



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

Corso di Laurea Magistrale
Biologia molecolare e applicata

IL POTENZIALE RUOLO DELLA SCINDERINA NELLA
PREECLAMPSIA

POSSIBLE ROLE OF SCINDERIN IN PREECLAMPSIA

Tesi di Laurea Magistrale
di:

Notarpietro Giulia

Relatore
Chiar.mo Prof.

Marzioni Daniela

Correlatore: (se previsto)

Tossetta Giovanni

Sessione Estiva

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE	4
1.1 LA PLACENTA	4
1.1.1 PLACENTA: FUNZIONE E STRUTTURA	4
1.1.2 PLACENTAZIONE: ACCENNI DI EMBRIOLOGIA E FORMAZIONE DELLA PLACENTA	7
1.2 LA PREECLAMPSIA	12
1.2.1 FISIOPATOLOGIA DELLA PREECLAMPSIA	15
1.3 LA SCINDERINA	17
1.4 SCOPO DELLO STUDIO	19
CAPITOLO 2- MATERIALI E METODI	21
2.1 CAMPIONI TISSUTALI	21
2.2 IMMUNOISTOCHEMICA	21
2.3 COLTURE CELLULARI	24
2.4 TRATTAMENTI CON CITOCHINE	25
2.5 TRATTAMENTI CON H₂O₂	25

2.6 WESTERN BLOTTING	26
2.7 TABELLA DI ANTICORPI PRIMARI UTILIZZATI PER LO STUDIO	29
2.8 IMMUNOFLUORESCENZA	29
CAPITOLO 3- RISULTATI	32
3.1 LA SCINDERINA È ESPRESSA NEI TESSUTI PLACENTARI NORMALI E PATOLOGICI	32
3.2 LA SCINDERINA È ESPRESSA NEI MODELLI IN VITRO BeWo E HTR-8/SVneo DI CITOTROFOBlasto PLACENTARE	35
3.3 L'ESPRESSIONE DELLA SCINDERINA È INCREMENTATA DAL TNFα E DALLO STRESS OSSIDATIVO	37
CAPITOLO 4- DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	40
4.1 LA SCINDERINA POTREBBE ESSERE CONSIDERATA UN TARGET TERAPEUTICO?	42
CAPITOLO 5- RINGRAZIAMENTI E BIBLIOGRAFIA	44
5.1 RINGRAZIAMENTI	44

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

1.1 LA PLACENTA

La placenta è un organo temporaneo che si origina e si sviluppa durante la gestazione, di origine embrionale, fondamentale per lo sviluppo dell'uomo che permette lo scambio di nutrienti e di gas tra la madre ed il feto.

1.1.1 PLACENTA: FUNZIONE E STRUTTURA

La placenta può considerarsi sia un organo endocrino che un organo con funzione trofica. La funzione endocrina viene espletata con la produzione di gonadotropina corionica umana (hCG) prodotta dal sinciziotrofoblasto placentare e responsabile della prosecuzione della gestazione [1]. Mentre durante le prime fasi dello sviluppo placentare è il corpo luteo a produrre ormoni steroidei (progesterone ed estrogeni), in seguito è la placenta che assolve tale compito al fine di assicurare al feto un adeguato ambiente fino al termine della gravidanza. Inoltre, in particolare gli estrogeni giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo della ghiandola mammaria per l'allattamento del nascituro [2].

La funzione trofica viene svolta attraverso la barriera materno-fetale che favorisce gli scambi metabolici e gassosi che consentono al feto di nutrirsi, di eliminare le sostanze di scarto e di respirare.

Tale barriera risulta essere fondamentale per il passaggio di alcune sostanze e per il blocco di altre che potrebbero essere nocive per il feto [3].

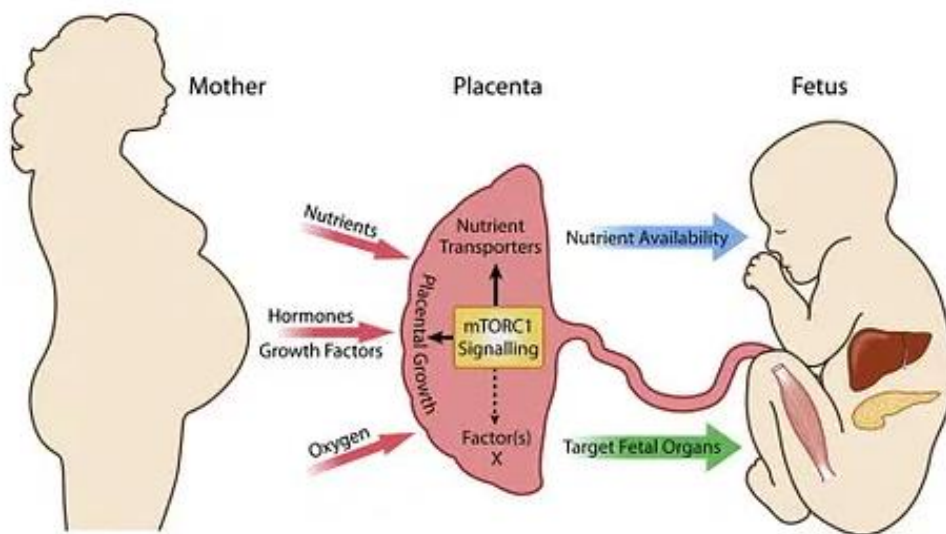


FIGURA 1: Rappresentazione delle funzioni della placenta.

Se analizzata macroscopicamente, la placenta può avere peso, forma, dimensioni e aspetto morfologico variabile. Il peso di una placenta a termine è di circa 500 gr (il peso dipende dal peso del feto), ha forma discoidale, leggermente convessa, presenta due versanti, uno fetale (detto piatto coriale) e l'altro materno (detto piatto basale).

Il versante fetale appare lucido mentre quello materno appare spugnoso e opaco. Il primo si continua con la cavità amniotica che ospita il feto durante la

gravidanza, il secondo è adeso alla decidua uterina. Dalla parte centrale del piatto coriale, si ha l'inserzione del cordone ombelicale che racchiude le due arterie ombelicali e l'unica vena ombelicale [4] che sono i vasi responsabili della circolazione placentare. Di conseguenza, dal piatto coriale si origina la vascolarizzazione dei villi placentari (o coriali) che sono le unità morfologiche funzionali della placenta. I villi si estendono così dal piatto coriale a quello basale, e si ritrovano immersi nel sangue materno che percola tra i villi in quello che è detto spazio intervilloso. Esistono diversi tipi di villo a seconda del periodo di gestazione preso in considerazione. In generale, i villi placentari presentano un asse stromale (core del villo) dove sono presenti i vasi fetali, i macrofagi fetali, oltre a fibroblasti e molecole della matrice extracellulare.

I villi sono rivestiti esternamente da due strati epiteliali: il sinciziotrofoblasto (più esterno) che si pone a stretto contatto con il sangue materno e il citotrofoblasto villosa a contatto con la membrana basale, quindi sul versante dell'asse stromale del villo [5].

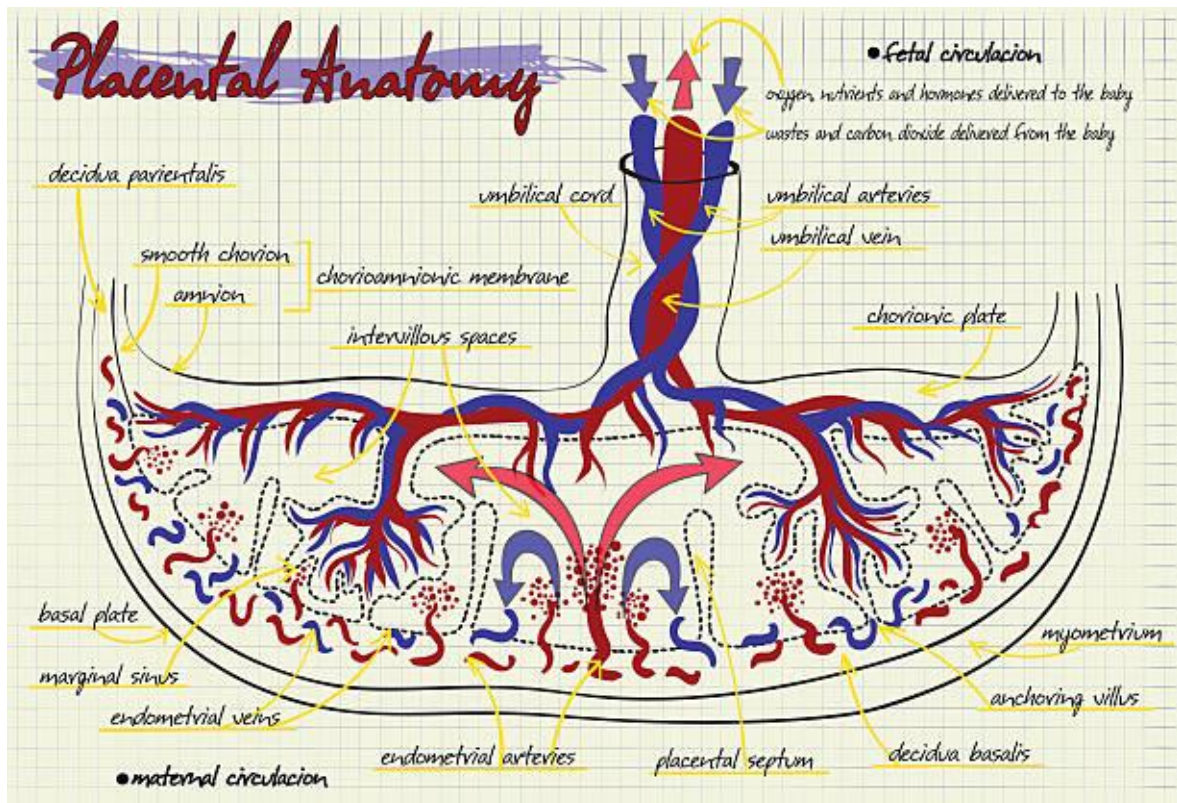


FIGURA 2: Anatomia della placenta.

1.1.2 PLACENTAZIONE: ACCENNI DI EMBRIOLOGIA E FORMAZIONE DELLA PLACENTA

Con il termine “placentazione” si indicano quei processi mediante i quali si ottiene la formazione della placenta e si stabilisce il contatto tra la neo-placenta con la parete uterina. Nello sviluppo dell’uomo, in seguito alla fecondazione e al processo di segmentazione, precisamente allo stadio di morula, si delineano due tipologie di cellule: nella porzione più esterna si collocano le cellule del

trofoblasto e nella porzione interna si trova la massa cellulare interna (ICM). Le cellule del trofoblasto daranno origine alla placenta, mentre la massa cellulare interna formerà l'embrione e tutti gli annessi embrionali. Per dare origine alla placenta, il trofoblasto è dotato di alta capacità invasiva [6], caratteristica accuratamente regolata da fattori genetici e cellulari che garantiscono un ciclo cellulare proliferativo estremamente controllato. Se non fosse così controllato, il trofoblasto potrebbe invadere l'intero utero e determinare l'insorgenza di un carcinoma placentare detto coriocarcinoma, che anche se piuttosto raro, ha prevalentemente esito infausto [7].

Gli stessi fattori genetici, cellulari e ormonali d'altro canto, devono essere espressi in maniera tale da garantire al trofoblasto l'attacco alle cellule uterine [8].

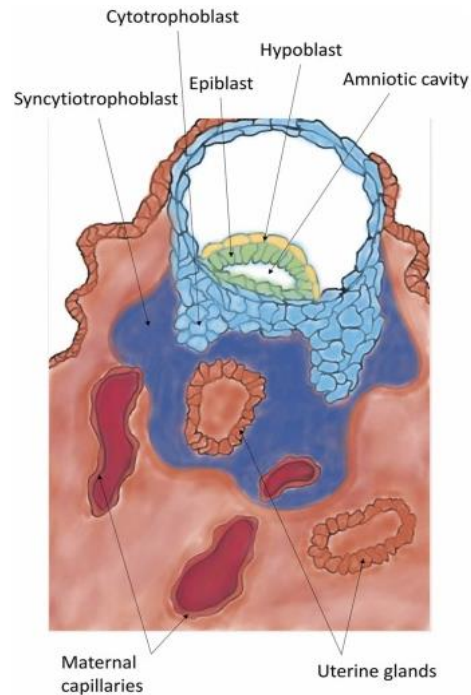


FIGURA 3: Rappresentazione del processo di placentazione; visualizzazione di citotrofoblasto e sinciziotrofoblasto.

Circa sette giorni dopo la fecondazione, la blastocisti si annida nella mucosa uterina [9] dando origine allo stadio pre-lacunare. Il trofoblasto prolifera e allo stesso tempo subisce una differenziazione importantissima che prevede la formazione di due strati: il citotrofoblasto, localizzato internamente e costituito da cellule mononucleate che rappresentano il comparto staminale epiteliale, e il sinciziotrofoblasto localizzato esternamente (a contatto con i tessuti materni) e costituito da cellule polinucleate che hanno perso la capacità proliferativa [10].

Quest'ultima componente, mediante la sua azione litica, permette l'erosione della mucosa uterina affinché si instauri un annidamento più consolidato della

blastocisti nell'endometrio, e quando questo evento si conclude, nella massa di sinciziotrofoblasto si formano delle cavità in cui fluisce il sangue materno proveniente dalle arterie spirali uterine che hanno subito una modifica strutturale. Queste lacune assumeranno dimensioni sempre più grandi con il proseguire della gestazione. Infatti, quello appena descritto prende il nome di stadio lacunare, qui si assiste ad un fenomeno di vacuolizzazione del sinciziotrofoblasto. I vacuoli aumentano in dimensioni e determinano un sistema lacunare, il precursore di quello che sarà lo spazio intervilloso.

Nove - dodici giorni dopo il concepimento l'impianto è ultimato, le lacune formate suddividono il trofoblasto che copre la blastocisti in tre porzioni: piatto coriale, porzione lacunare e piatto basale.

L'endometrio reagisce all'impianto della blastocisti sviluppando la cosiddetta reazione deciduale che si evidenzia tramite una serie di riarrangiamenti, in particolare le cellule dello stroma aumentano in numero e in dimensione, si ha secrezione ghiandolare e accumulo di lipidi e glicogeno. Si originano di conseguenza le cellule della decidua.

Dopo il quattordicesimo giorno dal concepimento (p.c.), lo strato di citotrofoblasto viene invaso da cellule mesenchimali andando a costituire il mesenchima extraembrionale. Si parla di villi primari nel momento in cui il

citotrofoblasto invade la parte centrale del sinciziotrofoblasto con proliferazioni colonnari. [11]

I villi secondari si formano già due giorni dopo, al sedicesimo giorno circa, quando l'asse del villo primario viene invaso da mesoderma extraembrionale, lasciando esternamente il sinciziotrofoblasto a ricoprire lo strato più interno di citotrofoblasto.

Alla fine della terza settimana si determinano i villi terziari in cui appare la vascolarizzazione fetale, cioè i vasi fetali si vanno a posizionare nella componente stromale del villo. Un particolare villo terziario, detto villo d'ancoraggio, si porta con la sua componente di citotrofoblasto sul piatto basale andando a formare le cosiddette colonne di citotrofoblasto extravilloso responsabili dell'attacco degli alberi villosi sul versante materno (piatto basale).

È possibile asserire che una corretta placentazione e un corretto sviluppo dell'organo sono fondamentali per lo sviluppo dell'embrione e la crescita di un feto sano. D'altra parte, modificazioni nello sviluppo della placenta si ripercuotono nel modo in cui il feto assimila i nutrienti o compie gli scambi di sostanze e gas, compromettendo il suo sviluppo [12].

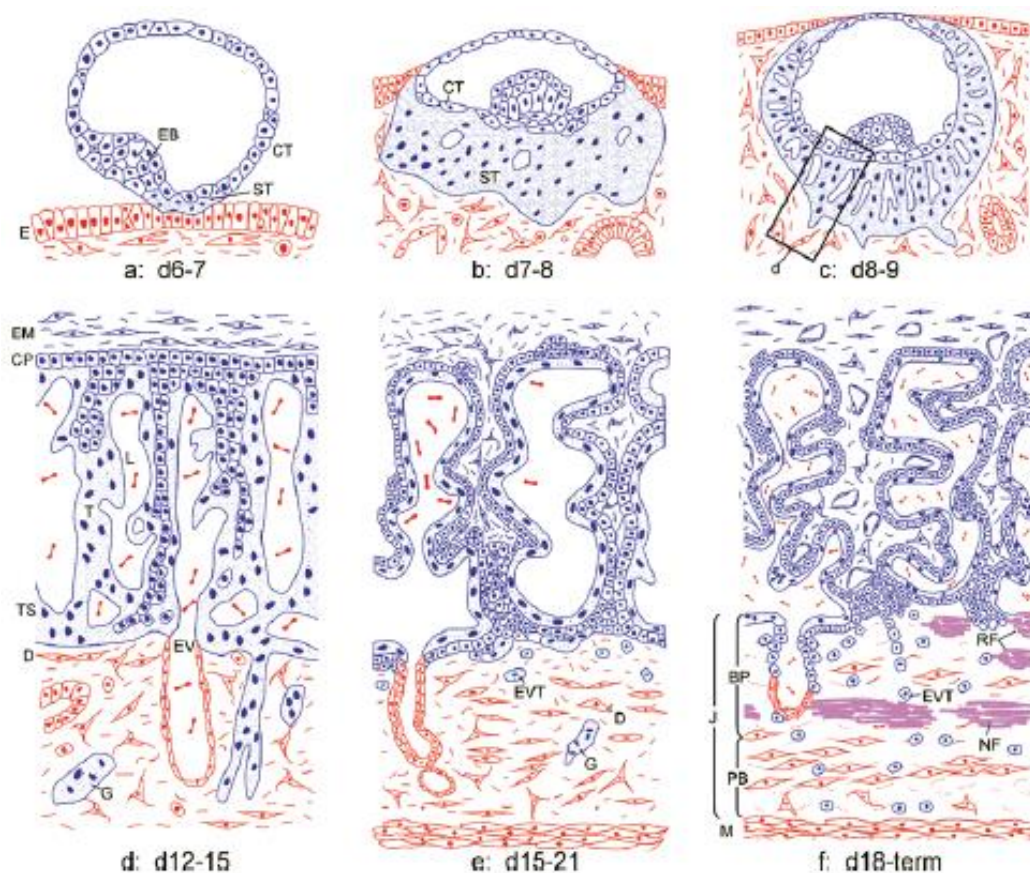


FIGURA 4: Stadi della placentazione; (fig. a,b) stadio pre-lacunare; (fig. c) stadio lacunare; (fig. d) formazione dei villi primari; (fig. e) formazione dei villi secondari); (fig. f) formazione dei villi terziari. Si noti lo sviluppo dell'albero vascolare all'interno dell'asse stromale del villo.

1.2 LA PREECLAMPSIA

La pre-eclampsia (PE) o gestosi è una patologia della gravidanza definita come l'insorgenza ex novo di ipertensione e proteinuria materna. Ad oggi interessa il 2-8% delle gestanti e rimane la principale causa di mortalità materna e del neonato. Inoltre, la PE può causare rallentamento della crescita del feto, parto

premature, distacco di placenta ed altri gravi rischi per la salute della gestante. La PE ha maggiore incidenza se si tratta della prima gravidanza, ed è diagnosticabile dopo la ventesima settimana di gestazione quando si evidenziano i segni clinici. I valori di pressione sanguigna in gestanti con PE raggiungono i 140/90 mmHg contro i 120/80 mmHg delle gestanti sane, e la proteinuria raggiunge concentrazioni elevate fino ai 290 mg/L [13]. Altri sintomi correlati possono essere: visione offuscata, edema, cefalea, eccessivo aumento di peso corporeo, nausea e vomito.

La diagnosi viene effettuata durante le visite di controllo ginecologiche, mediante analisi del sangue, delle urine ed ecografie. Alcuni test di screening di PE vengono effettuati tramite esami come il controllo della pulsatilità delle arterie uterine e il dosaggio dei livelli plasmatici di PAPP-A (Pregnancy Associated Protein A) tra la undicesima e quattordicesima settimana di gestazione, ma non rientrano in quelli di routine consigliati dal Sistema Sanitario Nazionale. La diagnosi tempestiva di PE, ad oggi, risulta essere il metodo più efficace per salvaguardare la salute della madre e del feto.

È bene gestire da subito la malattia per evitare la sua evoluzione in eclampsia o nella sindrome HELLP (Hemolysis, Elevated levels of Liver enzymes, Low Platelet count), con il rischio di incorrere in crisi convulsive e compromissione

degli organi come rene e polmoni che possono portare alla morte sia della madre che del feto [14].

La PE è una malattia che non si risolve autonomamente nel periodo gestazionale, per cui, la risoluzione o scomparsa improvvisa di sintomi potrebbe essere indice di morte fetale, perché la reale scomparsa della sintomatologia legata alla PE avviene con il parto. La scelta dei ginecologi ricade frequentemente nell'induzione del parto, se il termine della gravidanza è abbastanza vicino, per non protrarre i rischi associati alla PE. Ad oggi, gli strumenti per gestire la malattia sono oltre il riposo, il monitoraggio della pressione arteriosa anche attraverso l'utilizzo di antiipertensivi ove necessario, l'utilizzo di eparina che sembra migliorare la circolazione placentare e frequenti visite ginecologiche. Le terapie farmacologiche vengono adottate per attenuare le manifestazioni cliniche, per alleggerire i sintomi e per portare la gravidanza il più vicino possibile al suo termine naturale ma la malattia ad oggi non è curabile [15] [16].

Trattandosi di una manifestazione clinica grave e subdola che può compromettere la vita della madre e del feto, sono molti gli studi condotti sulla PE, anche se i riscontri risultano ancora pochi. I target della ricerca scientifica riguardano principalmente le cause che determinano l'insorgenza della malattia e nuovi metodi di diagnosi precoce, cioè prima dell'insorgenza dei sintomi. Le

cause vengono ricercate anche nel feto, ma in primis nella placenta per il fatto che la risoluzione completa della malattia avviene soltanto dopo il parto e quindi dopo l'espulsione della placenta. Tra le concause della malattia vengono considerati i dati anamnestici sia materni che paterni come la recidività familiare [17], o anche la propensione genetica a sviluppare malattie associate alla PE come il diabete [18].

1.2.1 FISIOPATOLOGIA DELLA PREECLAMPSIA

L'eziologia della PE non è ancora certa ma molteplici sono gli studi che forniscono dati a riguardo. Si può asserire che, complessivamente, gli eventi riconosciuti che concorrono allo sviluppo della PE possono essere riconducibili sia a difetti nel processo di placentazione [19] che di coagulazione, così come ad un'anomalia generalizzata della funzionalità endoteliale delle arterie spirali uterine [20]. Questi eventi sono generati da una serie di interazioni di origine immunitaria, chimica, ormonale, genetica e metabolica [21].

Tra le cause che possono portare all'insorgenza della PE sono note la predisposizione genetica [22], fattori di rischio come il fumo di sigaretta e l'obesità [23], fattori immunitari [24], il rapporto trombassano/prostaciclina

[25], la scarsa invasione delle arterie uterine da parte del trofoblasto e lo squilibrio del sistema renina-angiotensina-aldosterone [26]. Nella PE, la crescita placentare in condizioni ipossiche e la conseguente alterazione dei ROS (Reactive oxygen species) comporta un accumulo dei prodotti intermedi derivanti dai processi cellulari di riduzione dell'ossigeno, come superossidi, perossidi d'idrogeno, radicali ossidrilici, e i perossidi derivanti dall'addizione dell'ossigeno ai radicali degli acidi grassi delle membrane che potrebbe portare ad un'alterazione del ciclo cellulare, così come alla funzionalità mitocondriale fino alla morte cellulare [27].

L'ipossia e lo stress ossidativo causati da ischemia temporanea con successiva riperfusione riscontrabile nelle placente preeclamptiche complicate da IUGR influenzano il metabolismo delle citochine e delle prostaglandine [28] [29] [30] [31]. I perossidi lipidici e le citochine, come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) e l'interleuchina-1 (IL-1), quando rilasciati nel flusso sanguigno materno sono parzialmente responsabili della disfunzione endoteliale, che è un elemento centrale della pre-eclampsia [20] [32]. I livelli plasmatici elevati di TNF- α e l'IL-6 nonché l'aumentata espressione di IL-1, IL-10 e TNF- α nel tessuto placentare sono stati segnalati in donne con PE [33] [34]. Inoltre, le citochine proinfiammatorie e antinfiammatorie come IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10 modellano profondamente la risposta immunitaria;

pertanto, la disregolazione della loro produzione può portare a disfunzioni immunitarie, favorendo l'insorgenza di malattie infiammatorie inclusa la PE [35] [36]. Negli studi che hanno utilizzato espianti di villi in vitro, l'ipossia aveva un effetto stimolante sulla produzione di citochine, fornendo un collegamento tra la compromissione della perfusione dello spazio intervilloso e il rilascio di citochine nella circolazione materna [37] [38].

NF- κ B (nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells) e STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) sono tra le più importanti vie che regolano la produzione di citochine [39] [40]. Queste vie che collegano l'infiammazione alla PE potrebbero anche modificare l'espressione di molecole legate all'omeostasi cellulare come la scinderina.

1.3 LA SCINDERINA

La scinderina (adseverina) è una proteina appartenente alla famiglia delle gelsoline [41] ed è prodotta dal gene *SCIN*. Come tutte le proteine appartenenti a questa famiglia, è principalmente incaricata di legare i filamenti di actina mediandone l'assemblaggio e il disassemblaggio, e per svolgere questo compito è strettamente dipendente dal Ca^{2+} [42]. Per quanto possa presentare delle caratteristiche comuni alla famiglia di appartenenza, la scinderina si differenzia per alcuni motivi strutturali che incidono proprio sul legame del

Ca²⁺ e di conseguenza sulla modalità con cui la molecola interagisce con l'actina [43].

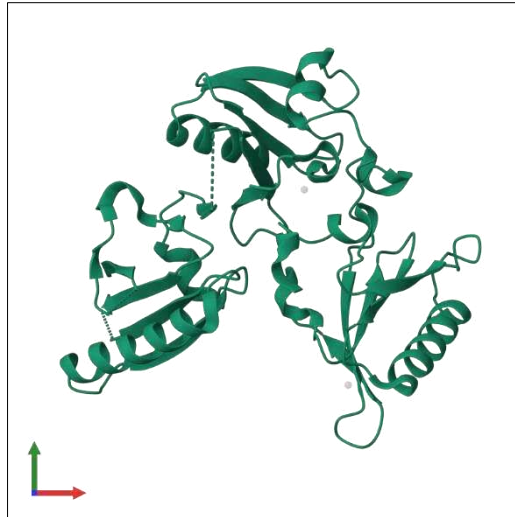


FIGURA 8: Struttura della scinderina ottenuta per diffrazione a raggi X.

Il ruolo della scinderina nei diversi processi biologici è ancora motivo di studio. Ad oggi è stato dimostrato che le cellule secernenti presentano quantità abbondanti di questa proteina [44], infatti, uno dei ruoli di questa molecola è promuovere il rilascio delle vescicole secretorie, stimolato proprio dall'accumularsi del calcio all'interno della cellula. Esattamente come i tessuti endocrini, anche il sistema nervoso abbonda in scinderina e la sua presenza è stata messa in relazione con il rilascio dei neurotrasmettitori [45].

L'attività della scinderina è stata studiata nello sviluppo di tumori, come per esempio nei tumori del polmone [46], della prostata [47], dell'apparato gastro-intestinale [48] e del seno [49]. Ulteriori studi hanno riguardato il fegato [50]

ed anche il tessuto cerebrale [51]. Complessivamente, da questi studi è emerso un ruolo chiave della scinderina nei meccanismi di proliferazione e di migrazione cellulare, poiché è in grado di interagire con il citoscheletro cellulare attraverso la modulazione dell'actina. Il suo ruolo chiave nella proliferazione cellulare potrebbe suggerire un ruolo come marker o target terapeutico nelle patologie tumorali. Infine, poiché la scinderina appartiene alla famiglia delle gelsoline, che sono molecole coinvolte nella funzione di richiamo dell'immunità innata e nella localizzazione dell'infiammazione [52] [53], non si può escludere che la scinderina possa avere un ruolo nei suddetti fenomeni [54] [55].

1.4 SCOPO DELLO STUDIO

Ad oggi, nessuno studio si ritrova in letteratura sulla presenza della scinderina nella placenta e tantomeno il suo comportamento in patologie della gravidanza come la PE. Lo scopo di questo studio è quella di valutare la presenza della scinderina nella placenta, poiché quest'ultima svolge anche un ruolo di organo endocrino che potrebbe giustificare la presenza della scinderina in quest'organo. Inoltre, la valutazione della sua espressione placentare durante la gravidanza e nella PE permetterebbe di comprendere se le variabili, tipicamente alterate nella PE (come per esempio quadro infiammatorio, ipossia e stress

ossidativo), potrebbero avere un ruolo nel modificare l'espressione della scinderina con conseguenti modifiche nei processi cellulari alla base dello sviluppo placentare.

CAPITOLO 2- MATERIALI E METODI

2.1 CAMPIONI TISSUTALI

Per osservare l'espressione della scinderina nei tessuti placentari, sono stati analizzati 30 campioni tissutali di cui: 10 campioni derivati da interruzione volontaria di gravidanza (IVG, Reparto di Ginecologia e Ostetricia, Ospedale di San Severino Marche, Macerata, Italia), 10 campioni di placentate a termine, e 10 campioni placentari appartenenti a pazienti pre-eclamptiche. I campioni a termine e da gestazioni complicate da PE sono stati forniti dal Dipartimento Scienze della Salute delle Donna, del Bambino e di Sanità Pubblica, Fondazione Policlinico Gemelli, Roma (Italia). I campioni sono stati inclusi in paraffina dalla SOD di Anatomia Patologica della stessa struttura ospedaliera. In seguito, i campioni sono stati tagliati mediante microtomo in sezioni di 5 μm , le sezioni ottenute sono state fatte asciugare over night su piastra riscaldata a 37° per essere successivamente utilizzate nelle procedure di immunoistochimica.

2.2 IMMUNOISTOCHIMICA

La tecnica di immunoistochimica è stata utilizzata per localizzare la scinderina nei tessuti placentari, ovvero quali strutture placentari erano in grado di esprimere questa proteina.

Il protocollo ha previsto inizialmente la deparaffinazione (ovvero l'allontanamento dai tessuti della paraffina che è il mezzo d'inclusione) dei campioni tramite lo xilolo ed una scala decrescente di alcoli fino all'acqua deionizzata (passaggi da circa 10 minuti ciascuno in base alla grandezza del campione), al fine di reidratare i tessuti stessi. I campioni reidratati poi, sono stati sottoposti all'azione di H₂O₂ al 3% per 30 minuti con lo scopo di inibire le perossidasi endogene, in modo tale da evitare un marcaggio aspecifico poiché è lo stesso enzima che viene utilizzato per lo sviluppo della reazione colorimetrica. Successivamente, i campioni sono stati lavati 3 volte per 5 minuti in tampone fosfato (PBS) 0,1 M per allontanare il perossido d'idrogeno. Al fine di smascherare l'antigene nel tessuto (nel nostro caso la scinderina), i campioni sono stati immersi in tampone citrato 0,01 M a pH 6, a 95°C in bagnetto termostato per 10 minuti. A questo punto sono stati eseguiti dei lavaggi in PBS 0,1M tre volte per 5 minuti. In seguito, al fine di ridurre il più possibile le cross reattività anticorpali aspecifiche, le sezioni sono state fatte incubare in Animal-Free Blocker (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in proporzione 1:5 per 20 minuti. Senza allontanare la suddetta soluzione, le sezioni sono state fatte reagire con l'anticorpo primario specifico per la scinderina (vedi tabella), diluito 1:3000 over night (O.N.) in camera umida a 4°C.

Al termine dell'incubazione sono stati effettuati una serie di lavaggi in PBS a temperatura ambiente per rimuovere l'anticorpo primario che non si era legato con l'antigene. È seguita un'ulteriore incubazione di 30 minuti con l'anticorpo secondario biotinilato diluito 1:200 in PBS.

A seguito dei lavaggi, le sezioni sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente con una soluzione contenente un complesso di streptavidina-biotina perossidasi (ABC), la diluizione questa volta è di 1:100.

La 3',3'-diamminobenzidina cloridrato (DAB) è un cromogeno che in presenza di perossidasi produce dei precipitati marroni insolubili anche in alcool. La DAB è stata preparata, fatta agire sui campioni placentari per 1 minuto sotto cappa. Dopo la reazione, le sezioni sono state immerse per 2 secondi in ematossilina per la colorazione dei nuclei e successivamente poste in acqua corrente per aumentare l'intensità della reazione. Successivamente, le sezioni di tessuto sono state disidratate tramite passaggi consecutivi dall'acqua alla scala crescente di alcoli fino allo xilolo. Infine, le sezioni sono state montate tramite Eukitt con vetrini copri-oggetto.

2.3 COLTURE CELLULARI

Per analizzare l'effetto infiammatorio e dello stress ossidativo sull'espressione della scinderina, è stata utilizzata la linea cellulare HTR-8/SVneo, la quale mima le cellule del trofoblasto extravilloso. Come confronto, è stata analizzata l'espressione della scinderina anche nelle cellule BeWo, una linea di coriocarcinoma normalmente utilizzata come modello di cito villosa. Se le cellule BeWo sono stimulate con forskolina, queste sincizializzano e possono essere utilizzate come modello di sinciziotrofoblasto. Poiché nello studio si è visto che il sinciziotrofoblasto non esprime la scinderina, le cellule BeWo non sono state indotte a sincizializzare.

Le HTR-8/SVneo e BeWo sono state coltivate in fiasche T75, il terreno utilizzato per la coltura è l'RPMI (Roswell Park Memorial Institute) e DMEM/F12, rispettivamente. I terreni di coltura sono stati arricchiti con un 10% di FBS (siero fetale bovino), 100 U/ml di penicillina e streptomicina. Le cellule sono state fatte crescere in incubatore a 37°C al 5% di CO₂.

Il terreno è stato sostituito ogni 2 giorni, mentre ogni 4 giorni le cellule subivano un processo di split di 1:4. Nella divisione è stata usata anche tripsina per staccare le cellule dalle fiasche.

2.4 TRATTAMENTI CON CITOCHINE

Le cellule HTR-8/SVneo sono state coltivate in piastre Multiwell da 6 pozzetti alla concentrazione di $1,5 \times 10^4$ cellule/cm². Una volta arrivate a confluenza sono state trattate con le citochine che simulano una condizione infiammatoria. Le citochine utilizzate sono TNF α e interleuchina 6 (IL-6), e per ciascuna vengono utilizzate le seguenti concentrazioni:

- TNF α : 20 ng/mL
- IL6: 5 ng/mL

La scelta delle citochine e della loro concentrazione è stata basata dai dati trovati in letteratura [56] [57].

2.5 TRATTAMENTI CON H2O2

L'acqua ossigenata è stata utilizzata per simulare lo stress ossidativo al fine di studiare l'espressione della scinderina nelle cellule. Per il trattamento, le cellule sono state coltivate su piastre Multiwell ad una concentrazione di $1,5 \times 10^4$ cellule/cm², H₂O₂ è stata utilizzata alla concentrazione di 175 μ M per 24 ore. Le condizioni del trattamento sono state scelte dopo consultazione della letteratura [58].

2.6 WESTERN BLOTTING

Dopo ciascun trattamento, le cellule sono state sottoposte alle stesse procedure per impostare l'esecuzione del western blotting.

Dopo un'incubazione di 24 ore, sono stati fatti dei lavaggi con PBS 1X per rimuovere il terreno dalle piastre Multiwell in cui erano coltivate le linee cellulari. Le cellule sono state successivamente lisate mediante una soluzione di lisi contenente Lysis Buffer, aprotinina e PMSF (phenyl methane sulfonyl fluoride).

I campioni ottenuti sono stati centrifugati a 4°C, 15000 rpm per 4 minuti, si è recuperato il sovrantante per le analisi successive.

Mediante saggio Bradford (Bio-rad Laboratories, Milan, Italy) è stato possibile ricavare le concentrazioni proteiche di ogni campione. Questo saggio si basa su una reazione colorimetrica che avviene dopo il legame tra proteina e Blue di Coomassie, le concentrazioni sono state rilevate mediante spettrofotometro.

La preparazione dei campioni per il Western blotting prevede uno stesso quantitativo di proteina per ciascun campione (8 µg) da inserire nei pozzetti di gel di poliacrilammide (10%). I lisati proteici sono stati diluiti con H₂O, glicerolo, Sample Buffer (β-mercaptoetnolo), blu-bromofenolo e SDS (sodio dodecil solfato).

I campioni sono stati sottoposti a denaturazione eseguita in Termoblot per 5 minuti a 96°C e successivamente caricati in gel di poliacrilammide. Il gel è stato sottoposto a corsa elettroforetica a 120V, in Running Buffer e con SDS-PAGE.

Per ogni Western blot eseguito, il primo campione caricato è rappresentato sempre da un marker (Precision Plus Proteins All Blue Standards) che permette di osservare le bande corrispondenti ai vari pesi molecolari. Queste bande sono un controllo indispensabile per individuare poi la proteina di nostro interesse. Nel resto dei pozzetti, i campioni sono caricati sempre in triplice copia.

Al termine della corsa elettroforetica, il trasferimento delle bande dai gel alla membrana di nitrocellulosa è stato mediato da un Trans-Blot Turbo Transfer System. Successivamente, le bande sono state messe in risalto tramite rosso Ponceau che è stato rimosso poi tramite tampone TBS-T 1X (tampone tetra-salino).

Le membrane sono state sottoposte all'azione di una soluzione di blocco per 5 minuti in agitazione, e successivamente incubate O.N a 4°C con l'anticorpo primario specifico (vedi tabella). Il giorno seguente, dopo 3 lavaggi con TBS-T per 5 minuti ciascuno, le membrane sono state incubate con l'anticorpo secondario specifico coniugato con la perossidasi (HRP) per 30 minuti in agitazione. In seguito, sono stati fatti altri lavaggi.

Per visualizzare l'espressione delle proteine è stato impiegato il Chemidoc (Bio-Rad Laboratories), in cui è stato rilevato il segnale luminoso emesso durante il saggio immunoenzimatico in cui è stato utilizzato come substrato l'ECL Substrate (Bio-rad Laboratories).

È stata eseguita un'analisi densitometrica delle bande tramite il software ImageJ, i risultati infine sono stati normalizzati.

2.7 TABELLA DI ANTICORPI PRIMARI UTILIZZATI PER LO STUDIO

ANTICORPO PRIMARIO	DILUIZIONE (WB)	DILUIZIONE (IHC)	CODICE
SCIN	1:500	1:3000	HPA020518
GAPDH	1:250	-	SC-47724
pSTAT3	1:700	-	#9145 cell signaling
STAT3	1:500	-	#9132 cell signaling
pNFKB	1:300	-	#3033 cell signaling
NFKB	1:300	-	#8242 cell signaling

2.8 IMMUNOFLUORESCENZA

Le cellule HTR-8/SVneo e BeWo sono state coltivate in piastre Multiwell adese ad un vetrino copri-oggetto, ad una concentrazione di $1,5 \times 10^4$ cellule/cm². Al raggiungimento della confluenza il terreno è stato rimosso mediante PBS 1X, nello specifico sono stati fatti 3 lavaggi da 5 minuti.

Successivamente le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% diluita in PBS, per 10 minuti. Sono stati ripetuti i lavaggi descritti in precedenza.

A seguito della fissazione, le cellule sono state permeabilizzate mediante Triton X-100, un tensioattivo che solubilizza le proteine di membrana, alla concentrazione di 0,2% diluito in PBS. Lo step descritto ha una durata di 5 minuti e successivamente sono stati eseguiti i medesimi lavaggi.

È stato eseguito il blocco per 30 minuti mediante siero dell'anticorpo secondario, dopodiché le cellule sono state incubate O.N. a 4°C con l'anticorpo primario.

Il giorno seguente sono stati fatti 3 lavaggi da 5 minuti ciascuno con PBS 1X per eliminare l'eccesso di anticorpo primario, successivamente le cellule sono state incubate nuovamente con l'anticorpo secondario diluito 1:300 in PBS 1X, per 1 ora in camera umida. L'eccesso di anticorpo secondario è stato rimosso mediante lavaggi dopo il tempo prestabilito.

Per valutare la localizzazione della scinderina nelle HTR-8/SVneo e BeWo, le cellule sono state incubate con l'anticorpo primario (in tabella) ed è stato utilizzato un anticorpo secondario coniugato con un fluoroforo che emette nel verde. I nuclei delle cellule sono stati evidenziati mediante l'utilizzo del DAPI, un composto fluorescente che si intercala nel DNA emettendo nel blu. Il composto è stato usato con una diluizione di 1:1000 per 10 minuti.

Sono stati eseguiti i medesimi lavaggi per togliere l'eccesso delle sostanze utilizzate, infine i vetrini su cui erano adese le cellule sono stati trasferiti in un vetrino per microscopio e sigillati con un vetrino copri-oggetto. I vetrini sono stati analizzati mediante microscopio fluorescente confocale (Nikon).

CAPITOLO 3- RISULTATI

3.1 LA SCINDERINA È ESPRESSA NEI TESSUTI PLACENTARI

NORMALI E PATOLOGICI

Dall'analisi immunoistochimica la scinderina risulta essere espressa nel citotrofoblasto villosa (vedere frecce, Figure 9 a,b,c) sia delle placente normali del I (a) e III (b) trimestre di gestazione, che nelle placente di gravidanze complicate da PE (c). Inoltre, la scinderina è presente nei macrofagi placentari particolarmente abbondanti nei canali dei villi più immaturi (vedi teste di frecce). L'analisi quantitativa del western blot della scinderina (Figura 10, a sinistra un western blot rappresentativo, a destra la quantificazione di tutti i campioni analizzati) ha dimostrato che la scinderina è significativamente più elevata nelle placente del III trimestre comparata con le placente del I trimestre di gestazione, e che nelle placente complicate da PE c'è un ulteriore incremento significativo dell'espressione di scinderina comparata con il III trimestre di gestazione.

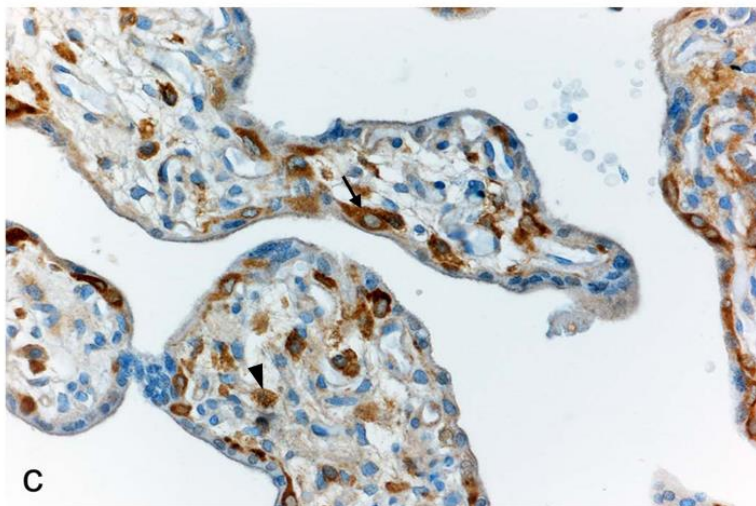
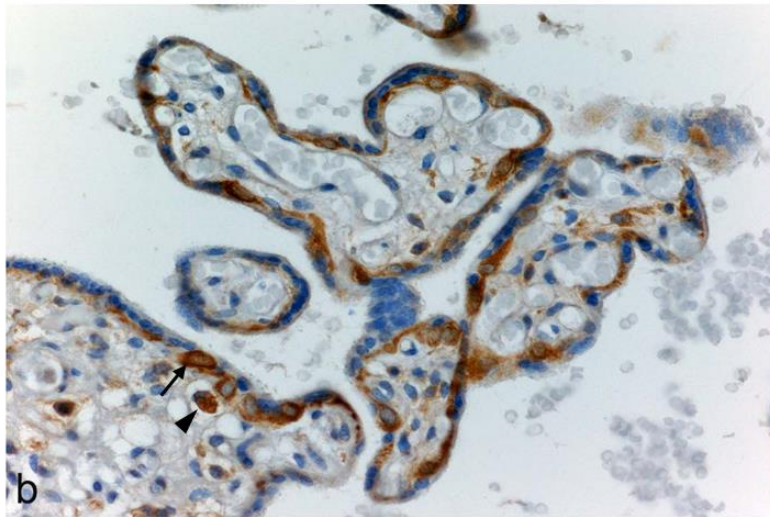
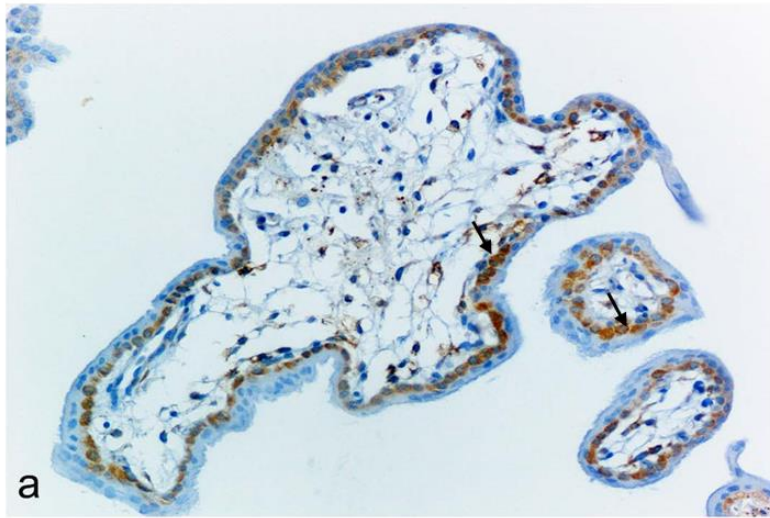


FIGURA 9: Espressione della scinderina nelle placente normali del I trimestre (a), nel terzo trimestre (b) di gestazione e in placente con gravidanza complicata da PE (c). La scinderina è espressa nel citotrofoblasto villosi (frecce) di tutti i campioni placentari, sia in condizioni normali che patologiche (a,b,c). I macrofagi placentari (teste di frecce) presenti nello stroma del villo sono positivi per la scinderina.

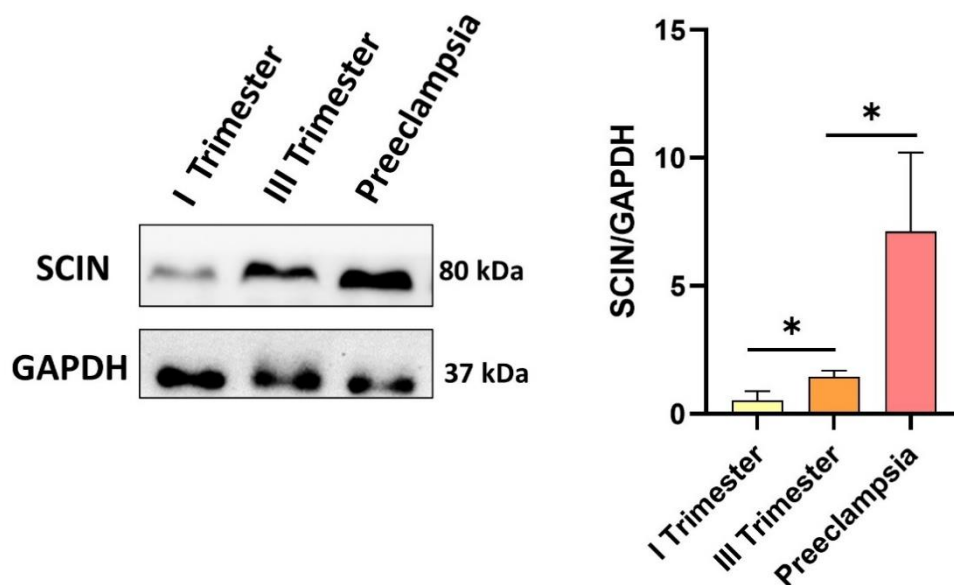


FIGURA 10: Western blot rappresentativo dei campioni placentari analizzati e sua quantificazione. A sinistra il western blot mostra che sia le placente fisiologiche che le PE esprimono la scinderina. A sinistra, l'istogramma mostra che le placente del III trimestre confrontate con quelle del I trimestre esprimono un livello significativamente maggiore di scinderina. Inoltre, le placente di gravidanze complicate da pre-eclampsia mostrano un

livello di scinderina significativamente più elevato delle placente del III trimestre
comparate per età gestazionale. *= $p < 0.05$

3.2 LA SCINDERINA È ESPRESSA NEI MODELLI IN VITRO BeWo E HTR-8/SVneo DI CITOTROFOBLASTO PLACENTARE

Al fine di testare la modulazione della scinderina in vitro tramite condizioni mimanti la PE, si è analizzata l'espressione della scinderina in due linee cellulari di citotrofoblasto villosa: HTR-8/SVneo e BeWo (Figura 11a). In entrambe le linee cellulari la scinderina è localizzata nel citoplasma e in alcune cellule si vede coinvolta nel processo di divisione cellulare (vedi cellule in mitosi; freccia bianca). La prima è una linea che non tende a sincizializzare anche se stimolata attraverso agenti esogeni, mentre la seconda è una linea che tende a sincizializzare in modo spontaneo ma molto lentamente se non stimolata.

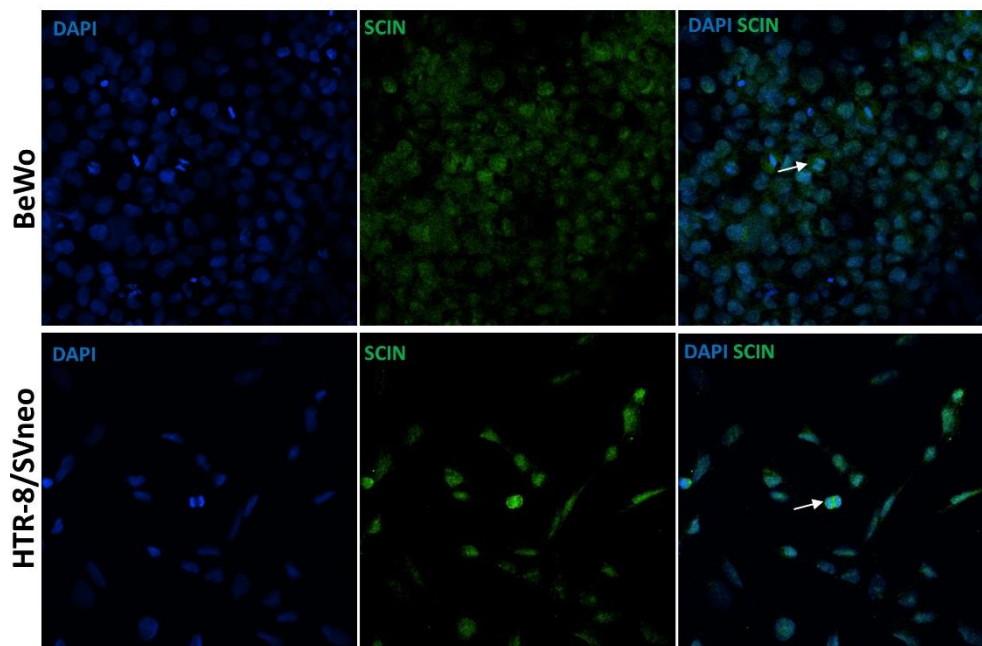


FIGURA 11a: Immunofluorescenza della scinderina (verde) nelle linee cellulari BeWo e HTR-8/SVneo. Entrambe le linee cellulari esprimono la scinderina che si trova localizzata a livello citoplasmatico. In blu sono colorati i nuclei.

Come riportato nella figura 11b, la scinderina è significativamente più espressa nelle BeWo rispetto alle HTR-8/SVneo.

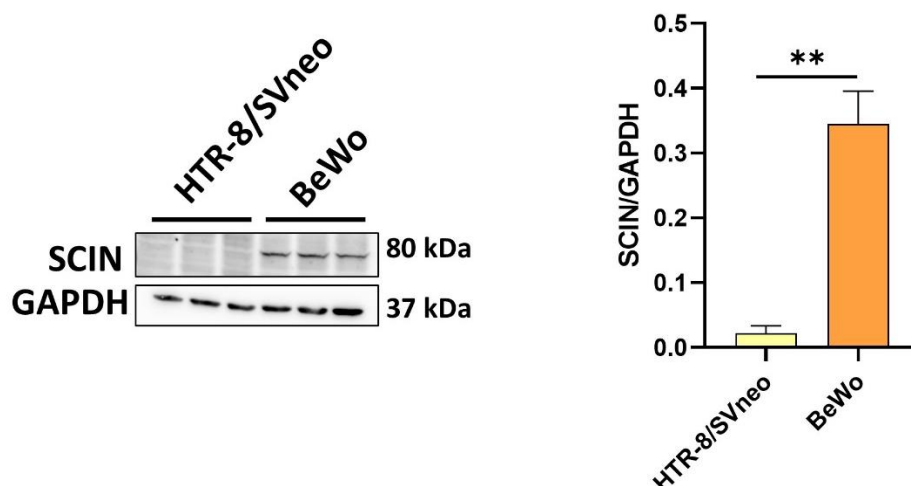


FIG 11b: Analisi quantitativa dell'espressione della scinderina nelle linee cellulari

BeWo e HTR-8/SVneo. Entrambe le linee cellulari esprimono la scinderina ma, dall'analisi quantitativa la linea BeWo ne esprime un quantitativo significativamente maggiore. **= $p < 0.01$.

3.3 L'ESPRESSIONE DELLA SCINDERINA È INCREMENTATA DAL $TNF\alpha$ E DALLO STRESS OSSIDATIVO

Poiché il fine era testare il ruolo dell'infiammazione sulla modulazione della scinderina nel citotrofoblasto extravilloso, le cellule HTR-8/SVneo sono state trattate con le citochine IL-6 e $TNF\alpha$. La risposta cellulare è stata valutata attraverso l'attivazione di pathway specifici pSTAT3 and pNF-kB (Figura 12A). Entrambi i pathway vengono attivati dall'IL-6, mentre pNF-kB viene attivato in modo significativo solo dall' $TNF-\alpha$. Inoltre, proprio quest'ultimo era in grado di innalzare significativamente il livello di scinderina (Figura 12a).

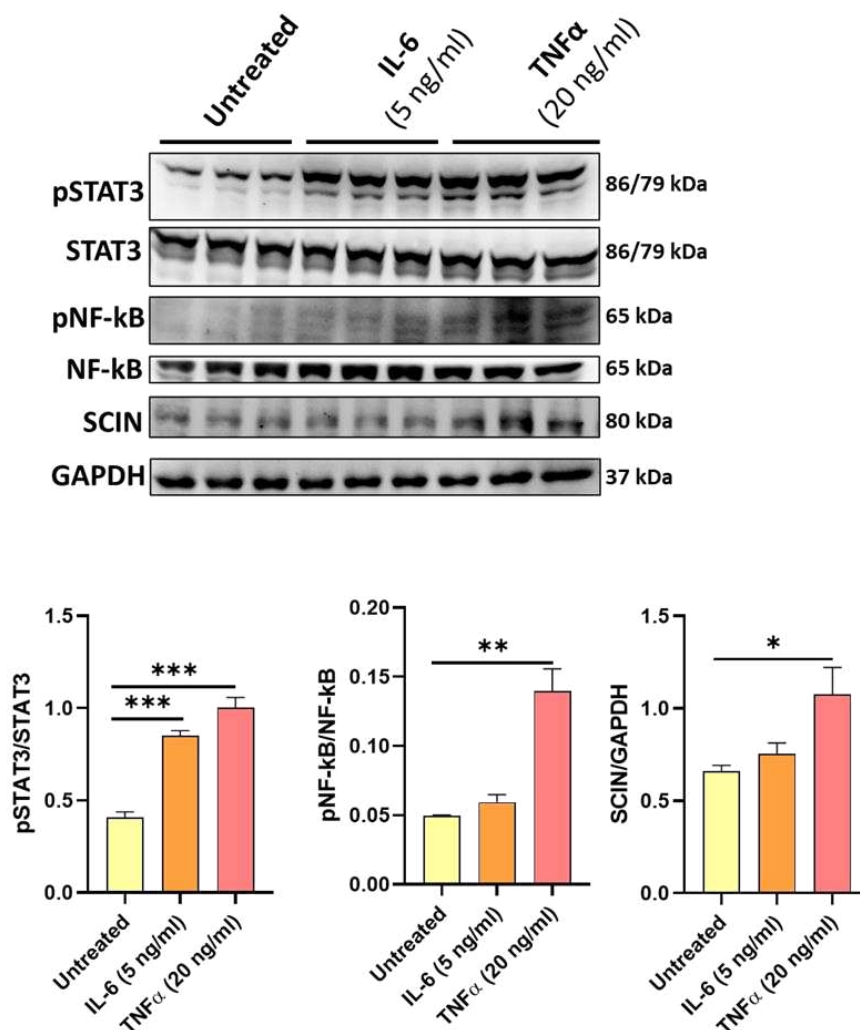


FIGURA 12a: Western blotting rappresentativo di pSTAT3 e STAT3, pNF-kB e NFkB, e scinderina nelle cellule HTR-8/SVneo in tre diversi condizioni: untreated (non trattate), trattate con IL-6 e trattate con TNFα. Gli istogrammi dimostrano che il sistema in vitro risponde ai trattamenti con le due citochine. In modo particolare, IL-6 attiva sia la via pSTAT3/ STAT3 che pNF-kB /NF-kB mentre il TNFα solo la via pNF-kB /NF-kB. La scinderina è aumentata in modo significativo in seguito al trattamento con il TNFα. *=p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.001.

Al fine di valutare se lo stress ossidativo modulasse l'espressione della scinderina, le cellule HTR-8/SVneo sono state trattate con perossido d'idrogeno, ed è stato evidenziato che l'esposizione delle cellule a stress ossidativo determina un aumento significativo di scinderina (Figura 12b).

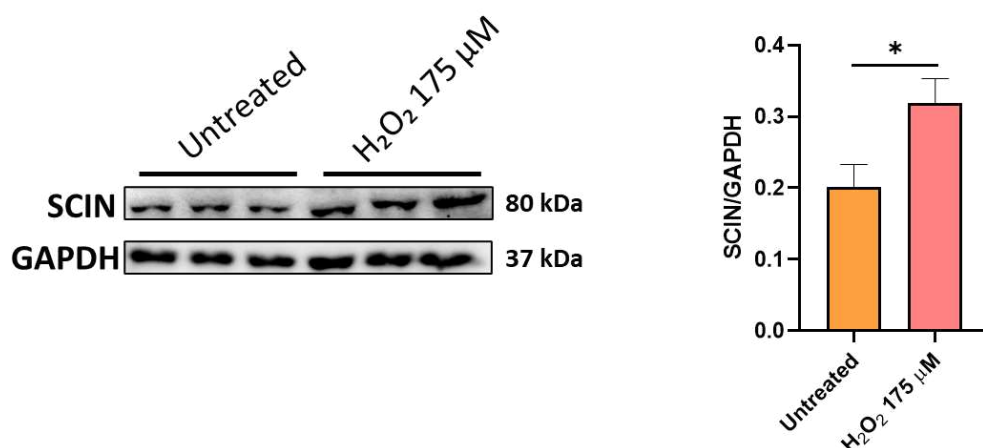


FIGURA 12b: Modulazione dell'espressione della scinderina in seguito a trattamenti con perossido d'idrogeno (H₂O₂). La scinderina è aumentata in modo significativo comparata con le cellule non trattate. *=p<0.05.

CAPITOLO 4- DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

È noto che IL-6 e TNF- α , dopo essersi legati ai corrispondenti recettori, arrivando nel nucleo influenzano l'espressione dei geni correlati alla produzione di citochine attraverso la trasduzione di una serie di proteine segnale che possono causare un incremento della produzione di citochine [59] [60]. L'IL-6 è una molecola chiave per l'attivazione del pathway JAK/STAT3 e per la completa stimolazione della via NF- κ B. L'attivazione di NF- κ B può portare alla produzione di IL-6, risultando in un effetto a cascata che amplifica la produzione della stessa IL-6. Durante questo processo, anche il TNF- α attiva la via NF- κ B promuovendo la sintesi di IL-6. Di conseguenza, l'IL-6 promuove la produzione di citochine, tra cui TNF- α attraverso l'attivazione di Th17 e a seconda delle necessità, anche di altri pathway. Pertanto, l'IL-6 svolge un ruolo fondamentale nell'attivazione di altre citochine [61]. Il TNF- α induce effetti a valle principalmente attivando l'apoptosi tramite la via NF- κ B e l'insieme delle proteine attivatrici AP-1. L'AP-1 costituisce un ruolo importante nella proliferazione e morte cellulare [62].

Sebbene diverso dal percorso dell'apoptosi, principalmente NF- κ B media l'espressione di proteine legate alla proliferazione e sopravvivenza cellulare, svolgendo un importante ruolo pro-infiammatorio. Ad esempio, NF- κ B stimola la sintesi dell'ossido nitrico inducibile (iNOS), la cicloossigenasi-2 (COX-2) e

anche la 5-lipossigenasi (5-LOX) è sovraregolata [63] [64]. I nostri dati dimostrano che il TNF- α non solo attiva la suddetta via, ma aumenta anche l'espressione della scinderina, e che quest'ultima è incrementata dallo stress ossidativo. L'espressione della scinderina è significativamente aumentata nelle placente complicate da PE che è una patologia caratterizzata non solo da un incremento notevole di citochine, tra cui IL-6 e TNF- α , ma anche da un forte stress ossidativo quindi, si può dedurre che l'aumento della scinderina possa essere causato non solo dall'alterato pattern infiammatorio, ma anche dallo stress ossidativo. Come riportato da Quiao e collaboratori (2018) nel carcinoma epatico [50], la scinderina potrebbe essere considerata un potenziale regolatore dell'apoptosi cellulare anche nel tessuto placentare. Inoltre, prove crescenti indicano un aumento dell'attività delle caspasi in condizioni patologiche come la PE che comportano un'eccessiva morte cellulare [65]. In conclusione, i nostri dati dimostrano che l'elevata presenza della scinderina nelle placente PE potrebbe essere legata non tanto a processi di proliferazione cellulare, ma ai meccanismi apoptotici che risultano essere elevati in questa patologia.

4.1 LA SCINDERINA POTREBBE ESSERE CONSIDERATA UN TARGET TERAPEUTICO?

La scinderina è un regolatore dell'F-actina, un componente fondamentale del citoscheletro, gioca quindi un ruolo chiave nel rimodellamento morfologico degli epiteli, come è stato dimostrato in molteplici studi riguardanti la progressione delle neoplasie maligne [66] [48]. La regolazione della dinamica dei filamenti di actina è fondamentale per il comportamento della cellula [67].

Il citotrofoblasto villosa, che esprime la scinderina e che è significativamente più elevato nella PE, rappresenta il comparto staminale del trofoblasto responsabile dell'ampliamento del sinciziotrofoblasto che è la componente dei villi placentari a contatto con il sangue materno. Non solo, dal citotrofoblasto villosa si origina durante lo sviluppo placentare la componente extravillosa che è fondamentale per l'impianto della blastocisti e il mantenimento della gravidanza [68]. È noto che la scinderina è coinvolta nel rimodellamento subcorticale dell'actina e promuove la formazione di estensioni cellulari e degradazione del collagene nelle cellule MCF7, influenzando così l'invasione della matrice e le metastasi [69]. Poiché i meccanismi di mobilità ed invasività cellulare del trofoblasto sono molto simili ai meccanismi che si verificano durante i processi metastatici, studi futuri saranno incentrati sull'influenza dell'iper-espressione della scinderina sui meccanismi di proliferazione ed

invasività che sono notoriamente alterati nella PE. Dato che ad oggi non esistono cure definitive per la PE, lo studio delle vie di regolazione dell'espressione della scinderina potrebbero rivelare nuove o note proteine da usare come possibili target terapeutici per il controllo o la cura di questa patologia.

CAPITOLO 5- RINGRAZIAMENTI E BIBLIOGRAFIA

5.1 RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questo percorso mi sembra doveroso ringraziare le persone che mi hanno accompagnata in questa esperienza formante.

Ringrazio la mia relatrice Daniela Marzioni per avermi accolto in questo progetto entusiasmante, per i valori morali trasmessi, e per la sua disponibilità infinita.

Ringrazio il correlatore Giovanni Tossetta e la Dott.ssa Sonia Fantone per essermi stati accanto con molta pazienza, per aver condiviso i lati positivi e negativi di questo lavoro, ma soprattutto per avermi insegnato che la meritocrazia è una cosa rara e da proteggere. Spero di aver messo in questa ricerca almeno la metà della dedizione che ci avreste messo voi.

5.2 BIBLIOGRAFIA

- [1] E. Oral e M. R. Genç, «Hormonal monitoring of the first trimester of pregnancy», *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, vol. 31, fasc. 4, pp. 767–778, x, dic. 2004, doi: 10.1016/j.ogc.2004.08.004.

- [2] J. K. Cable e M. H. Grider, «Physiology, Progesterone», in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Consultato: 17 marzo 2024. [Online]. Disponibile su:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558960/>
- [3] P. Gowland, «Placental MRI», *Semin. Fetal. Neonatal Med.*, vol. 10, fasc. 5, pp. 485–490, ott. 2005, doi: 10.1016/j.siny.2005.05.001.
- [4] M. Furuya, J. Ishida, I. Aoki, e A. Fukamizu, «Pathophysiology of placentation abnormalities in pregnancy-induced hypertension», *Vasc. Health Risk Manag.*, vol. 4, fasc. 6, pp. 1301–1313, dic. 2008.
- [5] C. J. P. Jones e H. Fox, «Ultrastructure of the normal human placenta», *Electron Microsc. Rev.*, vol. 4, fasc. 1, pp. 129–178, gen. 1991, doi: 10.1016/0892-0354(91)90019-9.
- [6] «[Morphological characteristics of normal trophoblast and choriocarcinoma] - PubMed». Consultato: 14 dicembre 2023. [Online]. Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3188421/>
- [7] R. N. Baergen, «Gestational choriocarcinoma», *Gen. Diagn. Pathol.*, vol. 143, fasc. 2–3, pp. 127–141, nov. 1997.
- [8] D. D. Carson *et al.*, «Embryo Implantation», *Dev. Biol.*, vol. 223, fasc. 2, pp. 217–237, lug. 2000, doi: 10.1006/dbio.2000.9767.

- [9] J. D. Aplin, «The cell biological basis of human implantation», *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, vol. 14, fasc. 5, pp. 757–764, ott. 2000, doi: 10.1053/beog.2000.0116.
- [10] H. B., «The anatomy of the normal placenta», *J. Clin. Pathol.*, vol. 61, fasc. 12, dic. 2008, doi: 10.1136/jcp.2008.055277.
- [11] L. Vićovac, C. J. P. Jones, e J. D. Aplin, «Trophoblast differentiation during formation of anchoring villi in a model of the early human placenta in vitro», *Placenta*, vol. 16, fasc. 1, pp. 41–56, gen. 1995, doi: 10.1016/0143-4004(95)90080-2.
- [12] G. Latendresse e S. Founds, «The Fascinating and Complex Role of the Placenta in Pregnancy and Fetal Well-being», *J. Midwifery Womens Health*, vol. 60, fasc. 4, pp. 360–370, 2015, doi: 10.1111/jmwh.12344.
- [13] A. Filipek e E. Jurewicz, «[Preeclampsia - a disease of pregnant women]», *Postepy Biochem.*, vol. 64, fasc. 4, pp. 232–229, dic. 2018, doi: 10.18388/pb.2018_146.
- [14] D. Reingardiene, «[Preeclampsia and eclampsia]», *Med. Kaunas Lith.*, vol. 39, fasc. 12, pp. 1244–1252, 2003.
- [15] D. L. Rolnik, K. H. Nicolaides, e L. C. Poon, «Prevention of preeclampsia with aspirin», *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 226, fasc. 2S, pp. S1108–S1119, feb. 2022, doi: 10.1016/j.ajog.2020.08.045.

- [16] E. Overton, D. Tobes, e A. Lee, «Preeclampsia diagnosis and management», *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, vol. 36, fasc. 1, pp. 107–121, mag. 2022, doi: 10.1016/j.bpa.2022.02.003.
- [17] H. A. Boyd, H. Tahir, J. Wohlfahrt, e M. Melbye, «Associations of personal and family preeclampsia history with the risk of early-, intermediate- and late-onset preeclampsia», *Am. J. Epidemiol.*, vol. 178, fasc. 11, pp. 1611–1619, dic. 2013, doi: 10.1093/aje/kwt189.
- [18] T. L. Weissgerber e L. M. Mudd, «Preeclampsia and diabetes», *Curr. Diab. Rep.*, vol. 15, fasc. 3, p. 9, mar. 2015, doi: 10.1007/s11892-015-0579-4.
- [19] G. A. Dekker e B. M. Sibai, «Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts», *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 179, fasc. 5, pp. 1359–1375, nov. 1998, doi: 10.1016/s0002-9378(98)70160-7.
- [20] J. M. Roberts, R. N. Taylor, T. J. Musci, G. M. Rodgers, C. A. Hubel, e M. K. McLaughlin, «Preeclampsia: an endothelial cell disorder», *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 161, fasc. 5, pp. 1200–1204, nov. 1989, doi: 10.1016/0002-9378(89)90665-0.
- [21] P. A. Conz e C. Catalano, «[Physiopathology of pre-eclampsia]», *G. Ital. Nefrol. Organo Uff. Della Soc. Ital. Nefrol.*, vol. 20, fasc. 1, pp. 15–22, 2003.

- [22] J. S. Tyrmi *et al.*, «Genetic Risk Factors Associated With Preeclampsia and Hypertensive Disorders of Pregnancy», *JAMA Cardiol.*, vol. 8, fasc. 7, pp. 674–683, lug. 2023, doi: 10.1001/jamacardio.2023.1312.
- [23] L. Poston *et al.*, «Preconceptional and maternal obesity: epidemiology and health consequences», *Lancet Diabetes Endocrinol.*, vol. 4, fasc. 12, pp. 1025–1036, dic. 2016, doi: 10.1016/S2213-8587(16)30217-0.
- [24] E. Deer *et al.*, «The role of immune cells and mediators in preeclampsia», *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 19, fasc. 4, pp. 257–270, apr. 2023, doi: 10.1038/s41581-022-00670-0.
- [25] M. Homzová e A. Ostró, «[Current views on the etiopathogenesis of preeclampsia]», *Ceska Gynekol.*, vol. 66, fasc. 4, pp. 276–280, lug. 2001.
- [26] C. R. V. Leal, L. B. Costa, G. C. Ferreira, A. de M. Ferreira, F. M. Reis, e A. C. Simões E Silva, «Renin-angiotensin system in normal pregnancy and in preeclampsia: A comprehensive review», *Pregnancy Hypertens.*, vol. 28, pp. 15–20, giu. 2022, doi: 10.1016/j.preghy.2022.01.011.
- [27] J. D. Aplin e C. J. P. Jones, «Cell dynamics in human villous trophoblast», *Hum. Reprod. Update*, vol. 27, fasc. 5, pp. 904–922, set. 2021, doi: 10.1093/humupd/dmab015.

- [28] A. Malek, R. Sager, e H. Schneider, «Effect of hypoxia, oxidative stress and lipopolysaccharides on the release of prostaglandins and cytokines from human term placental explants», *Placenta*, vol. 22 Suppl A, pp. S45-50, apr. 2001, doi: 10.1053/plac.2001.0635.
- [29] Y. Wang, S. W. Walsh, e H. H. Kay, «Placental lipid peroxides and thromboxane are increased and prostacyclin is decreased in women with preeclampsia», *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 167, fasc. 4, pp. 946–949, ott. 1992, doi: 10.1016/S0002-9378(12)80017-2.
- [30] S. W. Walsh, Y. Wang, e R. Jesse, «Placental Production of Lipid Peroxides, Thromboxane, And Prostacyclin in Preeclampsia», *Hypertens. Pregnancy*, vol. 15, fasc. 1, pp. 101–111, gen. 1996, doi: 10.3109/10641959609015693.
- [31] D. B. Nelson, M. S. Ziadie, D. D. McIntire, B. B. Rogers, e K. J. Leveno, «Placental pathology suggesting that preeclampsia is more than one disease», *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 210, fasc. 1, p. 66.e1–7, gen. 2014, doi: 10.1016/j.ajog.2013.09.010.
- [32] R. S. Cotran e J. S. Pober, «Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury», *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 1, fasc. 3, pp. 225–235, set. 1990, doi: 10.1681/ASN.V13225.

- [33] M. J. Kupferminc, A. M. Peaceman, T. R. Wigton, K. A. Rehnberg, e M. L. Socol, «Tumor necrosis factor- α is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia», *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 170, fasc. 6, pp. 1752–1759, giu. 1994, doi: 10.1016/S0002-9378(94)70351-5.
- [34] B. K. Rinehart *et al.*, «Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor α , interleukin 1 β , and interleukin 10 is increased in preeclampsia», *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 181, fasc. 4, pp. 915–920, ott. 1999, doi: 10.1016/S0002-9378(99)70325-X.
- [35] I. J. Elenkov, D. G. Iezzoni, A. Daly, A. G. Harris, e G. P. Chrousos, «Cytokine Dysregulation, Inflammation and Well-Being», *Neuroimmunomodulation*, vol. 12, fasc. 5, pp. 255–269, set. 2005, doi: 10.1159/000087104.
- [36] D. C. Cornelius, «Preeclampsia: From Inflammation to Immunoregulation», *Clin. Med. Insights Blood Disord.*, gen. 2018, doi: 10.1177/1179545X17752325.
- [37] K. P. Conrad e D. F. Benyo, «Placental Cytokines and the Pathogenesis of Preeclampsia», *Am. J. Reprod. Immunol.*, vol. 37, fasc. 3, pp. 240–249, 1997, doi: 10.1111/j.1600-0897.1997.tb00222.x.

- [38] D. F. Benyo, T. M. Miles, e K. P. Conrad, «Hypoxia Stimulates Cytokine Production by Villous Explants from the Human Placenta», vol. 82, fasc. 5, 2018.
- [39] S. Mitchell, J. Vargas, e A. Hoffmann, «Signaling via the NF κ B system», *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, vol. 8, fasc. 3, pp. 227–241, mag. 2016, doi: 10.1002/wsbm.1331.
- [40] J. Mackie, C. S. Ma, S. G. Tangye, e A. Guerin, «The ups and downs of STAT3 function: too much, too little and human immune dysregulation», *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 212, fasc. 2, pp. 107–116, apr. 2023, doi: 10.1093/cei/uxad007.
- [41] S. Maekawa e H. Sakai, «Inhibition of actin regulatory activity of the 74-kDa protein from bovine adrenal medulla (adseverin) by some phospholipids», *J. Biol. Chem.*, vol. 265, fasc. 19, pp. 10940–10942, lug. 1990.
- [42] A. Rodriguez Del Castillo *et al.*, «Chromaffin cell scinderin, a novel calcium-dependent actin filament-severing protein», *EMBO J.*, vol. 9, fasc. 1, pp. 43–52, gen. 1990, doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb08078.x.
- [43] S. Chumnarnsilpa *et al.*, «The crystal structure of the C-terminus of adseverin reveals the actin-binding interface», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol.

106, fasc. 33, pp. 13719–13724, ago. 2009, doi:

10.1073/pnas.0812383106.

- [44] L. Tchakarov, M. L. Vitale, M. Jeyapragasan, A. Rodriguez Del Castillo, e J. M. Trifaró, «Expression of scinderin, an actin filament-severing protein, in different tissues», *FEBS Lett.*, vol. 268, fasc. 1, pp. 209–212, lug. 1990, doi: 10.1016/0014-5793(90)81010-1.
- [45] J. M. Trifaró, «Scinderin and cortical F-actin are components of the secretory machinery», *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 77, fasc. 9, pp. 660–671, set. 1999.
- [46] H. Liu, D. Shi, T. Liu, Z. Yu, e C. Zhou, «Lentivirus-mediated silencing of SCIN inhibits proliferation of human lung carcinoma cells», *Gene*, vol. 554, fasc. 1, pp. 32–39, gen. 2015, doi: 10.1016/j.gene.2014.10.013.
- [47] D. Wang, S.-Q. Sun, Y.-H. Yu, W.-Z. Wu, S.-L. Yang, e J.-M. Tan, «Suppression of SCIN inhibits human prostate cancer cell proliferation and induces G0/G1 phase arrest», *Int. J. Oncol.*, vol. 44, fasc. 1, pp. 161–166, gen. 2014, doi: 10.3892/ijo.2013.2170.
- [48] J.-J. Liu *et al.*, «Scinderin promotes the invasion and metastasis of gastric cancer cells and predicts the outcome of patients», *Cancer Lett.*,

- vol. 376, fasc. 1, pp. 110–117, giu. 2016, doi:
10.1016/j.canlet.2016.03.035.
- [49] W. Jian *et al.*, «Scinderin-knockdown inhibits proliferation and promotes apoptosis in human breast carcinoma cells», *Oncol. Lett.*, vol. 16, fasc. 3, pp. 3207–3214, set. 2018, doi: 10.3892/ol.2018.9009.
- [50] X. Qiao *et al.*, «Scinderin is a novel transcriptional target of BRMS1 involved in regulation of hepatocellular carcinoma cell apoptosis», *Am. J. Cancer Res.*, vol. 8, fasc. 6, pp. 1008–1018, 2018.
- [51] Y. Wang, Z. Li, L. Bai, D. Zhang, T. Zhang, e F. Ren, «Scinderin Is a Novel Oncogene for Its Correlates with Poor Prognosis, Immune Infiltrates and Matrix Metalloproteinase-2/9 (MMP2/9) in Glioma», *Brain Sci.*, vol. 12, fasc. 10, p. 1415, ott. 2022, doi: 10.3390/brainsci12101415.
- [52] E. Piktel, I. Levental, B. Durnaś, P. A. Janmey, e R. Bucki, «Plasma Gelsolin: Indicator of Inflammation and Its Potential as a Diagnostic Tool and Therapeutic Target», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, fasc. 9, p. 2516, ago. 2018, doi: 10.3390/ijms19092516.
- [53] L. Spinardi e W. Witke, «Gelsolin and diseases», *Subcell. Biochem.*, vol. 45, pp. 55–69, 2007, doi: 10.1007/978-1-4020-6191-2_3.

- [54] Y. Wang *et al.*, «IL1 β and TNF α promote RANKL-dependent adseverin expression and osteoclastogenesis», *J. Cell Sci.*, vol. 131, fasc. 11, p. jcs213967, giu. 2018, doi: 10.1242/jcs.213967.
- [55] C. Svensson e K. Lundberg, «Immune-specific up-regulation of adseverin gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin», *Mol. Pharmacol.*, vol. 60, fasc. 1, pp. 135–142, lug. 2001, doi: 10.1124/mol.60.1.135.
- [56] Z. Wang *et al.*, «Acetylcholine ameliorated TNF- α -induced primary trophoblast malfunction via muscarinic receptors†», *Biol. Reprod.*, vol. 103, fasc. 6, pp. 1238–1248, dic. 2020, doi: 10.1093/biolre/ioaa158.
- [57] M. Jovanovic, T. Kovacevic, I. Stefanoska, e L. Vicovac, «The effect of IL-6 on the trophoblast cell line HTR-8/SVneo», *Arch. Biol. Sci.*, vol. 62, fasc. 3, pp. 531–538, 2010, doi: 10.2298/ABS1003531J.
- [58] X. Zhou, G. Zhang, J. Wang, S. Lu, J. Cao, e L. Sun, «A novel bridge between oxidative stress and immunity: the interaction between hydrogen peroxide and human leukocyte antigen G in placental trophoblasts during preeclampsia», *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 206, fasc. 5, p. 447.e7–16, mag. 2012, doi: 10.1016/j.ajog.2012.03.013.
- [59] P. Chen *et al.*, «Potential Pathophysiological Mechanisms Underlying Multiple Organ Dysfunction in Cytokine Release Syndrome», *Mediators*

- Inflamm.*, vol. 2022, fasc. 1, p. 7137900, 2022, doi: 10.1155/2022/7137900.
- [60] G. D’Orazi, M. Cordani, e M. Cirone, «Oncogenic pathways activated by pro-inflammatory cytokines promote mutant p53 stability: clue for novel anticancer therapies», *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 78, fasc. 5, pp. 1853–1860, mar. 2021, doi: 10.1007/s00018-020-03677-7.
- [61] W. He, P. Chen, Q. Chen, Z. Cai, e P. Zhang, «Cytokine storm: behind the scenes of the collateral circulation after acute myocardial infarction», *Inflamm. Res.*, vol. 71, fasc. 10, pp. 1143–1158, nov. 2022, doi: 10.1007/s00011-022-01611-0.
- [62] E. Shaulian e M. Karin, «Shaulian E, Karin M.. AP-1 as a regulator of cell life and death. Nat Cell Biol 4: E131-E136», *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, pp. E131-6, giu. 2002, doi: 10.1038/ncb0502-e131.
- [63] C. Tsatsanis, A. Androulidaki, M. Venihaki, e A. N. Margioris, «Signalling networks regulating cyclooxygenase-2», *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 38, fasc. 10, pp. 1654–1661, gen. 2006, doi: 10.1016/j.biocel.2006.03.021.
- [64] G. Bonizzi, J. Piette, M. P. Merville, e V. Bours, «Distinct signal transduction pathways mediate nuclear factor-kappaB induction by IL-

- 1beta in epithelial and lymphoid cells.», *J. Immunol.*, vol. 159, fasc. 11, pp. 5264–5272, dic. 1997, doi: 10.4049/jimmunol.159.11.5264.
- [65] B. Lestari, T. Fukushima, R. Y. Utomo, e M. S. H. Wahyuningsih, «Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in placenta physiology and pathology», *Placenta*, vol. 151, pp. 37–47, giu. 2024, doi: 10.1016/j.placenta.2024.03.013.
- [66] X. Lin, Z. Zhao, S.-P. Sun, e W. Liu, «Scinderin promotes glioma cell migration and invasion via remodeling actin cytoskeleton», *World J. Clin. Oncol.*, vol. 15, fasc. 1, pp. 32–44, gen. 2024, doi: 10.5306/wjco.v15.i1.32.
- [67] J. Zhang *et al.*, «Epithelial Gasdermin D shapes the host-microbial interface by driving mucus layer formation», *Sci. Immunol.*, vol. 7, fasc. 68, p. eabk2092, feb. 2022, doi: 10.1126/sciimmunol.abk2092.
- [68] L. Resta e S. Sblano, «DAL TROFOBLASTO ALLA PLACENTA Matura: ASPETTI MORFO-FUNZIONALI», vol. 7.
- [69] J. Tanic, Y. Wang, W. Lee, N. M. Coelho, M. Glogauer, e C. A. McCulloch, «Adseverin modulates morphology and invasive function of MCF7 cells», *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, vol. 1865, fasc. 10, pp. 2716–2725, ott. 2019, doi: 10.1016/j.bbadis.2019.07.015.