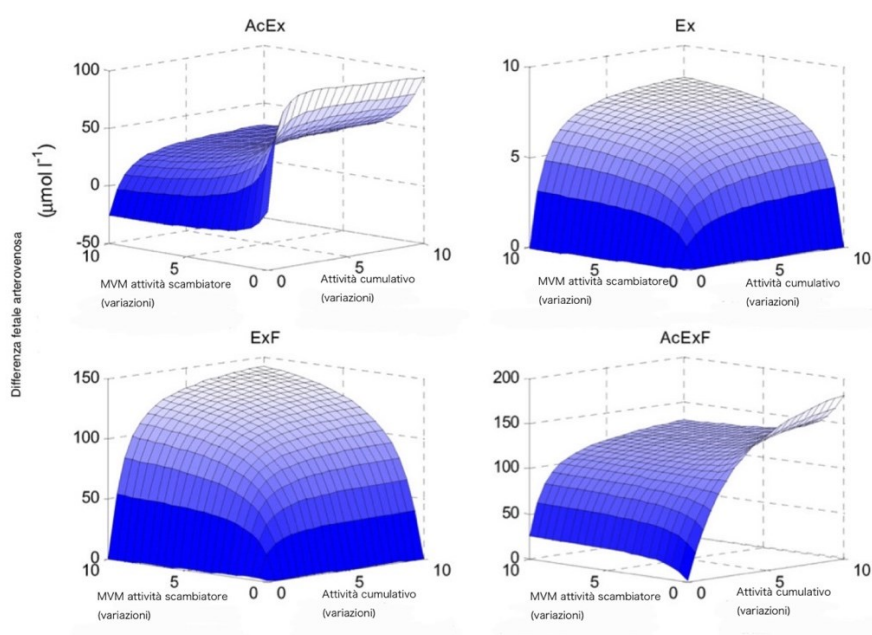


Figura 53: Effetti dell'attività di trasporto su MVM

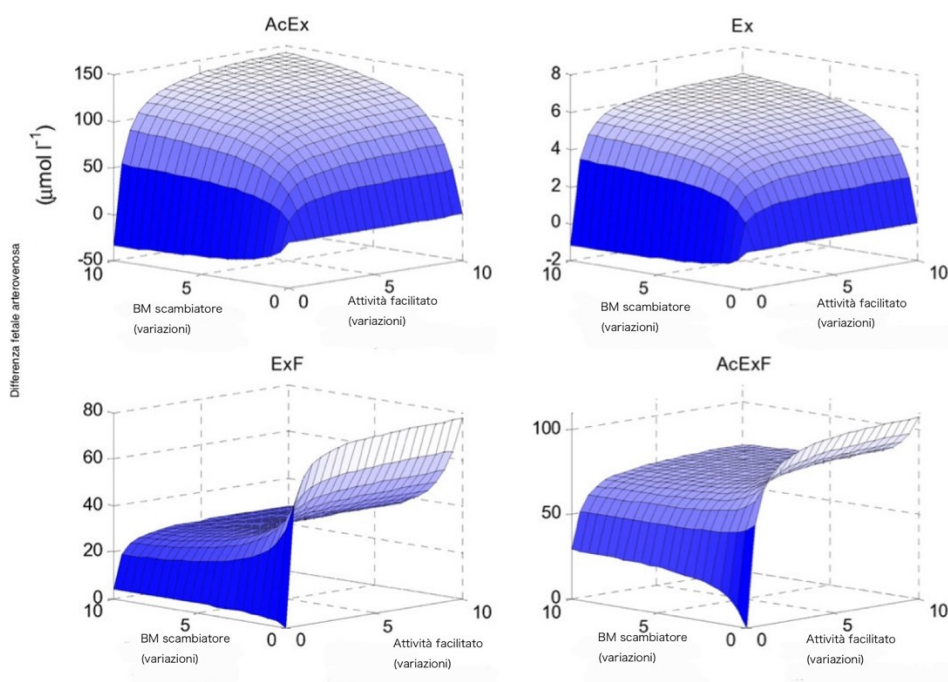


Figura 54: Effetti dell'attività di trasporto su BM

Inoltre, Fig.55, è stato analizzato anche l'impatto del flusso sanguigno materno e fetale riscontrando quanto le velocità di flusso siano limitanti solo quando il flusso è prossimo allo zero. Il sistema si è mostrato più sensibile ai cambiamenti di flusso fetale, rispetto che a quelli materni, in virtù della sua piccola frazione di volume. Un flusso fetale lento, infatti, si traduce in elevato parto fetale per AcEx ed Ex mentre, uno veloce, promuove il parto fetale di ExF e AcExF. Questo perché, nel primo caso, in cui si parla di meccanismi di trasporto non facilitati, la velocità elevata mantiene i rapporti di concentrazione di afflusso meno favorevoli determinando il trasporto da parte degli scambiatori mentre, nel secondo caso, il flusso mantiene i gradienti di concentrazione in BM costanti in modo da favorire il trasporto facilitato.

In conclusione, lo studio ha riscontrato, come mostrato in Fig.56, che bassi livelli di aminoacidi fetali e alti livelli di aminoacidi materni generalmente promuovono il trasporto fetale; quelli materni diventano limitanti solo a bassi livelli. Potrebbe eventualmente verificarsi un trasferimento netto negativo quando le concentrazioni materne sono estremamente basse rispetto alle fetali.

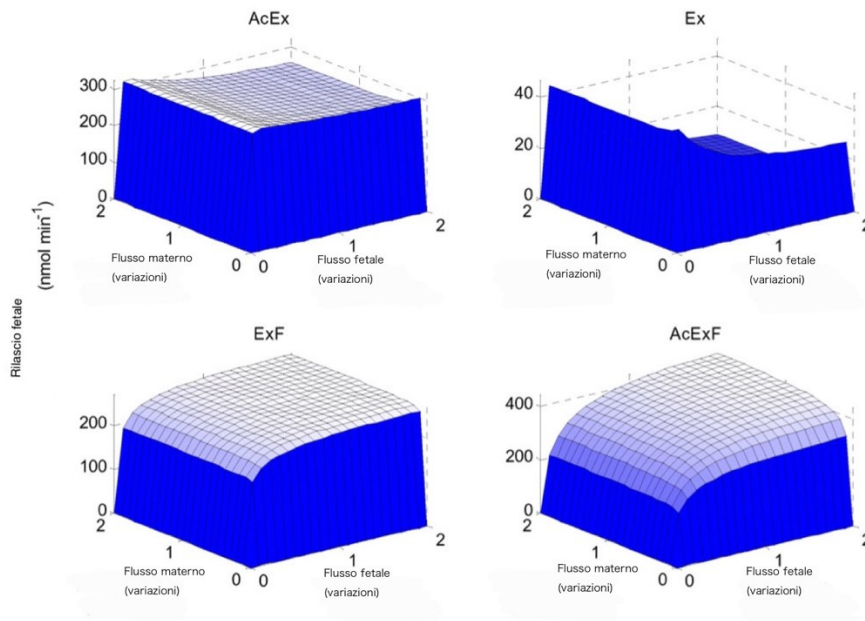


Figura 55: Analisi sensibilità flusso

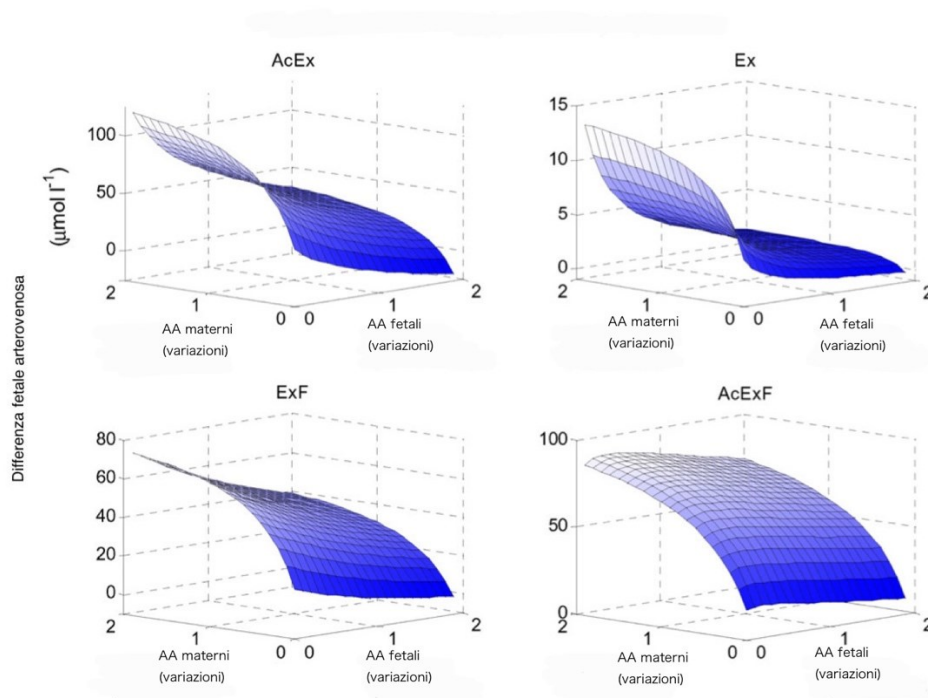


Figura 56: Effetti delle concentrazioni di aminoacidi in ingresso

4.2 DEFINIZIONE DEI PARAMETRI PER GESTAZIONI SANE

Per implementare il modello, durante la prima fase dello studio sperimentale, sui pazienti sani, ci si è avvalsi del database riportato in letteratura all'interno dell'articolo relativo al modello matematico di partenza. In particolare, mentre il modello di partenza si è soffermato su gruppi di aminoacidi, in questo lavoro di tesi, si sono analizzate le variazioni di concentrazione dei singoli aminoacidi e,

pertanto, si è fatto ricorso alle stesse equazioni, precedentemente definite. Per ogni equazione, infatti, alcuni parametri, come le costanti di dissociazione, sono stati considerati uguali per ogni aminoacido e dunque fissate; a differenza degli altri parametri che son stati variati in base alle specifiche del singolo aminoacido.

Come ampiamente evidenziato nei capitoli precedenti, gli amminoacidi per poter giungere al feto e contribuire a quello che è il suo fabbisogno, sfruttano delle proteine trasportatrici. Per l'implementazione del modello, si è adottata la classificazione dei trasportatori in termini di funzione fisiologica: accumulativi Ac aumentano la concentrazione intracellulare di amminoacidi nel sinciziotrofoblasto sfruttando un cotrasporto con il sodio; gli scambiatori Ex alterano la composizione degli amminoacidi senza variare le quantità; i facilitati F mediano il trasporto per diffusione facilitata. Questi diversi meccanismi di trasporto non sono presenti in maniera equa a livello delle due membrane di interesse; è stato, infatti, suggerito che a livello della MVM sono presenti Ac ed Ex mentre a livello della BM, Ex ed F. In virtù di questa distinzione, è stato possibile classificare i 20 amminoacidi, essenziali e non, in base alle proteine trasportatrici di cui si avvalgono per muoversi attraverso la placenta. Questa classificazione è risultata utile ai fini implementativi per considerare i diversi contributi all'interno dell'equazione.

La Tab.10 mostra, per ogni singolo amminoacido, i valori di concentrazione a livello dei tre diversi compartimenti considerando, nel caso fetale, le concentrazioni presenti in arteria e vena ombelicale. Questo in virtù del fatto che la vena ombelicale rappresenta il meccanismo attraverso cui il feto riceve le sostanze nutritive.

La Tab. 11 mostra quelli che sono i parametri utili per il calcolo delle equazioni relative ai singoli meccanismi di trasporto.

Il flusso sanguigno riveste un ruolo importante nello scambio di aminoacidi ed è stato necessario modellare anche il suo contributo considerando anche le concentrazioni degli amminoacidi in ingresso; per il flusso sanguigno fetale si è considerata la concentrazione della vena ombelicale come concentrazione in ingresso per i motivi sopra esposti; mentre, per il flusso materno, come concentrazione in ingresso, si è considerata la concentrazione del singolo amminoacido presente nell'arteria radiale materna che va a rappresentare il rifornimento placentare materno. La Tab. 12 mostra i valori delle concentrazioni utilizzate, recuperate da un database presenti in letteratura. [81]

Tabella 10: Concentrazioni aminoacidi

GRUPPO AA	NOME AA	CONCENTRAZIONE MATERNA [mumol/L]	CONCENTRAZIONE SINCIZIOTROFOBlasto [mumol/L]	CONCENTRAZIONE ARTERIA OMBELICALE [mumol/L]	CONCENTRAZIONE VENA OMBELICALE [mumol/L]
AcEx	Arginina	51	320	101	108
	Glutammina	368	1135	482	494
	Glicina	107	1655	217	218
	Istidina	85	74	108	119
	Lisina	131	508	317	343
	Serina	84	721	144	142
Ex	Treonina	170	786	258	270
ExF	Isoleucina	43	105	56	63
	Leucina	81	305	105	120
	Fenilalanina	39	173	63	65
	Tirosina	34	220	59	59
	Valina	141	342	200	216
AcExF	Alanina	215	1987	238	282

Tabella 11: Parametri utilizzati per l'implementazione dell'equazioni [78]

PARAMETRI	VALORE	UDM
Modello compartimentale		
Volume totale cotiledone placentare	30	ml
%Volume materno	34%	-
%Volume sinciziotrofoblasto	15%	-
%Volume fetale	7,5%	-
Portata sangue materno	2	ml $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$
Portata sangue fetale	0.2	ml $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$
Modelli di trasporto		
Accumulatori		
Tasso effettivo di trasporto, V_{ac}	0.005	mmol min^{-1}
Carica ione sodio, z	1	-
Costante di Faraday, F	$9.65 \cdot 10^4$	C mol^{-1}
Costante dei gas, R	8.314	VC $\text{K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Temperatura corpo, T	310	K
Differenza di potenziale transmembrana, $\Delta\Psi$	-21	mV
Concentrazione sodio materno	134	mmol l^{-1}
Concentrazione sodio sinciziotrofoblasto	15	mmol l^{-1}
Costante elettrica di bias, β	0.33	-
Costante di dissociazione del substrato, K_{ac}	2.26	mmol l^{-1}
Costante di dissociazione sodio, K_{Na}	25.07	mmol l^{-1}
MVM Scambiatore		
Velocità massima di trasporto, $V_{ex,mvm}$	0.005	mmol min^{-1}
Costante di dissociazione del substrato, K_{ex}	200	mumol min^{-1}
BM Scambiatore		
Velocità massima di trasporto, $V_{ex,bm}$	0.005	mmol min^{-1}

Costante di dissociazione del substrato, K_{ex}	200	mmol min^{-1}
Facilitati		
Velocità massima di trasporto, V_f	0.005	mmol min^{-1}
Costante di dissociazione del substrato, K_f	1000	mmol min^{-1}

Tabella 12: Concentrazioni arteria radiale [81]

GRUPPO AA	NOME AA	CONCENTRAZIONE ARTERIA RADIALE[mmol/L]
AcEx	Arginina	57.2
	Glutamina	863.0
	Glicina	111.0
	Istidina	92.1
	Lisina	143.0
	Serina	115.0
Ex	Treonina	162.0
ExF	Isoleucina	48.8
	Leucina	108.0
	Fenilalanina	49.2
	Tirosina	33.6
	Valina	157.0
AcExF	Alanina	243.0

4.3 DEFINIZIONE DEI PARAMETRI PER GESTAZIONI PATOLOGICHE

Per la seconda parte dello studio, recuperare dati relativi alle concentrazioni degli amminoacidi in gravidanze IUGR, è risultato difficile data l'estrema novità e la continua ricerca in questo campo. Pertanto, in virtù di quelle che sono le evidenze scientifiche che dimostrano una diminuzione del flusso sanguigno materno e fetale e un aumento delle concentrazioni materne di amminoacidi accompagnate da una diminuzione di queste a livello fetale, a simboleggiare un deficit nei meccanismi di trasporto, si sono andati a simulare i tassi di concentrazione, variando i parametri cinetici del modello. Per quanto concerne, invece, i valori degli amminoacidi relativi a gravidanze GDM, si è proceduto andando a variare solo ed esclusivamente i parametri cinetici al fine di riottenere

i valori di concentrazione presenti in letteratura. Per quanto concerne il flusso sanguigno, i parametri di riferimento fetali sono relativi alla vena ombelicale e all'arteria ombelicale. La prima rappresenta il vaso sottile attraverso cui il feto riceve l'ossigeno e le sostanze nutritive dalla placenta; l'arteria ombelicale media il trasporto opposto. Studi recenti, condotti su donne in gravidanza con sospetta crescita fetale ridotta, hanno mostrato, a seguito di un esame non invasivo e di una valutazione ecografica, un diametro, una velocità e un flusso a livello della vena ombelicale significativamente più bassi rispetto ai feti adeguati. Inoltre, è stata dimostrata una correlazione tra i parametri emodinamici materni e fetali dipendenti da valori di resistenza vascolari, gittata cardiaca, flusso della vena ombelicale, pulsatilità arteria ombelicale ed infine energia cinetica cardiovascolare materna. [82]

Per andare a variare il parametro del flusso sanguigno materno, che nel caso del modello implementato era considerato non pulsatile, ci si è avvalsi di quelli che sono i risultati scientifici che evidenziano come il flusso sanguigno diminuisca di circa il 12.5%. [83]

4.4 IMPLEMENTAZIONE DEL MODELLO E RELATIVI CASI DI STUDIO

4.4.1 IMPLEMENTAZIONE DEL MODELLO

L'implementazione del modello è stata svolta in Simulink, ambiente di diagrammi a blocchi utilizzato per progettare sistemi con modelli multidominio, effettuare simulazioni prima di passare all'hardware e procedere alla distribuzione senza scrivere codice [84]. Si sono modellate, attraverso dei diagrammi a blocchi, le singole equazioni differenziali, relative al modello di riferimento, dalle quali si sono poi ricavati i tassi di variazione di ogni singolo aminoacido per ogni compartimento.

Come analizzato nei capitoli precedenti, i singoli meccanismi di trasporto non operano indistintamente sia a livello della MVM che della BM; pertanto, è stato necessario implementare l'equazione differenziale non solo per singolo compartimento ma anche per singolo gruppo di aminoacidi e poi valutarla per il singolo aminoacido.

Si è considerato, come intervallo di tempo, per la simulazione che ha come istante iniziale 0 e come istante finale 500secondi.

4.4.2 CASO DELLA GESTAZIONE SANA

Inizialmente, si è proceduto considerando il caso di gestazioni sane tenendo, come riferimento, i parametri presenti nelle Tab. 10,11 e 12.

In riferimento al compartimento materno, è stata modellata l'Eq.11 e, successivamente, si è ragionato per gruppo di aminoacidi. Per il gruppo AcEx e AcExF l'equazione è stata considerata nella sua

totalità essendo questi aminoacidi trasportati a livello della MVM sia da meccanismi accumulatori che da meccanismi facilitati; Per il gruppo Ex, la seconda componente dell'equazione non è stata considerata così come per il gruppo ExF.

Per quanto concerne i parametri da dover considerare nei singoli termini dell'equazione: per il primo, come concentrazione in ingresso, si è considerata la concentrazione dello stesso aminoacido a livello dell'arteria radiale, presente in Tab.12; per il secondo e terzo termine si sono sfruttati i parametri di Tab.11. In particolare per il secondo termine, è stato necessario, per eseguire il calcolo dell'equazione differenziale, considerare coppie di aminoacidi (A e B); arbitrariamente, si sono analizzate: arginina e glutammina, glicina e istidina, lisina e serina.

In riferimento al compartimento fetale e quindi alla BM, è stata modellata l'Eq. 12. Anche in questo caso, per il gruppo di aminoacidi AcEx ed Ex, è stato trascurato l'ultimo termine, a differenza dei gruppi AcExF ed ExF. Per il primo termine, come concentrazione in ingresso, è stata considerata quella della vena ombelicale essendo questa il vaso che permette il trasferimento delle sostanze nutritive.

4.4.3 CASO DELLA GESTAZIONE COMPLICATA DA RESTRIZIONE DI CRESCITA INTRAUTERINA

Nella seconda parte dello studio, si è proceduto andando a testare il modello di riferimento su pazienti affetti da IUGR; in particolare, l'intento è stato quello, in virtù di quelle che sono le evidenze scientifiche che permettono di diagnosticare la patologia, di andare a variare i parametri cinetici relativi ai diversi meccanismi di trasporto e al flusso sanguigno. Si è pertanto testato il modello inizialmente sulle madri considerando, in base ai diversi studi effettuati, la riduzione del flusso a livello delle arterie uterine e quella che è un'alterazione dell'attività dei meccanismi di trasporto.

In particolare, si sono indagati un gruppo ristretto di aminoacidi ovvero quelli trasportati dal sistema A e del sistema L. Il sistema A va a racchiudere i meccanismi di cotrasporto, mediati dal sodio, di cui si avvalgono aminoacidi come alanina, serina, prolina e glicina. Si sono ottenuti i seguenti grafici di variazione di concentrazione a livello materno relativi ad alanina, serina e glicina andando a modulare solo il flusso sanguigno e il meccanismo di trasporto accumulatore, essendo quello che sfrutta il movimento degli ioni sodio.

Successivamente, si è proceduto andando a simulare quello che accade nei feti patologici, a livello dei quali si riscontra una diminuzione della concentrazione degli aminoacidi. È opportuno sottolineare che a livello della MVM e della BM, i meccanismi di trasporto alterati non sono gli stessi; di conseguenza, in virtù anche di quelli che sono i meccanismi di trasporto a livello della BM, non si è andati a variare il meccanismo accumulatore. In particolare, mentre nel caso materno, il flusso sanguigno tende a diminuire, nel feto questo aumenta in virtù dell'aumento della pulsatilità. Pertanto,

contrariamente a quanto fatto in precedenza, si è andato a variare il parametro relativo al flusso sanguigno, aumentando il suo valore. Per quanto riguarda gli amminoacidi, invece, si sono andate a valutare le concentrazioni di lisina e leucina in quanto, è stata dimostrata una variazione funzionale del loro meccanismo di trasporto L, a livello della BM. In particolare, con il gruppo L si vanno a considerare meccanismi di tipo scambiatore. Facendo riferimento a quelle che sono le evidenze, si è visto come, confrontando pazienti affette da IUGR e pazienti con diabete gestazionale, i meccanismi di trasporto che variano, non sono gli stessi. [85]

La Tab.13 mostra i valori dei parametri cinetici e del flusso sanguigno che son stata variati al fine di testare il modello in riferimento a quelli che sono i valori presenti in letteratura quali media e deviazione standard delle rispettive concentrazioni dei singoli aminoacidi. Per testare il modello, si son considerati diversi studi presenti in letteratura che riportavano i valori puntali relativi alle concentrazioni dei diversi aminoacidi in madri e/o feti patologici. In particolare, relativamente ad uno studio condotto nel 1996 da Cetin.I et al. [86], la popolazione è stata considerata divisa in tre gruppi rispetto all'età gestazionale mostrata in Tab.13.

Per completare la formulazione delle ipotesi al fine di testare il modello, si è tenuto in considerazione un secondo studio [87] nel quale, studiando l'assorbimento, mediante delle vescicole, di leucina e lisina, si è individuata una diminuzione del 44% relativamente all'assorbimento di lisina nella BM e anche della leucina nella MVM (riduzione del 46%) e nella BM (riduzione del 38%) ad indicare l'alterata attività dei meccanismi di trasporto per gli aminoacidi cationici neutri. Pertanto, si è proceduto andando a variare nuovamente i parametri per mostrare graficamente, quanto individuato.

Tabella 13: Suddivisione della popolazione relativamente allo studio [86]

IUGR	<i>Età gestazionale (settimane)</i>
GRUPPO 1	34.4 ± 0.8
GRUPPO 2	31.3 ± 1.0
GRUPPO 3	30.6 ± 1.3

La Tab.14 mostra i parametri cinetici e del flusso sanguigno variati, in riferimento ai due diversi studi presenti in letteratura, nel caso di gravidanze IUGR.

Tabella 14: Tabella con parametri cinetici e del flusso sanguigno variati, formulazione ipotesi per testare il modello

		Vac	Vex	Fi	Studio
ALANINA Comp.materno	GRUPPO 1	90000		1.76	[86]
	GRUPPO 2	56000		1.76	
	GRUPPO 3	1110		1.76	
GLICINA Comp.materno	GRUPPO 1	186		1.76	
	GRUPPO 2	187		1.76	
	GRUPPO 3	225		1.76	
LISINA Comp.fetale	GRUPPO 1		7155	0.5	
	GRUPPO 2		9770	0.5	
	GRUPPO 3		15050	0.5	
LEUCINA Comp.materno			88	0.0005	[87]
LEUCINA Comp.fetale			65000	0.5	
LISINA Comp.fetale			52000	10	

Per la validazione del modello, conseguentemente, si è fatto riferimento a dati sperimentali presenti in letteratura [88]. Questo studio è stato condotto sui babbuini con restrizione nutrizionale materna al fine di poter poi misurare il trasporto transplacentare in vivo. In particolare, durante il 140° giorno di gestazione, il trasporto è stato misurato infondendo nove aminoacidi essenziali marcati come bolo nella circolazione materna. È stato dimostrato come l'attività del sistema A e del sistema L nella MVM sia marcatamente ridotta nel caso di babbuini con restrizione nutrizionale. Si sono modellati i parametri cinetici e del flusso sanguigno al fine di ottenere le stesse curve sperimentali, Tab.15.

La validazione è stata possibile effettuarla solo considerando il compartimento materno ed esclusivamente per gli aminoacidi che sfruttano come meccanismo di trasporto A ed L. Per ottenere le curve relative ai pazienti IUGR sono state considerate come concentrazioni iniziali 60 $\mu\text{mol/L}$ e la concentrazione in ingresso assente.

Tabella 15: Variazione parametri cinetici e relativi al flusso sanguigno per validare il modello

	Vac	Vex	Fi	Studio
LISINA Comp.materno	0		1.76	[88]
LEUCINA Comp.materno		0	1.76	

4.4.4 CASO DELLA GESTAZIONE DA MADRE CON DIABETE GESTAZIONALE

Conseguentemente, si è proceduto andando ad applicare il modello su pazienti a cui è stato diagnosticato il diabete mellito gestazionale (GDM). Anche in questo caso, si sono considerati i sistemi di trasporto A ed L in quanto risultano essere, secondo quanto riportato in letteratura, quelli più compromessi. Per poter applicare il modello, si è fatto riferimento a dati presenti in letteratura [89] ed in particolare, si sono andati a variare i parametri esclusivamente cinetici, e non relativi al flusso sanguigno, a differenza di quanto effettuato in precedenza, per poter riottenere le curve indicanti la variazione di concentrazione degli aminoacidi nel compartimento materno e fetale. La Tab. 16 mostra i parametri adottati.

Tabella 16: Tabella con parametri cinetici variati, formulazione ipotesi per testare il modello

	Vac	Vex	Fi	Studio
ALANINA Comp.materno	715			[89]
LEUCINA Comp.materno		3820		
LISINA Comp.fetale		0.00005		
LEUCINA Comp.fetale		0.0005		

Per la validazione del modello, conseguentemente, si è fatto riferimento a dati presenti in letteratura che mirano a valutare l’assorbimento di leucina in donne AGA e in donne a cui è stato diagnosticato il diabete. In particolare, nello studio, [90] si è confrontata l’attività dei meccanismi di trasporto A ed L non solo in gravide diabetiche ma anche in feti con macrosomia fetali e madri diabetiche. Si è riscontrato come, in queste ultime, il numero dei trasportatori sia notevolmente ridotto. La Tab.17 mostra i parametri usati per la validazione.

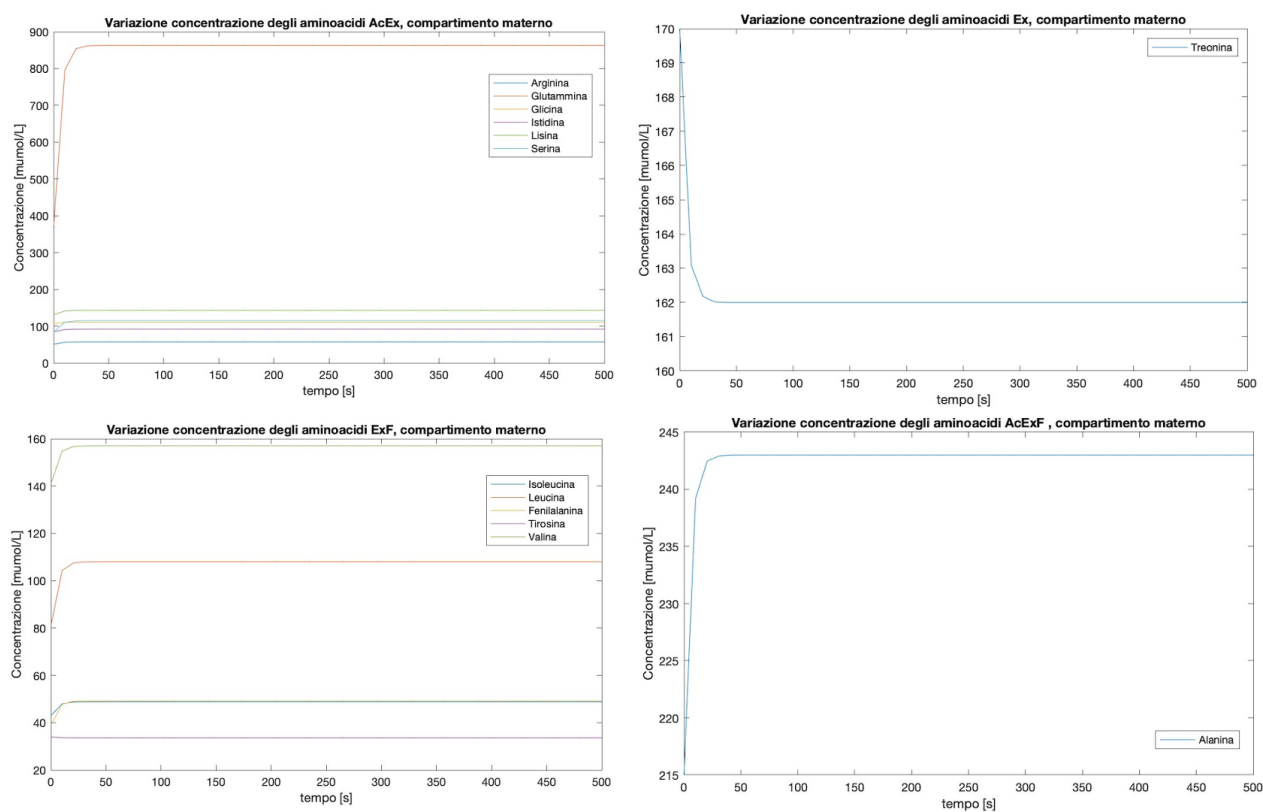
Tabella 17: Variazione parametri cinetici, validazione modello

	Vfa	Vex	Studio
LEUCINA (AGA) Comp.fetale		7	[90]
LEUCINA (GDM) Comp.fetale		10	

4.5 RISULTATI

La Fig.58 mostra la simulazione relativa alla variazione delle diverse concentrazioni dei singoli aminoacidi nel compartimento materno e la Fig.59 nel compartimento fetale.

Figura 58: Simulazione variazione di concentrazione dei singoli aminoacidi, compartimento materno



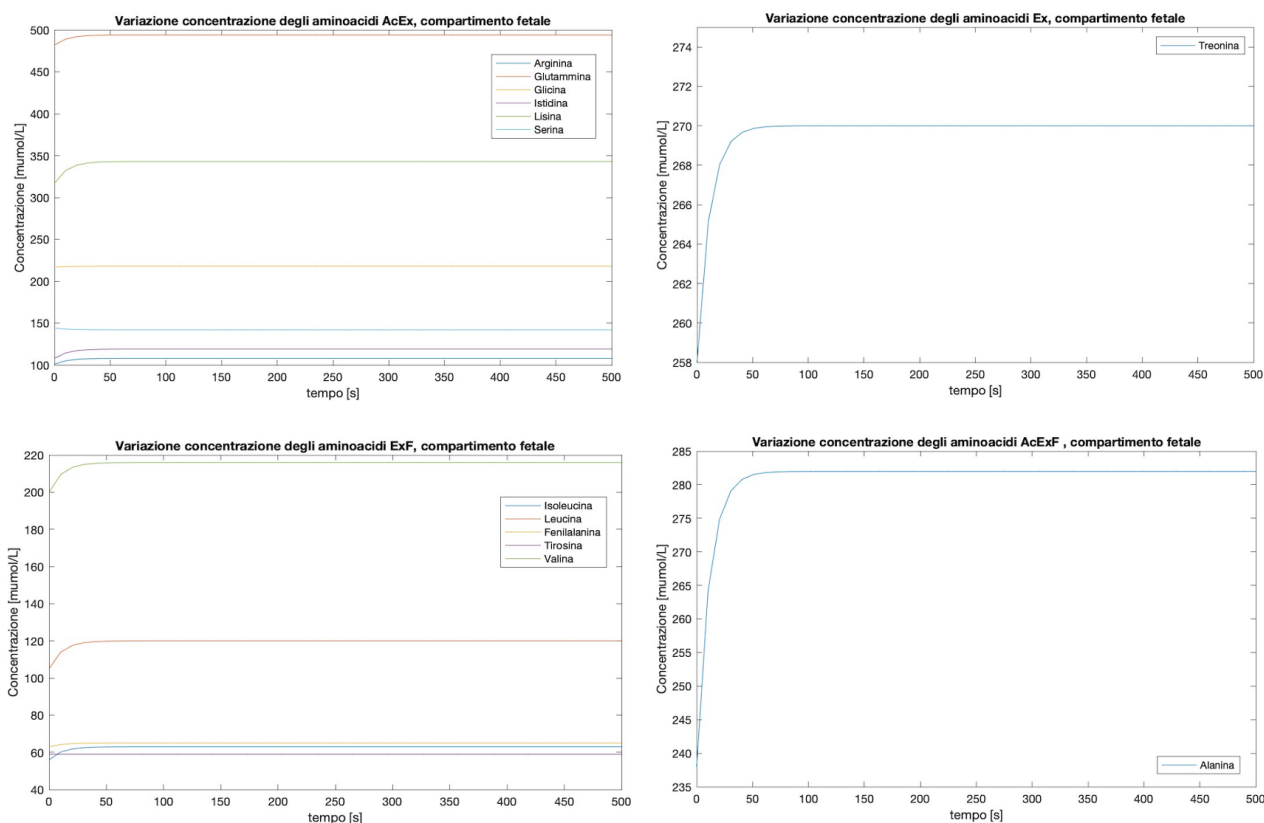


Figura 59: Simulazione variazione di concentrazione dei singoli aminoacidi, compartimento fetale

Le Fig.60, 61 e 62 mostrano le simulazioni relative alle variazioni di concentrazioni inerenti agli aminoacidi quali alanina e glicina per il compartimento materno e lisina per quello fetale, in riferimento allo studio [86].

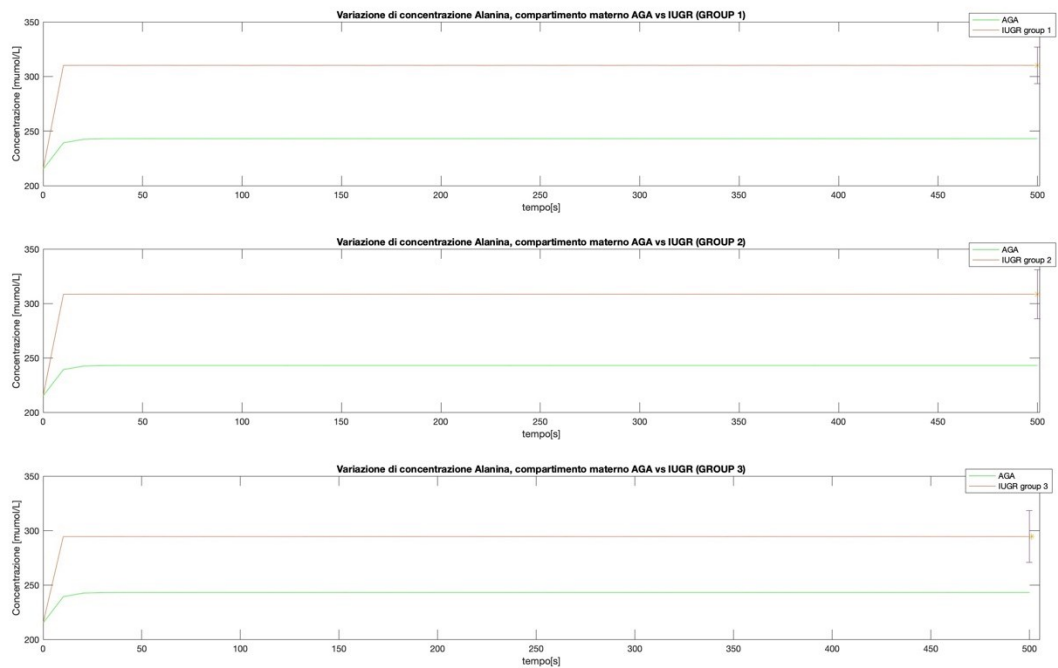


Figura 60: Simulazione della variazione di concentrazione dell'alanina, compartimento materno; AGA vs IUGR [86]

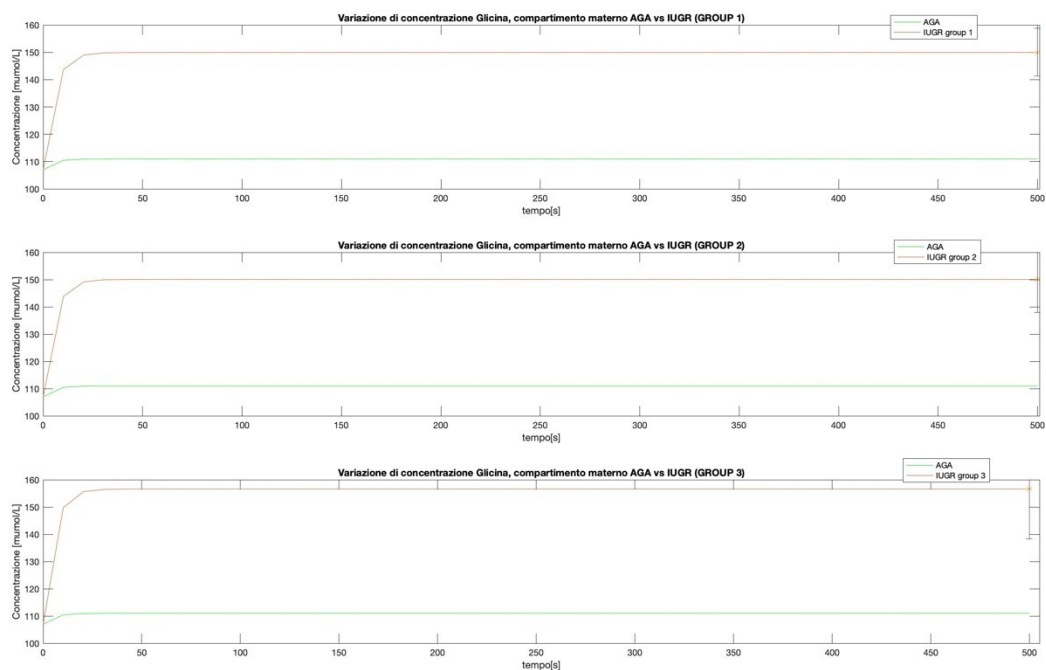


Figura 61: Simulazione della variazione di concentrazione della glicina, compartimento materno; AGA vs IUGR [86]

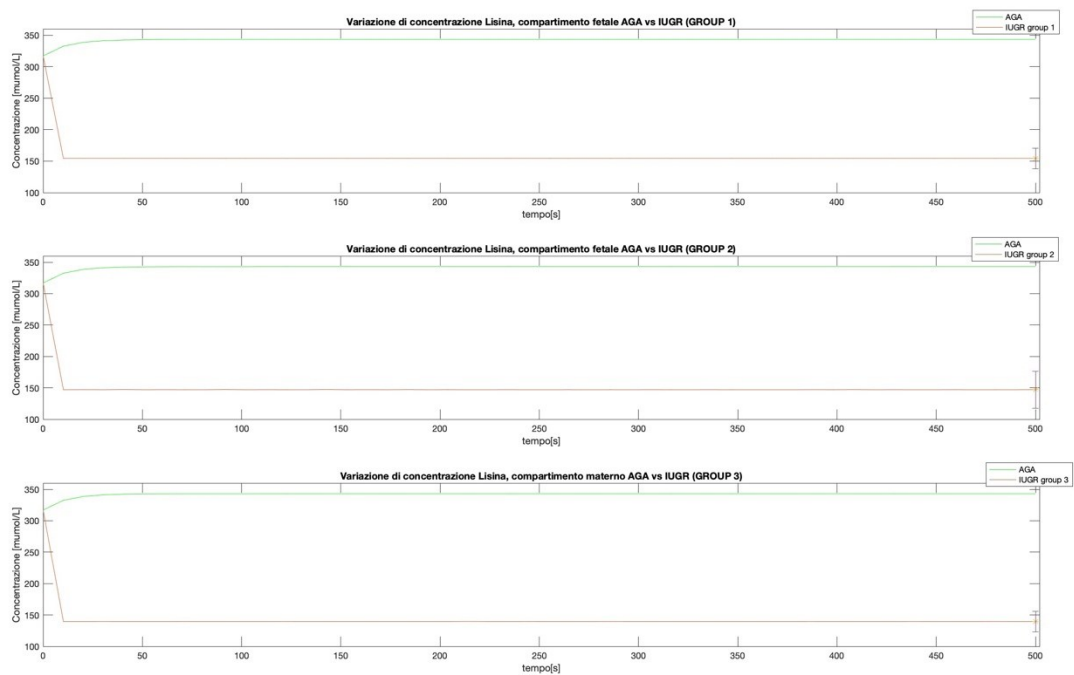


Figura 62: Simulazione della variazione di concentrazione della lisina, compartimento fetale; AGA vs IUGR [86]

Le Fig.63 e 64 mostrano le simulazioni relative alla variazione di concentrazione degli aminoacidi, leucina nel compartimento materno e lisina e leucina nel compartimento fetale in riferimento allo studio [87].

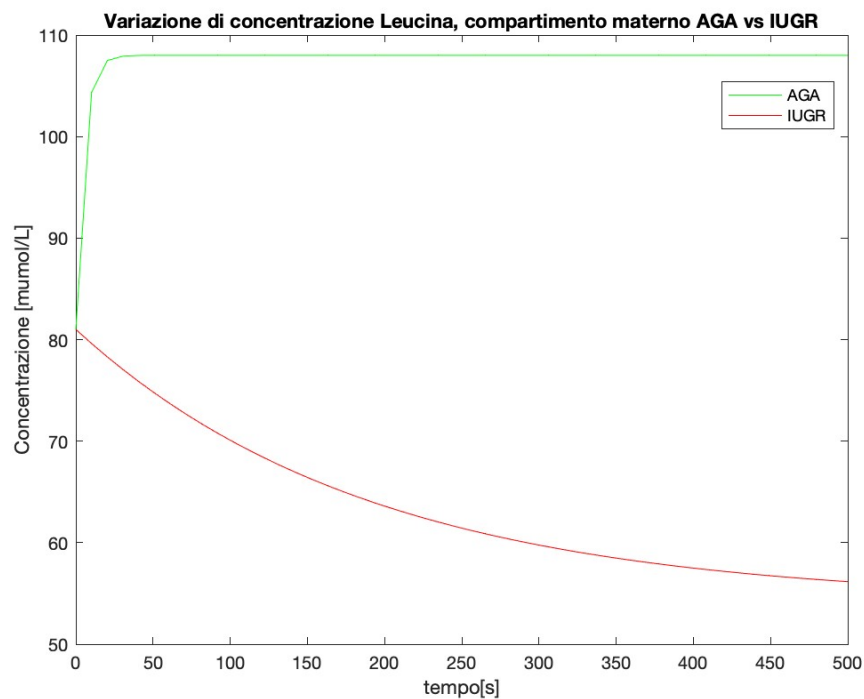


Figura 63: Simulazione della variazione di concentrazione della leucina, compartimento materno; AGA vs IUGR [87]

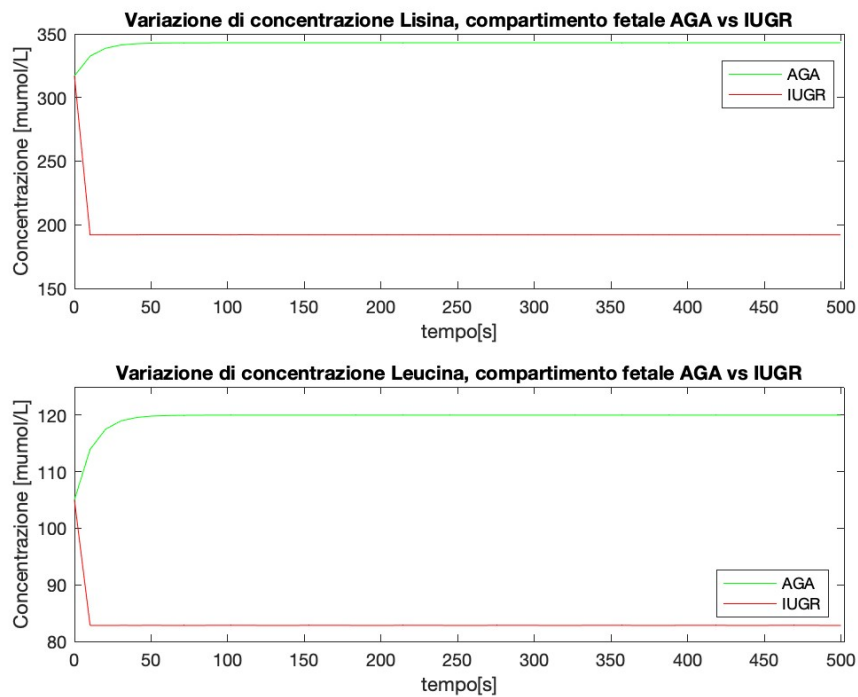


Figura 64: Simulazione della variazione di concentrazione della lisina e della leucina, compartimento fetale; AGA vs IUGR [87]

La Fig.65 mostra la curva di simulazione ottenuta considerando i valori cinetici e di flusso sanguigno presenti in Tab.15, al fine di validare il modello, in riferimento allo studio [88].

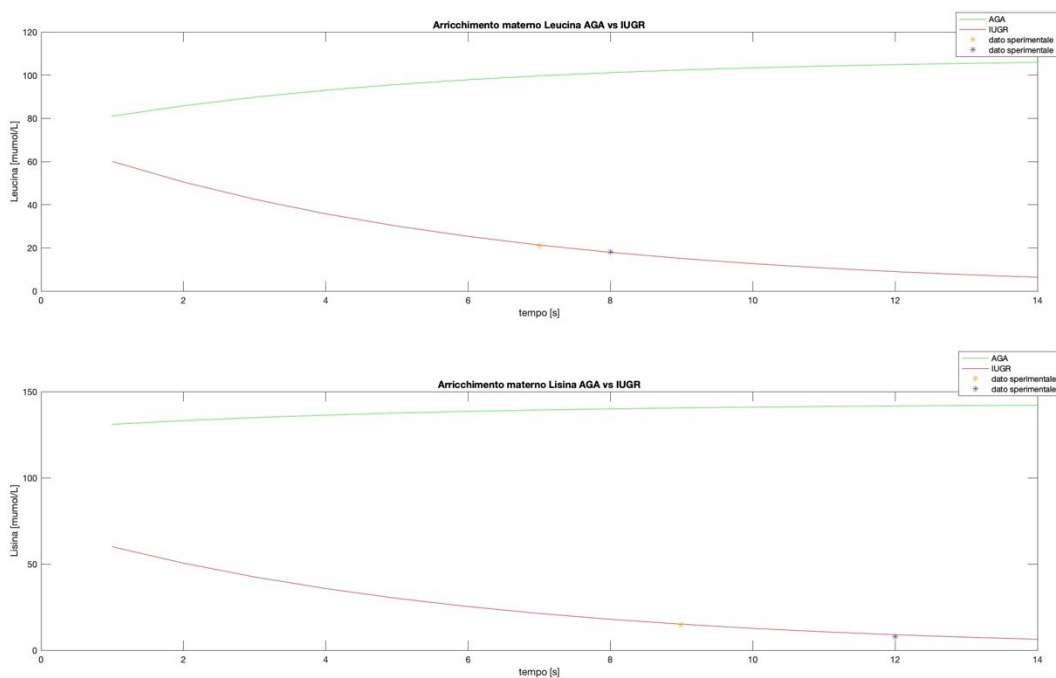


Figura 65: Curva di validazione modello, gravidanza IUGR [88]

Le Fig. 66 e 67 mostrano le variazioni di concentrazione degli aminoacidi alanina e leucina, nel caso del compartimento materno, e leucina e lisina, nel caso del fetale, in condizioni di gravidanza GDM; i parametri di riferimento adottati sono quelli presenti in Tab.16

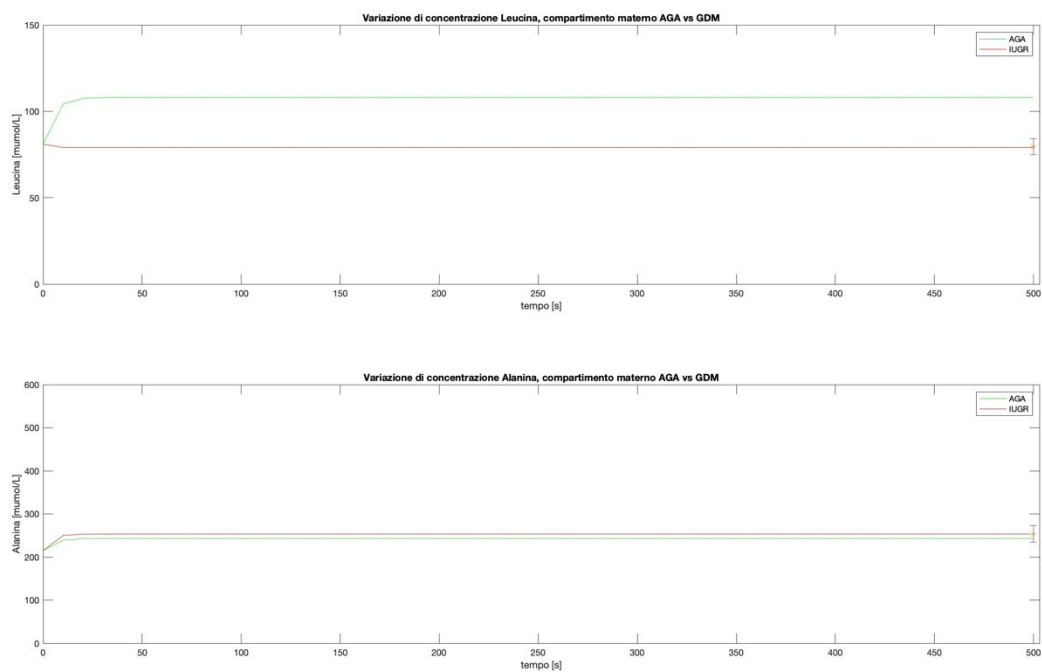


Figura 66: Simulazione della variazione di concentrazione della leucina ed alanina, compartimento materno AGA vs GDM [89]

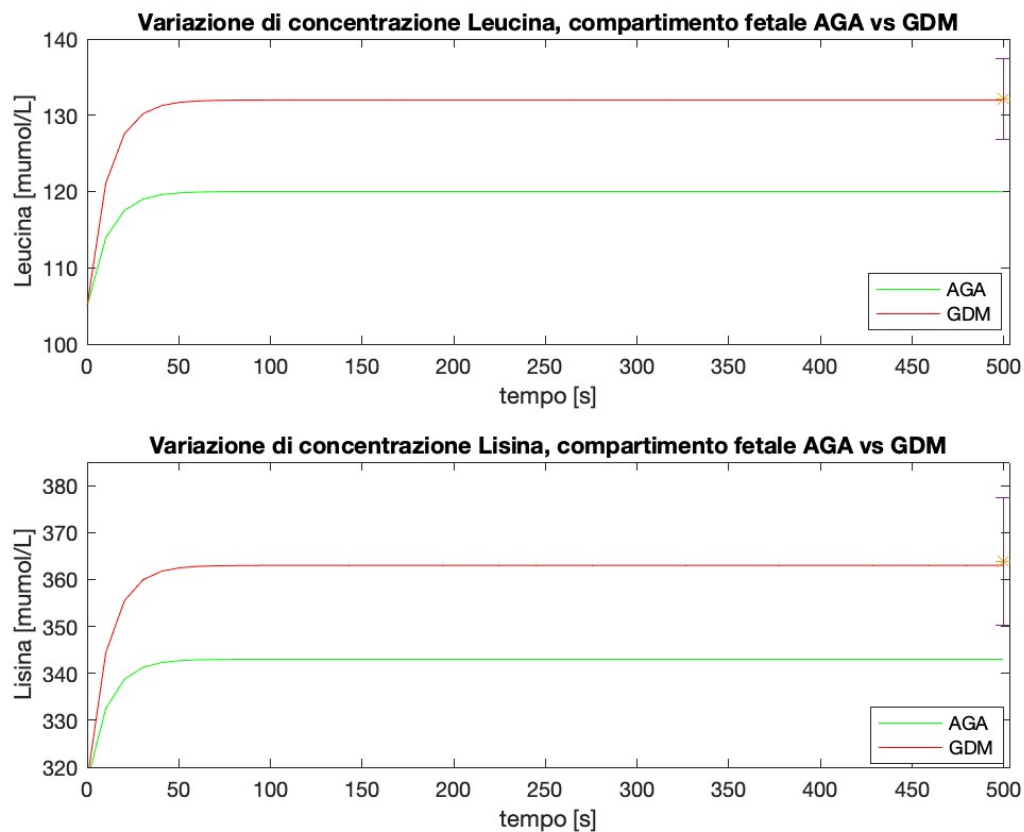


Figura 67: Simulazione variazione di concentrazione leucina e lisina, compartimento fetale AGA vs GDM [89]

La Fig. 68, infine, mostra la curva di simulazione relativa allo studio adottato per la validazione del modello, in caso di gravidanza GDM. [90]

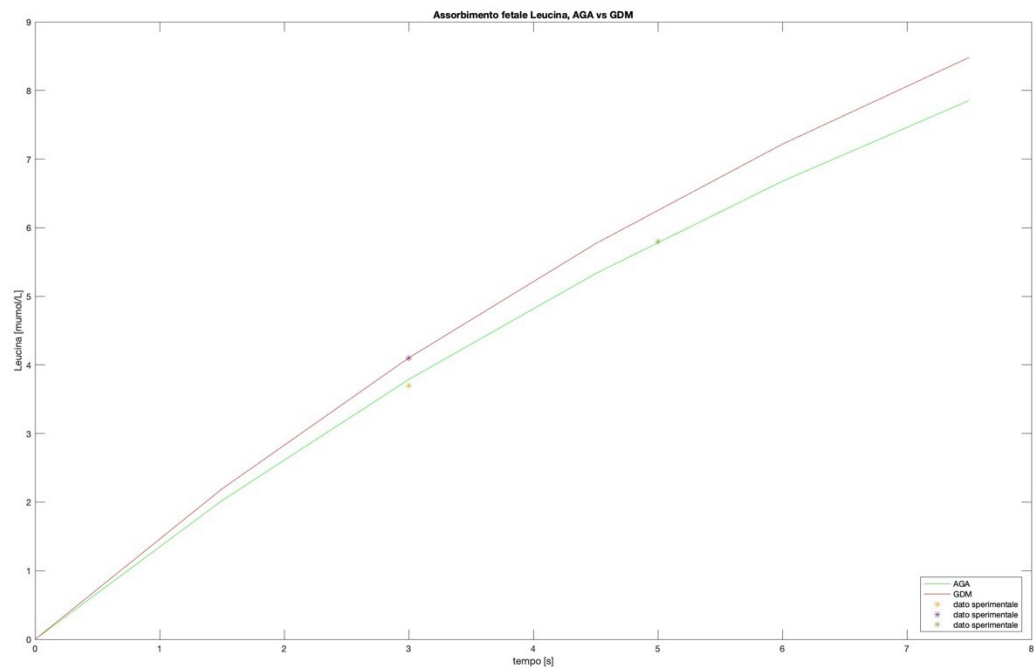


Figura 68: Curva di validazione modello, gravidanza GDM [90]

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

L'obiettivo di questo studio è stato quello di simulare il trasporto degli aminoacidi, essenziali e non, a livello della MVM, membrana microvillosa, e al livello BM, membrana basale.

Per effettuare tale simulazione, ci si è avvalsi del modello matematico implementato nel 2016 da Panitchob. A differenza di questo, che effettuava l'analisi veniva effettuata considerando interi gruppi di aminoacidi, questo lavoro di tesi si è soffermato sui singoli aminoacidi al fine di valutarne il meccanismo di trasporto. Successivamente a questa prima fase sperimentale, si è proceduto, in aggiunta a quanto presente in letteratura relativamente al modello di partenza, andando a testare il modello anche su donne a cui è stato diagnosticato un ritardo di crescita intrauterino, IUGR o il diabete mellito gestazionale (GDM). Queste patologie, attualmente, risultano essere gli aspetti di maggior ricerca non solo in virtù di quella che è l'incidenza sulla popolazione italiana ma, soprattutto, perché, al momento, risultano essere ancora poco chiare le interdipendenze tra le cause scatenanti e come il trasporto placentare possa influenzare la condizione patologica.

Studi precedenti, condotti su modelli animali, hanno riscontrato una correlazione tra quello che è il trasporto di amminoacidi a livello placentare e quella che è una gravidanza IUGR. È stata infatti rilevata una diminuzione della concentrazione degli amminoacidi a livello fetale ma non è ancora possibile comprendere pienamente se questa sia una conseguenza o una causa della stessa patologia. In particolare, si ritiene che la riduzione del flusso sanguigno utero-placentare e ombelicale sia una delle cause della patologia; infatti, si ha che un aumento di quella che è la resistenza vascolare a livello delle arterie uterine vada a rallentare il flusso sanguigno, anch'esso responsabile del trasporto degli amminoacidi, determinando pertanto un accumulo delle sostanze nutritive a livello dell'interfaccia materno-placentare e, conseguentemente, una riduzione della concentrazione a livello fetale. Si ritiene, inoltre, che questo sia correlato a quella che è la riduzione fetale anche della stessa concentrazione di ossigeno che può comportare danni permanenti al feto. Contrariamente, nel caso GDM, altri studi hanno dimostrato la sola ed esclusiva alterazione di concentrazione negli aminoacidi fetali, non accompagnata però da riduzioni di flusso sanguigno.

Si comprende, dunque, quanto tutti questi aspetti siano interconnessi tra di loro e in virtù di questo, lo studio si è posto come uno strumento di supporto a quelli che potranno essere gli sviluppi futuri della ricerca al fine di individuare i "metabolomic markers" delle singole patologie.

Per la prima parte dello studio sperimentale, l'implementazione del modello è stata portata a termine per tutti i singoli amminoacidi a livello materno e fetale.

Tutti gli amminoacidi, nel primo compartimento, mostrano un aumento di quella che è la loro concentrazione fino a giungere ad una fase di stabilità, rappresentata graficamente dal tratto di

plateau. Questo non è stato riscontrato nel caso della tirosina e treonina; nelle loro simulazioni, al contrario, si rileva una diminuzione di concentrazione che potrebbe essere indice di un mancato assorbimento placentare. I risultati ottenuti confermano quanto ottenuto nello studio di Holm et al. [84] nel quale si era andata a calcolare la differenza arterovenosa a livello utero placentare e la differenza arterovenosa a livello ombelicale. Una differenza positiva era indice, nel caso materno, di un assorbimento placentare dalla circolazione materna mentre, nel caso fetale, di un assorbimento dalla circolazione ombelicale. Una differenza negativa era indice di un rilascio: uteroplacentare verso la circolazione materna o fetale verso la circolazione ombelicale. La tirosina e la treonina sono due amminoacidi che, nello studio di Holm, presentano una differenza di concentrazione a livello materno negativa ad indicare il rilascio dell'amminoacido verso la circolazione. Attraverso la simulazione, è stato possibile osservare questa diminuzione di concentrazione. A livello fetale, tutti gli amminoacidi hanno mostrato un aumento di concentrazione fino a giungere ad una fase di stabilità ad eccezione della serina; anche in questo caso il risultato concorda con lo studio precedente.

In generale, per ogni amminoacido, è possibile rilevare valori di concentrazione fetali maggiori rispetto a quelli materni: questo è indice di un meccanismo di trasporto attivo ed efficiente che garantisce un costante apporto nutritivo al feto.

Per quanto concerne, invece, la seconda parte dello studio, è stato possibile implementare ed avvalersi del modello anche in condizioni patologiche, cosa che non era stata mai effettuata in precedenza, andando a dimostrare come, variando opportunamente i parametri cinetici e/o relativi al flusso sanguigno secondo quanto espresso in letteratura, il modello risulta essere efficiente anche in altri casi.

È opportuno rilevare come, nonostante in entrambi i casi patologici, ad essere alterati siano sia il funzionamento del sistema di trasporto A che del sistema di trasporto L, la variazione di concentrazione non risulta essere la medesima. Infatti, nel caso della patologia IUGR si assiste ad un aumento della concentrazione materna e ad una diminuzione della concentrazione fetale ad indicare il mancato apporto di nutrienti al feto non permettendo una idonea e coerente crescita dello stesso; nel caso della patologia GDM, di contro, si assiste ad una non esorbitante variazione di concentrazione materna ma ad un aumento della concentrazione fetale oltre i limiti della condizione normale e ciò conferma quanto riportato in letteratura. In particolare, l'aumento della concentrazione fetale nel caso di gravidanze GDM risulta essere associata ad una elevata sintesi proteica tipica di tessuti in rapida crescita; questo suggerisce, pertanto, un alterato metabolismo amminoacidico a livello placentare e fetale.

Questo risulta evidente anche dai valori cinetici variati nel caso delle due patologie: mentre nell'IUGR si assiste ad una riduzione dell'attività dei meccanismi di trasporto, nel caso GDM si rileva

un aumento dell'attività trasportatrice. Nel caso della prima patologia, infatti, la riduzione dell'attività dei meccanismi di trasporto è dovuta ad una diminuzione dell'espressione delle proteine trasportatrici SNAT 1 e SNAT 2 a livello della MVM. Inoltre, è stato possibile individuare, come non ci siano differenze significative in termini di variazione concentrazione confrontando pazienti con diverse età gestazionali. Proseguendo lo studio, potrebbe risultare interessante valutare come l'alterazione nel meccanismo di trasporto degli aminoacidi influenzi l'attività delle proteine trasportatrici del glucosio (GLUT). Al momento, però, non è ancora ben chiaro se la riduzione dell'attività di trasporto sia una causa o una conseguenza della patologia.

L'intento dello studio è stato dunque quello di analizzare le variazioni di concentrazione dei singoli aminoacidi in gravidanze sane ma, soprattutto, di ricorrere ad una modellizzazione matematica. Questo studio, in virtù dei suoi obiettivi, è il risultato della commistione di due grandi discipline quali la bioingegneria e la metabolomica per via dell'utilizzo di modelli come sistemi di supporto alla decisione clinica e l'applicazione degli stessi nell'ambito biochimico. In particolare, la metabolomica, definita come la scienza del terzo millennio, è una branca della scienza che mira ad accertare, tramite le sue analisi, la presenza di squilibri biochimici causati dalla carenza di nutrienti necessari per il fabbisogno dell'organismo. Grazie a questa, è quindi possibile individuare le vere cause di ogni malattia cronica e ripristinare l'equilibrio biochimico di un organismo. In relazione allo studio, attualmente si sta cercando di avvalersi di un approccio metabolomico per indagare l'alterazione della concentrazione di aminoacidi; in questo caso, contrariamente, ci si è avvalsi della ricerca prettamente scientifica sfruttando equazioni matematiche.

Questo fa riflettere su quanto, il connubio tra le scienze del nuovo millennio, potrebbe apportare numerose novità in campo medico individuando, come già ampiamente evidenziato, nuovi biomarcatori per disturbi metabolici complessi che possano aiutare il medico nella fase di prevenzione e/o di follow-up.

BIBLIOGRAFIA

- [1] K.J.Denniston, J.J. Topping, R.L.Caret. Chimica Generale, Chimica Organica, Propedeutica chimica. McGraw-Hill. 2012. Prima
- [3] J.G.Smith. Fondamenti di chimica organica. McGraw-Hill. 2018. Terza
- [4] W.H.Brown, T.Poon. Introduzione alla chimica organica. Edises. 2014. Quinta
- [5] Siliprandi, Tettamanti. Biochimica medica: strutturale, metabolica e funzionale. Piccin. 1996. Terza
- [6] Wade. Fondamenti di chimica organica. Piccin. 2014. Prima
- [7] P.Atkins, L.Jones, L.Laverman. Principi di chimica. Zanichelli. 2018. Quarta
- [8] J.McMurry. Chimica Organica. Piccin. 2012. Ottava
- [9] K.Peter, C.Vollhardt, N.E.Schore. Chimica Organica. Zanichelli. 2016. Quarta
- [10] L.Sherwood. Fisiologia Umana. Zanichelli. 2008
- [11] C.Casella, V.Taglietti. Principi di Fisiologia. La Goliardica Pavese s.r.l. 1996. Volume I
- [13] M.Barbieri, P.Carnici. Embriologia. Casa Editrice Ambrosiana. 2015. Terza
- [14] Martini, Bartholomew. Elementi di anatomia, istologia e fisiologia dell'uomo. Edises. 2007. Prima
- [15] E,P.Widmaier, H.Raff, K.T.Strang. Vander Fisiologia. Casa editrice Ambrosiana. 2018. Seconda
- [16] Vanputte, Regan, Russo. Anatomia Umana. Sorbona. 2018. Quarta
- [17] Dee Unglaub Silverthorn. Fisiologia umana, un approccio integrato. Pearson. 2020. Ottava
- [20] V.Taglietti, e altri. Fondamenti di Fisiologia, generale e integrata. Edises. 2019. Prima
- [21] Bowman C.E., Arany Z., & Wolfgang M. J. (2021). Regulation of maternal–fetal metabolic communication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(4), 1455-1486. doi:10.1007/s00018-020-03674-w
- [22] Emogasanalisi cordonale (EGA), equilibrio acido-base fetale ed interpretazione dei risultati; Simona Pesce (terapia intensiva neonatale, Dipartimento Materno-Infantile Aorn San Carlo Potenza Regione Basilicata).
- [25] Macnab W. R. (2022). Functions of the placenta. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 23(6), 344-346. doi:10.1016/j.mpaic.2022.03.003
- [26] MARSILII G., & OGIER E. (1955). Synthesis of amino acids in the human placenta at term.
- [27] Bonow R.O. et al. Malattie del cuore di Braunwald. Elsevier. 2012. Nona
- [28] Lewis R.M., Brooks S., Crocker I.P., Glazier J., Hanson M.A., Johnstone E.D., . . . Sengers B.G. (2013). Review: Modelling placental amino acid transfer - from transporters to placental function. *Placenta*, 34(SUPPL), S46-S51. doi:10.1016/j.placenta.2012.10.010

- [29] Dancis, J., Money, W. L., Springer, D., & Levitz, M. (1968). Transport of amino acids by placenta. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 101(6), 820-829. doi:10.1016/0002-9378(68)90038-0
- [30] Cetin, I., Nobile De Santis, M. S., Taricco, E., Radaelli, T., Teng, C., Ronzoni, S., . . . Pardi, G. (2005). Maternal and fetal amino acid concentrations in normal pregnancies and in pregnancies with gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 192(2), 610-617. doi:10.1016/j.ajog.2004.08.011
- [31] Smith, C. H., Adcock 3rd., E. W., Teasdale, F., Meschia, G., & Battaglia, F. C. (1973). Placental amino acid uptake: Tissue preparation, kinetics, and preincubation effect. *The American Journal of Physiology*, 224(3), 558-564. doi:10.1152/ajplegacy.1973.224.3.558
- [32] Schneider, H., & Dancis, J. (1974). Amino acid transport in human placental slices. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 120(8), 1092-1098. doi:10.1016/0002-9378(74)90155-0
- [33] Steel, R. B., Smith, C. H., & Kelley, L. K. (1982). Placental amino acid uptake. VI. regulation by intracellular substrate. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 12(1), C46-C51. doi:10.1152/ajpcell.1982.243.1.c46
- [34] Regnault, T. R. H., De Vrijer, B., & Battaglia, F. C. (2002). Transport and metabolism of amino acids in placenta. *Endocrine*, 19(1), 23-41. doi:10.1385/ENDO:19:1:23
- [35] Smith, C. H. (1986). Mechanisms and regulation of placental amino acid transport. *Federation Proceedings*, 45(10), 2443-2445.
- [36] Glazier, Jocelyn d, Sibley, Colin P. (2006). In vitro methods for studying human placental amino acid transport: placental plasma membrane vesicles. *Methods in molecular medicine*. Volume 122. 241-252
- [37] Greenwood, Susan L, Sibley, Colin P. (2006). In vitro methods for studying human placental amino acid transport placental villous fragments. *Methods in molecular medicine*. Volume 122. 253-264
- [38] Kanai, Y. (2022). Amino acid transporter LAT1 (SLC7A5) as a molecular target for cancer diagnosis and therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics*, 230 doi:10.1016/j.pharmthera.2021.107964
- [39] Grillo, M. A., Lanza, A., & Colombatto, S. (2008). Transport of amino acids through the placenta and their role. *Amino Acids*, 34(4), 517-523. doi:10.1007/s00726-007-0006-5
- [40] Bröer, S. (2002). Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 444(4), 457-466. doi:10.1007/s00424-002-0840-y

- [41] Gruenwald, P. (1963). Chronic Fetal Distress And Placental Insufficiency. *Biologia Neonatorum.Neo-Natal Studies*, 5, 215-265. Retrieved from www.scopus.com
- [42] Resnik, R. (2002). Intrauterine growth restriction. *Obstetrics and Gynecology*, 99(3), 490-496. doi:10.1016/S0029-7844(01)01780-X
- [43] Lubchenco, L. O., Hansman, C., Dressler, M., & Boyd, E. (1963). Intrauterine Growth As Estimated From Liveborn Birth-Weight Data At 24 To 42 Weeks Of Gestation. *Pediatrics*, 32, 793-800.
- [44] Ferrazzi, E., Nicolini, U., Kustermann, A., & Pardi, G. (1986). Routine obstetric ultrasound: Effectiveness of cross-sectional screening for fetal growth retardation. *Journal of Clinical Ultrasound*, 14(1), 17-22. doi:10.1002/jcu.1870140105
- [45] Cleal, J. K., & Lewis, R. M. (2008). The mechanisms and regulation of placental amino acid transport to the human foetus. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(4), 419-426. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01662.x
- [46] Mayhew, T. M., Ohadike, C., Baker, P. N., Crocker, I. P., Mitchell, C., & Ong, S. S. (2003). Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. *Placenta*, 24(2-3), 219-226. doi:10.1053/plac.2002.0900
- [48] Haram, K., Sfteland, E., & Bukowski, R. (2006). Intrauterine growth restriction. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 93(1), 5-12. doi:10.1016/j.ijgo.2005.11.011
- [49] Unterscheider, J., Daly, S., Geary, M. P., Kennelly, M. M., McAuliffe, F. M., O'Donoghue, K., . . . Malone, F. D. (2013). Optimizing the definition of intrauterine growth restriction: The multicenter prospective PORTO study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 208(4), 290.e1-290.e6. doi:10.1016/j.ajog.2013.02.007
- [50] Iposviluppo fetale: diagnosi e monitoraggio eleonora pilloni, Dirigente medico Uoc Ostetricia e Ginecologia 3 Ospedale Sant'Anna Torino Simona Bastonero, Elena Gullino, Andrea Sciarrone, Dirigenti medici Ostetricia e Ginecologia, Centro di Ecografia Ospedale Sant'Anna Torino Elsa Viora, Presidente Aogoi
- [52] Regnault, T. R. H., Friedmann, J. E., Wilkening, R. B., Anthony, R. V., & Hay Jr., W. W. (2005). Fetoplacental transport and utilization of amino acids in IUGR - A review. *Placenta*, 26(SUPPL.), S52-S62. doi:10.1016/j.placenta.2005.01.003
- [53] Gaccioli, F., & Lager, S. (2016). Placental nutrient transport and intrauterine growth restriction. *Frontiers in Physiology*, 7(FEB) doi:10.3389/fphys.2016.00040

- [54] Chassen, S., & Jansson, T. (2020). Complex, coordinated and highly regulated changes in placental signaling and nutrient transport capacity in IUGR. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866(2) doi:10.1016/j.bbadis.2018.12.024
- [55] Avagliano, L., Garò, C., & Marconi, A. M. (2012). Placental amino acids transport in intrauterine growth restriction. *Journal of Pregnancy*, 2012 doi:10.1155/2012/972562
- [56] Shibata E, Hubel CA, Powers RW, von Versen-Hoeynck F, Gammill H, Rajakumar A, Roberts JM. Placental system A amino acid transport is reduced in pregnancies with small for gestational age (SGA) infants but not in preeclampsia with SGA infants. *Placenta*. 2008 Oct;29(10):879-82. doi: 10.1016/j.placenta.2008.07.001. Epub 2008 Aug 20. PMID: 18718657; PMCID: PMC2703008.
- [57] Pantham P, Rosario FJ, Weintraub ST, Nathanielsz PW, Powell TL, Li C, Jansson T. Down-Regulation of Placental Transport of Amino Acids Precedes the Development of Intrauterine Growth Restriction in Maternal Nutrient Restricted Baboons. *Biol Reprod*. 2016 Nov;95(5):98. doi: 10.1095/biolreprod.116.141085. Epub 2016 Sep 7. PMID: 27605346; PMCID: PMC5178152.
- [58] Dimasuay KG, Boeuf P, Powell TL, Jansson T. Placental Responses to Changes in the Maternal Environment Determine Fetal Growth. *Front Physiol*. 2016 Jan 29;7:12. doi: 10.3389/fphys.2016.00012. PMID: 26858656; PMCID: PMC4731498.
- [60] Lapolla, A., & Mosca, A. (2012). Screening and diagnosis of gestational diabetes: Recommendations defined. [Screening e diagnosi del diabete gestazionale: Definite le raccomandazioni] *Biochimica Clinica*, 36(1), 12-14. Retrieved from www.scopus.com
- [61] IL DIABETE GESTAZIONALE: CRITERI DIAGNOSTICI www.associazionemediciendocrinologi.it marzo 2012
- [62] Annunziata Lapolla, Andrea Mosca Screening e diagnosi del diabete gestazionale: definite le raccomandazioni ; *Biochimica clinica*, 2012, vol. 36, n. 1
- [63] Herbert Valensise, Giulia Gagliardi, Francesco Altomare MANAGEMENT DEL DIABETE GESTAZIONALE Unita' Organizzativa di Patologia Ostetrica Universita' di Roma Tor Vergata Ospedale Fatebenefratelli Isola Tiberina – Roma
- [64] Vladu, I. M., Clenciu, D., Mitrea, A., Amzoloni, A., Micu, S. E., Crisan, A. E., . . . Mota, M. (2022). Maternal and fetal metabolites in gestational diabetes mellitus: A narrative review. *Metabolites*, 12(5) doi:10.3390/metabo12050383
- [65] O'Neill K, Alexander J, Azuma R, Xiao R, Snyder NW, Mesaros CA, Blair IA, Pinney SE. Gestational Diabetes Alters the Metabolomic Profile in 2nd Trimester Amniotic Fluid in a Sex-Specific Manner. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 10;19(9):2696. doi: 10.3390/ijms19092696. PMID: 30201937; PMCID: PMC6165183.

- [66] Thomas Jansson, Ylva Ekstrand, Caroline Björn, Margareta Wennergren, Theresa L. Powell; Alterations in the Activity of Placental Amino Acid Transporters in Pregnancies Complicated by Diabetes . *Diabetes* 1 July 2002; 51 (7): 2214–2219. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2214>
- [67] Cleal, J. K., Glazier, J. D., Ntani, G., Crozier, S. R., Day, P. E., Harvey, N. C., . . . Lewis, R. M. (2011). Facilitated transporters mediate net efflux of amino acids to the fetus across the basal membrane of the placental syncytiotrophoblast. *Journal of Physiology*, 589(4), 987-997. doi:10.1113/jphysiol.2010.198549
- [68] Cleal, J. K., & Lewis, R. M. (2008). The mechanisms and regulation of placental amino acid transport to the human foetus. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(4), 419-426. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01662.x
- [69] Cleal, J. K., Lofthouse, E. M., Sengers, B. G., & Lewis, R. M. (2018). A systems perspective on placental amino acid transport. *Journal of Physiology*, 596(23), 5511-5522. doi:10.1113/JP274883
- [70] Sengers, B. G., Please, C. P., & Lewis, R. M. (2010). Computational modelling of amino acid transfer interactions in the placenta. *Experimental Physiology*, 95(7), 829-840. doi:10.1113/expphysiol.2010.052902
- [71] Lewis, R. M., Brooks, S., Crocker, I. P., Glazier, J., Hanson, M. A., Johnstone, E. D., . . . Sengers, B. G. (2013). Review: Modelling placental amino acid transfer - from transporters to placental function. *Placenta*, 34(SUPPL), S46-S51. doi:10.1016/j.placenta.2012.10.010
- [72] Perazzolo, S., Lewis, R. M., & Sengers, B. G. (2016). Modelling nutrient transfer based on 3D imaging of the human placental microstructure. Paper presented at the *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS*, , 2016-October 5953-5956. doi:10.1109/EMBC.2016.7592084
- [73] Lewis, R. M., Cleal, J. K., & Sengers, B. G. (2020). Placental perfusion and mathematical modelling. *Placenta*, 93, 43-48. doi:10.1016/j.placenta.2020.02.015
- [74] Perazzolo, S., Lewis, R. M., & Sengers, B. G. (2017). Modelling the effect of intervillous flow on solute transfer based on 3D imaging of the human placental microstructure. *Placenta*, 60, 21-27. doi:10.1016/j.placenta.2017.10.003
- [75] Sengers, B. G., Please, C. P., & Lewis, R. M. (2010). Computational modelling of amino acid transfer interactions in the placenta. *Experimental Physiology*, 95(7), 829-840. doi:10.1113/expphysiol.2010.052902
- [76] Widdows, K. L., Panitchob, N., Crocker, I. P., Please, C. P., Hanson, M. A., Sibley, C. P., . . . Glazier, J. D. (2015). Integration of computational modeling with membrane transport studies reveals new insights into amino acid exchange transport mechanisms. *FASEB Journal*, 29(6), 2583-2594. doi:10.1096/fj.14-267773

- [77] Wheeler, M. L., & Oyen, M. L. (2021). Bioengineering approaches for placental research. *Annals of Biomedical Engineering*, 49(8), 1805-1818. doi:10.1007/s10439-020-02714-7
- [78] Panitchob, N., Widdows, K. L., Crocker, I. P., Johnstone, E. D., Please, C. P., Sibley, C. P., . . . Sengers, B. G. (2016). Computational modelling of placental amino acid transfer as an integrated system. *Biochimica Et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(7), 1451-1461. doi:10.1016/j.bbamem.2016.03.028
- [79] Lofthouse, E. M., Perazzolo, S., Brooks, S., Crocker, I. P., Glazier, J. D., Johnstone, E. D., . . . Lewis, R. M. (2016). Phenylalanine transfer across the isolated perfused human placenta: An experimental and modeling investigation. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 310(9), R828-R836. doi:10.1152/ajpregu.00405.2015
- [80] Cetin, I., Nobile De Santis, M. S., Taricco, E., Radaelli, T., Teng, C., Ronzoni, S., . . . Pardi, G. (2005). Maternal and fetal amino acid concentrations in normal pregnancies and in pregnancies with gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 192(2), 610-617. doi:10.1016/j.ajog.2004.08.011
- [81] Holm MB, Bastani NE, Holme AM, Zucknick M, Jansson T, Refsum H, Mørkrid L, Blomhoff R, Henriksen T, Michelsen TM. Uptake and release of amino acids in the fetal-placental unit in human pregnancies. *PLoS One*. 2017 Oct 5;12(10):e0185760. doi: 10.1371/journal.pone.0185760. PMID: 28982184; PMCID: PMC5628923.
- [82] Valensise, H., Farsetti, D., Pometti, F., Vasapollo, B., Novelli, G. P., & Lees, C. (2023). The cardiac-fetal-placental unit: Fetal umbilical vein flow rate is linked to the maternal cardiac profile in fetal growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 228(2), 222.e1-222.e12. doi:10.1016/j.ajog.2022.08.004
- [83] Konje JC, Howarth ES, Kaufmann P, Taylor DJ. Longitudinal quantification of uterine artery blood volume flow changes during gestation in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *BJOG*. 2003 Mar;110(3):301-5. PMID: 12628272.
- [85] T. Jansson, T.L. Powell, Human Placental Transport in Altered Fetal Growth: Does the Placenta Function as a Nutrient Sensor? – A Review, *Placenta*, Volume 27, Supplement, 2006, Pages 91-97, ISSN 0143-4004, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.11.010>.
- [86] Cetin, I., Ronzoni, S., Marconi, A. M., Perugino, G., Corbetta, C., Battaglia, F. C., & Pardi, G. (1996). Maternal concentrations and fetal-maternal concentration differences of plasma amino acids in normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 174(5), 1575-1583. doi:10.1016/S0002-9378(96)70609-9

- [87] Jansson, T., Scholtbach, V., & Powell, T. L. (1998). Placental transport of leucine and lysine is reduced in intrauterine growth restriction. *Pediatric Research*, 44(4), 532-537. doi:10.1203/00006450-199810000-00011
- [88] McIntyre, K. R., Vincent, K. M. M., Hayward, C. E., Li, X., Sibley, C. P., Desforjes, M., . . . Dilworth, M. R. (2020). Human placental uptake of glutamine and glutamate is reduced in fetal growth restriction. *Scientific Reports*, 10(1) doi:10.1038/s41598-020-72930-7
- [88] Rosario, F. J., Kramer, A., Li, C., Galan, H. L., Powell, T. L., Nathanielsz, P. W., & Jansson, T. (2021). Reduction of in vivo placental amino acid transport precedes the development of intrauterine growth restriction in the non-human primate. *Nutrients*, 13(8) doi:10.3390/nu13082892
- [89] Cetin, I., Nobile De Santis, M. S., Taricco, E., Radaelli, T., Teng, C., Ronzoni, S., . . . Pardi, G. (2005). Maternal and fetal amino acid concentrations in normal pregnancies and in pregnancies with gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 192(2), 610-617. doi:10.1016/j.ajog.2004.08.011
- [90] Kuruvilla AG, D'Souza SW, Glazier JD, Mahendran D, Maresh MJ, Sibley CP. Altered activity of the system A amino acid transporter in microvillous membrane vesicles from placentas of macrosomic babies born to diabetic women. *J Clin Invest*. 1994 Aug;94(2):689-95. doi: 10.1172/JCI117386. PMID: 8040323; PMCID: PMC296147.

SITOGRAFIA

- [2] ChimicaOnline.it
- [12] <https://www.humanitas.it/enciclopedia/glossario/fertility-center/gravidanza/>
- [18] <https://www.humanitas.it/enciclopedia/principi-attivi/ormoni/progesterone/>
- [19] Antoniocolicchia.it
- [23] Salute.gov.it
- [24] Osservatorioscreeningneonatale.it
- [47] <http://carminesica.com/files/RITARDO-DI-CRESCITA-INTRAUTERINO.pdf>
- [59] <https://www.humanitas.it/malattie/diabete-mellito-gestazionale/>
- [84] Mathworks.com