



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale
BIOLOGIA MOLECOLARE ED APPLICATA**

Caratterizzazione molecolare della placenta di pazienti con pre-eclampsia

The molecular characterization of placenta in pre-eclampsia patients

Tesi di Laurea Magistrale di
Bosco Elisa Anna Maria

Relatore:
Chiar.ma Prof. ssa Carnevali Oliana

Correlatore:
Chiar.ma Prof.ssa Giorgini Elisabetta
Dott.ssa Lombò Marta

Sessione Estiva 2022

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

Capitolo primo

INTRODUZIONE	5
---------------------	----------

<i>1.1 La placenta</i>	5
-------------------------------	----------

<i>1.2 Il sistema endocannabinoide nella placenta</i>	11
--	-----------

<i>1.3 La pre-eclampsia</i>	14
------------------------------------	-----------

<i>1.4 Implicazioni dello stress ossidativo nella placenta</i>	19
---	-----------

<i>1.5 Implicazioni del ECS nella pre-eclampsia</i>	20
--	-----------

<i>1.6 Ipotesi del lavoro</i>	21
--------------------------------------	-----------

<i>1.7 Scopo del lavoro</i>	22
------------------------------------	-----------

Capitolo secondo

MATERIALI E METODI	23
---------------------------	-----------

<i>2.1 Campioni</i>	23
----------------------------	-----------

<i>2.2 Analisi istologica</i>	23
--------------------------------------	-----------

<i>2.3 FTIR Imaging</i>	26
--------------------------------	-----------

<i>2.4 Estrazione di RNA totale</i>	28
--	-----------

<i>2.4.1 Digestione con DNasi e preparazione di cDNA</i>	29
<i>2.4.2 Real-time qPCR</i>	29
<i>2.5 Western Blot</i>	30
<i>2.6 Immunoistochimica</i>	32
<i>2.7 Analisi statistica</i>	33
 <i>Capitolo terzo</i>	
RISULTATI	35
<i>3.1 Caratterizzazione istologica</i>	35
<i>3.2 Analisi FTIR</i>	36
<i>3.3 Analisi vibrazionale della composizione macromolecolare</i>	38
<i>3.4 Analisi dell'espressione genica mediante RT-qPCR</i>	42
<i>3.5 Quantificazione delle proteine mediante WB</i>	43
<i>3.6 Quantificazione dell'espressione dei recettori dell'ECS nei villi mediante analisi immunoistochimica</i>	44
 <i>Capitolo quarto</i>	
DISCUSSIONE	46

Capitolo quinto

CONCLUSIONI **51**

BIBLIOGRAFIA **52**

INTRODUZIONE

Capitolo primo

1.1 La placenta

La placenta è un organo deciduo, eterogeneo che si interfaccia tra la madre ed il feto. Media lo scambio di gas, nutrienti, sostanze di rifiuto e produce ormoni e fattori di crescita che supportano lo sviluppo del feto ed assicurano una gravidanza sana. Deriva da tessuti extraembrionali e si sviluppa rapidamente durante le prime settimane di gestazione, modificando dinamicamente la propria struttura e funzione (Hamilton WJ, Boyd 1960, Burton GJ et al. 2015). Inizialmente la placenta genera trofoblasti epiteliali con diverse funzioni biologiche, l'adesione del conceptus alla parete uterina, l'instaurazione di una nutrizione istiotrofica precoce (nutrimento del feto grazie a secrezioni ghiandolari deciduali) e l'adattamento della vascolarizzazione uterina materna (Burton GJ et al 2010, Red-Horse K et al. 2004). Si ha la formazione di diversi trofoblasti, tra cui cellule staminali, progenitori e sottotipi differenziati con molteplici funzioni (Gamage TK et al. 2016). Lo sviluppo della placenta ha inizio con la formazione del trofoectoderma e della massa cellulare interna (ICM). L'embrione a questo stadio di sviluppo pre-impianto viene chiamato blastocisti. L'impianto inizia intorno al 7° giorno dalla fecondazione, quando la

blastocisti inizia ad aderire all'epitelio uterino (Hertig 1956). Intorno al 13° giorno si ha la formazione dei villi primari, le cellule del citotrofoblasto alla base del sinciziotrofoblasto (SCT) proliferano in colonne e penetrano nel cordone del SCT. Due giorni dopo si ha l'invasione dei villi primari da parte di un nucleo di tessuto connettivo derivato dal mesenchima extraembrionale che li trasforma in villi secondari (Boyd & Hamilton 1970). A seguire, entro il 20° giorno si ha la formazione dei villi terziari poiché i vasi sanguigni fetali iniziano a formarsi all'interno dei villi, la cui prima generazione è costituita dai villi mesenchimali. Lo sviluppo di nuovi villi si ripete per tutta la durata della gravidanza. Intorno alla 5° settimana, si assiste all'inizio della differenziazione dei villi mesenchimali in villi intermedi immaturi, con la comparsa di canali stromali dovuto ad un aumento del diametro dei villi, ed infine in villi staminali attraverso la fibrosi stromale centrale (Castellucci et al. 1990). Dalla 23° settimana fino al parto, ha inizio la differenziazione dei villi mesenchimali in villi intermedi maturi, da cui si originano villi terminali altamente capillarizzati. I villi terminali capillarizzati iniziano ad apparire alla 25° settimana post-fecondazione, rappresentando il 40% circa del volume dei villi della placenta al termine della gravidanza. Anche se la crescita dei villi rallenta nella tarda gravidanza, continua a crescere verso il termine (Boyd 1984). Se l'ambiente materno diventa sfavorevole, la componente villosa continuerà a ramificarsi

oltre il termine. Il SCT è un rivestimento esterno dei villi placentari che è in contatto diretto con le secrezioni ghiandolari materne e, successivamente, con il sangue materno che scorre nello spazio intervilloso (Fig.1) (Turco, Moffett 2019).

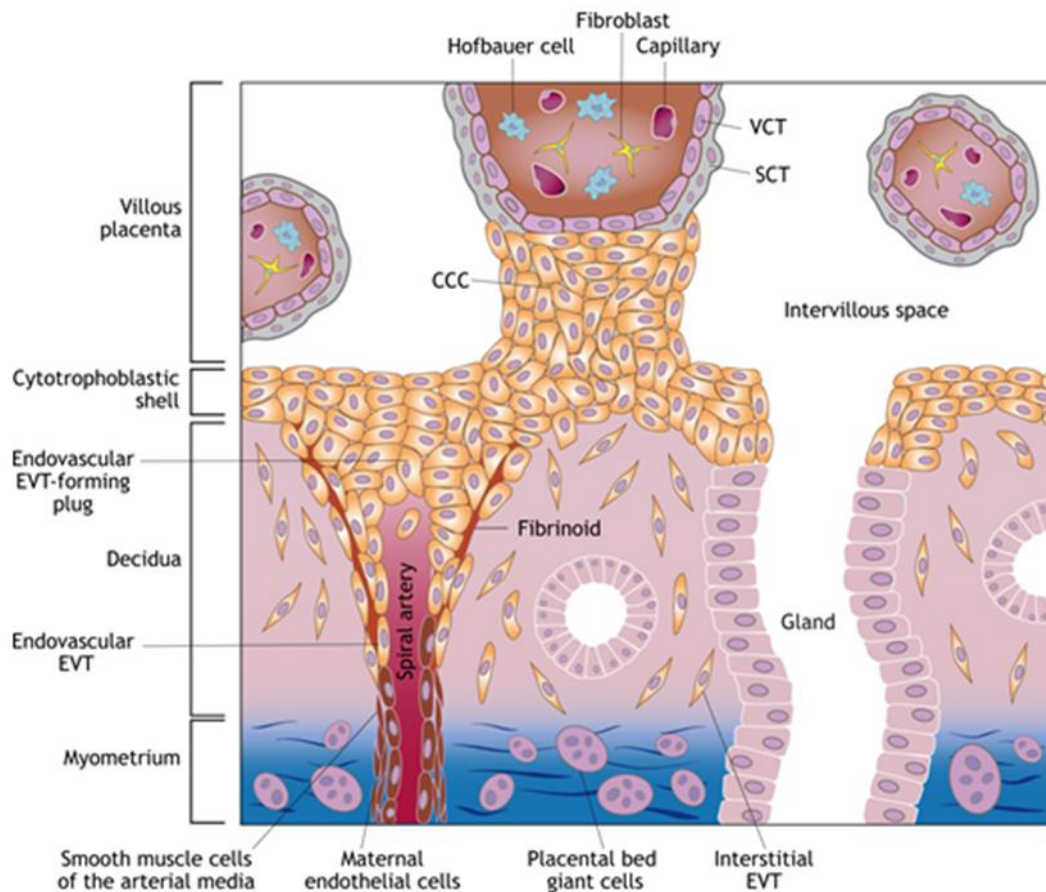


Figura 1. Interfaccia materno-fetale e i sottotipi di trofoblasto. Sono rappresentate le cellule contenute nei villi della placenta del primo trimestre e i sottotipi di trofoblasto in relazione alla decidua. Sono indicati il sincotrofoblasto (SCT, grigio), il citotrofoblasto villosa (VCT, rosa), la colonna di cellule citotrofoblastiche (CCC) e le popolazioni di trofoblasto extravillioso (EVT).

Il VCT mononucleato si trova sotto il SCT al di sopra di una membrana basale. Le cellule del VCT sono state considerate lo strato "germinativo" del trofoblasto perché sono mitotiche ed esprimono marcatori proliferativi (Simpson et al., 1992). Le VCT all'inizio della gravidanza formano uno strato continuo ed hanno una forma cuboidale con un ampio rapporto nucleo/citoplasma. Quando gli alberi villosi si espandono e, solo un sottile strato sinciziale separa la maggior parte del nucleo villosa dal sangue materno, lo strato di VCT diventa discontinuo e copre solo il 25% della superficie villosa al termine della gravidanza (Benirschke et al., 2012). Man mano che la placenta aumenta le sue dimensioni, l'involucro del citotrofoblasto diventa discontinuo e le colonne di cellule citotrofoblastiche (CCC) affiorano dai villi di ancoraggio a contatto con la decidua. Le cellule delle colonne sono arrotondate e ricche di glicogeno. Le TEV migrano nella decidua secondo due percorsi di differenziazione: le TEV interstiziali (iEVT) migrano nel mezzo dello stroma deciduale verso le arterie spirali materne, mentre le TEV endovascolari trofoblastiche (eEVT) si muovono verso l'interno delle arterie spirali (Pijnenborg et al., 1980). Nella decidua, gli eEVT hanno una morfologia fusiforme con nuclei tetraploidi (Velicky et al., 2018). Migrano verso le arterie spirali per formare una cuffia di cellule circostanti. Questo cambiamento è associato alla perdita di actina nelle cellule muscolari lisce della media

arteriosa, che viene sostituita da materiale amorfo eosinofilo, portando alla formazione di fibrina (Pijnenborg et al. 2006). Questa trasformazione è mediata dai trofoblasti e comporta sia la perdita della vasoattività che la conversione in un vaso capace di un'elevata conduttanza a bassa pressione, essenziale per avere una gravidanza normale (Brosens, Renaer 1972). Le iEVT invadono fino al terzo interno del miometrio (strato muscolare della parete uterina) (Pijnenborg et al., 1980). Dopo la trasformazione arteriosa, l' eEVT si muovono in modo retrogrado lungo l'arteria formando un tappo che impedisce l'ingresso del sangue nello spazio intervilloso fino al termine del primo trimestre, quando si stabilisce la circolazione emocoriale completa (Boyd e Hamilton, 1970; Burton et al., 1999; Hustin e Schaaps, 1987). Oltre alle cellule del trofoblasto, la placenta contiene numerosi tipi di cellule presenti nel nucleo stromale dei villi, tra cui fibroblasti, cellule immunitarie e vascolari (Boss et al., 2018). Sono stati caratterizzati numerosi fattori solubili, come il fattore di crescita epidermico (EGF), che promuovono la sincializzazione del trofoblasto (Morriish DW et al. 1987, Huppertz et al. 2011). Molte proteine secrete dal trofoblasto stimolano la fusione cellulare grazie all'aumento della concentrazione di adenosin monofosfato ciclico (cAMP) (Gerbaud, Pidoux 2015, Keryer G et al. 1998, Knöfler et al. 2000). L'epitelio del trofoblasto villosa esprime anche proteine fusogeniche sincitina-1 e -2 che interagiscono con i rispettivi recettori, che sono

i trasportatori di aminoacidi neutri sodio-dipendenti (ASCT1 e ASCT2) ed il dominio della superfamiglia del maggior facilitatore contenente 2a (MFSD2a) (Lokossou et al. 2014). Sono stati identificati altri regolatori trascrizionali, l'attivatore della proteina 2 α (AP-2 α), il distal-less homeobox 3 (DLX3) e il recettore gamma attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR- γ), che modulano la sincizializzazione dei trofoblasti a termine (Loregger T et al. 2003, Murthi P et al. 2013). Ad ogni modo, resta in gran parte sconosciuto in che misura i meccanismi molecolari della fusione cellulare possano differire tra il primo e il terzo trimestre. Dopo l'attacco alla matrice, le colture purificate di CTB inducono spontaneamente i marcatori del trofoblasto migratorio, il proteoglicano 2 (PRG2), human leukocyte antigen (HLA-G), l'oncogene eritroblastico B2 (ErbB2) e le proteine specifiche delle EVT, l'integrina α 1 (ITGA1) e α 5 (ITGA5) (Windsperger K, et al. 2017, Damsky CH et al. 1992, Fock V et al. 2015, Kovats S et al. 1990), che regolano le matrice-metalloproteinasi ed enzimi proteolitici per l'invasione della decidua (Fisher SJ et al. 1989, Pollheimer J et al. 2014). È stato dimostrato che fattori trascrizionali come Glial Cells Missing Transcription Factor 1 (GCM1), AP-2 α , trasduttore e attivatore del segnale di trascrizione 3 (STAT3) e FOS like 1 (FOSL1), regolano l'invasione del trofoblasto e l'espressione genica specifica della EVT in diversi modelli cellulari (Baczyk D et al. 2009, Biadasiewicz K et al. 2011,

Poehlmann TG et al. 2005, Renaud SJ et al. 2014). Inoltre, nella placenta precoce il fattore 1 inducibile dall'ipossia (HIF-1) è espresso solo dalle EVT (Wakeland AK et al. 2017). Un'altra via critica che regola la funzione delle EVT è la segnalazione di Wnt (Sonderegger S et al. 2010). L'attività dei complessi nucleari Wnt-dipendenti T cell factor 4 (TCF4)/ β -catenina è indotta durante la formazione delle EVT, il silenziamento di TCF4 ne compromette l'espressione dei geni dell' EVT (Meinhardt G et al. 2014, Pollheimer J et al. 2006). La formazione di EVT potrebbe essere modulata in modo autocrino che opera indipendentemente dall'ambiente circostante.

1.2 Il sistema endocannabinoide nella placenta

Il sistema endocannabinoide (ECS) è un complesso sistema biologico composto da endocannabinoidi, che sono molecole di segnalazione lipidica i quali si legano ai recettori dei cannabinoidi, CB1, CB2, il TRPV1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member GRP55 e GRP119), e da enzimi di sintesi e degradazione (Fig. 2).

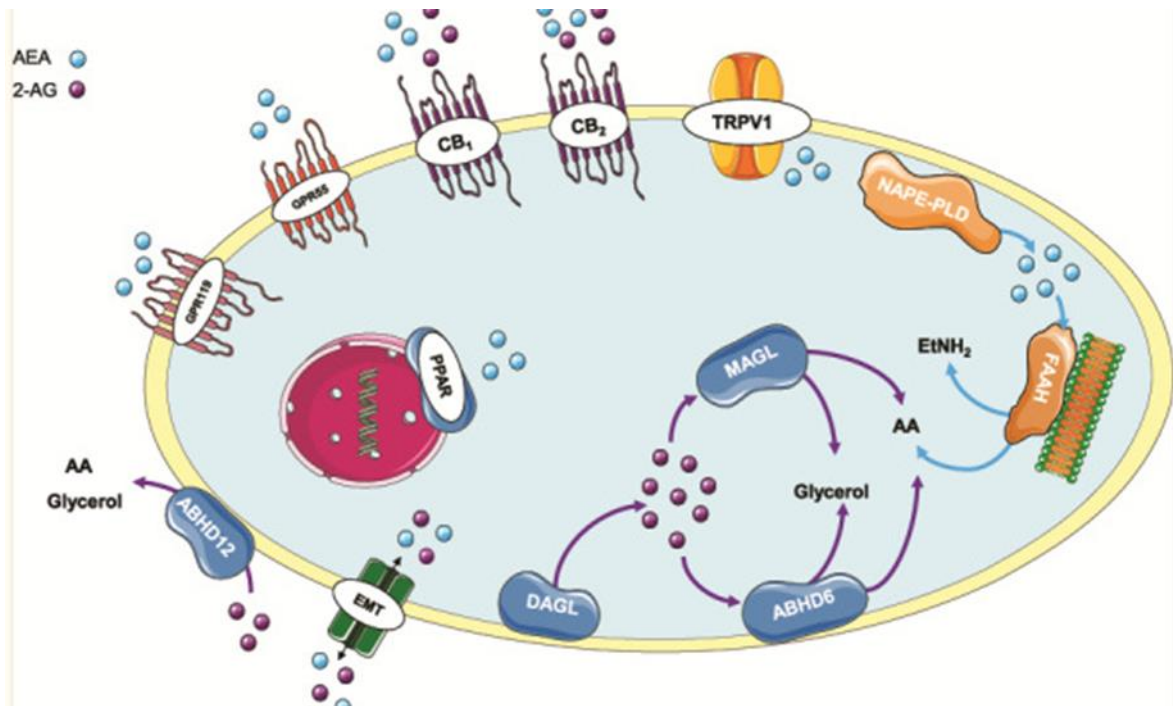


Figura 2. Gli elementi del sistema endocannabinoide e i relativi recettori (J Maia et al.2020).

L' ECS è presente in modo ubiquitario negli organi e regola importanti funzioni in diversi processi fisiologici e fisiopatologici, inclusi dolore, neuroprotezione, morte cellulare, infiammazione, appetito e riproduzione. (P. Pacher et al. 2013).

CB1 e CB2 appartengono alla super famiglia delle proteine dei recettori 7-transmembrane associati a proteine G (GPCR) (Fernando Correa et al. 2016). Presentano un'unica catena polipeptidica che attraversa per 7 volte la membrana plasmatica, con la porzione ammino-terminale sul versante extracellulare e quella carbossilica su quello intracellulare. Inoltre sono presenti 3 loops intracellulari e 3 extracellulari. L'attivazione di CB1 e CB2 causa l'inibizione dell' cAMP, l'attivazione delle vie di segnalazione delle proteine

chinasi attivate da mitogeni (MAPK), l'apertura dei canali del Ca^{2+} e K^{+} verso l'interno e attivazione della fosfolipasi C (Fernando Correa et al. 2016). Il TRPV1 è noto anche come recettore vanilloide 1 e recettore della capsaicina. CB1 e TRPV1 sono espressi nei citotrofoblasti e nel SCT e sono coinvolti nell'apoptosi e nella differenziazione dei citotrofoblasti (M.A.Costa et al. 2014). Gli endocannabinoidi, operando come fattori autocrini/paracrini, sono sintetizzati de novo su richiesta attraverso l'idrolisi dei precursori lipidici della membrana cellulare. La via biosintetica per la sintesi dell'anandamide (AEA) è l'azione sequenziale della N-aciltransferasi (NAT) e della N-acilfosfatidiletanolamina D (NAPE-PLD) (Di Marzo et al. 1994). Per il 2-AG si ha l'idrolisi del fosfatidilinositolo da parte della fosfolipasi C (PLC), producendo 1,2-diacilglicerolo (DAG), che viene successivamente convertito in 2-AG da una diacilglicerolo lipasi α/β (DAGL) (Di Marzio et al. 1994). L'AEA viene degradato dalla *fatty acid amide hydrolase* (FAAH) (Cravatt et al. 1996); invece il 2-AG è degradato dalla monoacilglicerolo lipasi (MAGL) (Dinh et al. 2002). Tuttavia, l'AEA e il 2-AG possono essere ossidati dalla ciclossigenasi-2 (COX-2), da distinte lipossigenasi (LOX) o dal citocromo P450 (CYP) in prodotti metabolici che producono effetti biologici con meccanismi indipendenti da quello dell'ECS (Maia et al. 2020). Nella placenta, l'ECS svolge un ruolo importante durante il processo di impianto che richiede

una comunicazione bidirezionale altamente sincronizzata e complessa tra la blastocisti e l'endometrio uterino. Un delicato equilibrio tra la sintesi di AEA (ad opera del NAPE-PLD) e la degradazione (da parte della FAAH) è necessario per garantire un' adeguata concentrazione di AEA durante l'impianto. Il sito di impianto presenta bassi livelli di AEA grazie all'alta espressione di FAAH e alla bassa espressione di NAPE-PLD. Mentre, il tessuto adiacente presenta alte concentrazioni di AEA esprimendo alte concentrazioni di NAPE-PLD e bassi livelli di FAAH (Fernando Correa et al 2016). La segnalazione dell'ECS interviene nei processi di proliferazione, differenziazione, le proprietà invasive, l'apoptosi e la funzione dei trofoblasti che sono eventi regolati da numerose citochine, fattori di crescita, lipidi e altre molecole, che lavorano insieme per realizzare la normale formazione e lo sviluppo della placenta (Costa 2015).

1.3 La pre-eclampsia

La pre-eclampsia è una condizione patologica della gravidanza caratterizzata da ipertensione e proteinuria che si sviluppa dopo la 20^o settimana di gestazione in donne incinte con pressione sanguigna sia normale che ipertesa e colpisce

sia la madre che il nascituro. La pre-eclampsia colpisce l'1-5% delle gravidanze ed è stimato che sia responsabile di 70.000-80.000 morti materne e 500.000 morti perinatali nel mondo ogni anno (Holland et al. 2018). Sono stati identificati molteplici fattori di rischio per l'insorgenza della pre-eclampsia, condizioni mediche preesistenti, come: il diabete mellito di tipo I, la sindrome antifosfolipidica, l'ipertensione, l'obesità, età (≥ 40 anni), tecniche di riproduzione assistita, ma anche anamnesi familiare o di una precedente gravidanza con pre-eclampsia. (Kenny L. et al. 2015). Nel feto, comporta una restrizione della crescita intrauterina e un parto pretermine con conseguenze, come i disturbi dello sviluppo neurologico (Batalle et al., 2012). Inoltre, vi è anche un profondo rimodellamento del sistema vascolare dei neonati affetti, soprattutto per i nati pretermine. Nella madre, il danno endoteliale invece è alla base delle manifestazioni cliniche e patologiche che comprendono arteriosi acuta, emolisi, ipertensione, trombocitopenia, emolisi, convulsioni, insufficienza renale e proteinuria (Boos e Lip, 2006; Nizet e Johnson, 2009; Palazón et al., 2012). La pre-eclampsia può svilupparsi in qualsiasi momento dopo la 20° settimana di gestazione ed è classificata in pre-eclampsia ad insorgenza precoce EOPE (<34 settimane) e pre-eclampsia a insorgenza tardiva (LOPE). L'EOPE viene considerato un disturbo fetale più grave, associata a un impianto placentare inadeguato e a una conseguente disfunzione placentare, a

una restrizione della crescita intrauterina, a un basso peso alla nascita, alla morte perinatale e a esiti negativi sia per il feto che per la madre. Invece, la LOPE è considerata un disturbo materno spesso associato a una placentazione normale ma con un volume placentare maggiore, a una crescita fetale normale comunque associata ad esiti materni e fetali favorevoli. Nelle placente pre-eclamptiche è presente aterosi, restringimento sclerotico di arterie e arteriole, deposizione di fibrina e infarti, sono tutti coerenti con l'ipoperfusione e l'ischemia placentare e sembrano correlarsi con la gravità della pre-eclampsia (Hecht JL et al. 2016). E' presente anche una marcata ipertrofia dei vasi decidui, nota come vasculopatia decidua ipertrofica (Hecht JL et al. 2016) (FIG. 3). Nella pre-eclampsia si ipotizza che la causa sia un impianto superficiale della placenta nella parete uterina (Jung et al., 2012). In una gravidanza normale, le arterie a spirale nell'endometrio e nella decidua (il rivestimento uterino che forma la parte materna della placenta) sono rimodellate dai trofoblasti extravillosi in vasi a bassa pressione. Tuttavia, in questa patologia, il rimodellamento è limitato alla decidua, e di conseguenza uno scarso sviluppo della placenta (Pijnenborg et al., 2006; Jung et al., 2012).

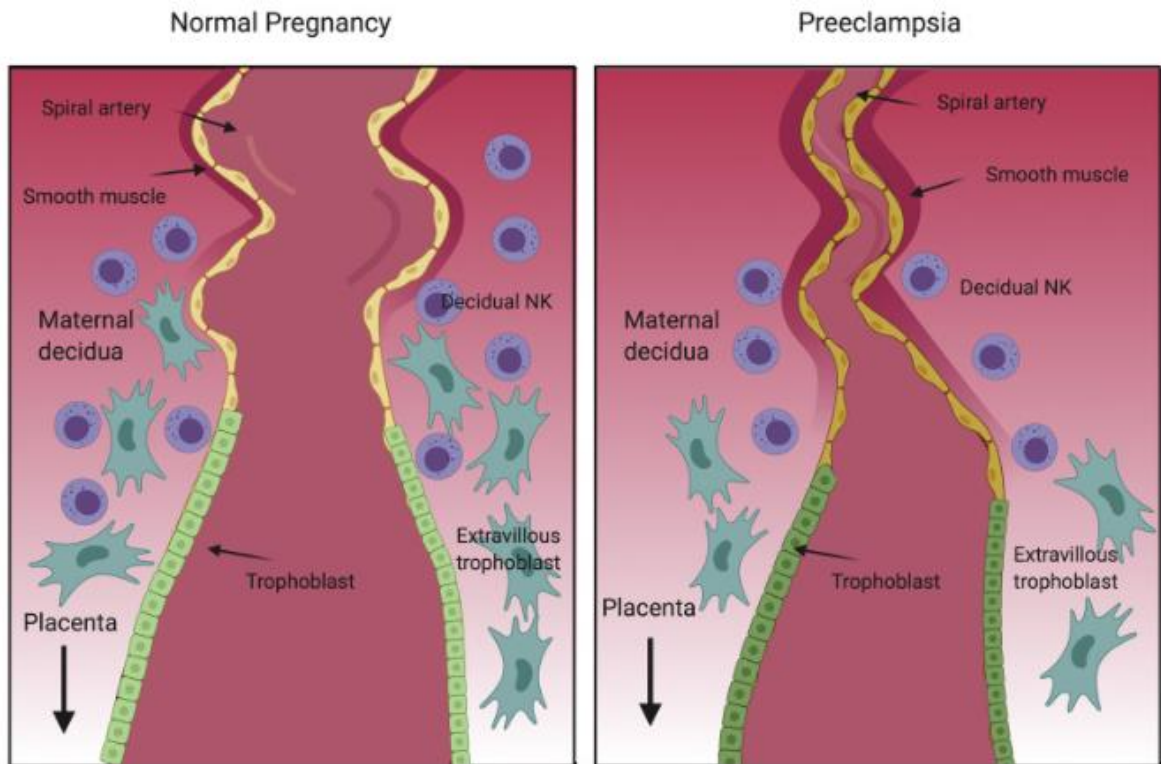


Figura 3. Arteria spirale. Normalmente durante lo sviluppo della placenta, i citotrofoblasti invasivi di origine fetale invadono le arterie spirali materne, trasformandole da vasi di resistenza di piccolo calibro a vasi di capacità di alto calibro capaci di fornire una perfusione placentare adeguata per sostenere il feto. Durante il processo di invasione vascolare, i citotrofoblasti si differenziano da un fenotipo epiteliale a un fenotipo endoteliale (figura a sinistra). Nella pre-eclampsia, i citotrofoblasti non riescono ad adottare un fenotipo endoteliale invasivo. Al contrario, l'invasione delle arterie spirali è superficiale e queste rimangono vasi di piccolo calibro e ad alta resistenza che comportano un'ischemia placentare (pannello di destra) (Rana et al. 2020).

Alcuni studi hanno dimostrato che durante la placentazione normale, il citotrofoblasto si differenziano da un fenotipo epiteliale a uno endoteliale. Questo processo di differenziazione è conosciuto come "pseudo-

vasculogenesi" o "mimetismo vascolare" e non si verifica nella pre-eclampsia (Zhou Y et al. 1997, Zhou Y et al. 1997). Il citotrofoblasto che non invade le arteriole spirali materne non esprime i fattori di adesione endoteliale, la VE-caderina e l'integrina $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha V\beta 3$. Queste anomalie nella differenziazione del citotrofoblasto nelle placente delle donne affette da pre-eclampsia ci suggeriscono che i meccanismi che contribuiscono alla pre-eclampsia avvengono nelle prime fasi della gravidanza. La bassa tensione di ossigeno ha innescato la proliferazione del citotrofoblasto attraverso meccanismi che coinvolgono il fattore di trascrizione hypoxia-inducible factor 1 α (E1IF1 α) (Caniggia I et al 2000). L'espressione di Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1 α) nelle placente è aumentata nel primo trimestre e diminuisce intorno alla nona settimana, quando aumenta la circolazione del feto (Caniggia I et al 2000). Livelli elevati di HIF1 α possono indicare uno stress placentare e quindi preannunciare lo sviluppo della patologia (Rajakumar A et al. 2003). Si verificano condizioni di ipossia e ischemia, dovute all'impianto poco profondo e alla mancata trasformazione delle arterie materne, che innescano la riossigenazione e lo stress infiammatorio, le vie apoptotiche e le attività deregolate del proteasoma all'interno del trofoblasto (Allaire et al., 2000; Leung et al., 2001; Ishihara et al., 2002; Tal, 2012). Tutti questi eventi inducono la placenta a produrre fattori circolanti e vescicole apoptotiche, che culminano

nelle manifestazioni cliniche della pre-eclampsia (Stillman e Karumanchi, 2007). Il SCT racchiude aggregati di nuclei definiti noduli sinciziali. E nelle gravidanze pre-eclamptiche è stato riscontrato un numero maggiore di noduli (Ishihara et al. 2002).

1.4 Implicazioni dello stress ossidativo nella placenta

Nella pre-eclampsia, l'evidenza dello stress ossidativo può essere riscontrata sia nella circolazione materna che nella placenta. Esistono prove sostanziali che i difetti precoci della placentazione determinano un flusso sanguigno materno perturbato verso la placenta con il progredire della gravidanza, portando a ulteriori danni alla placenta e allo stress ossidativo (Redman et al. 2015, 2000). È noto che l'interruzione dell'apporto di sangue, e quindi di ossigeno, a un'ampia gamma di tessuti provoca danni al sistema mitocondriale di trasferimento degli elettroni, con conseguente aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Mailloux et al. 2015). I sistemi antiossidanti (ad es. superossido dismutasi, catalasi, glutatione perossidasi), così come i sistemi coordinati mitocondriali (ad es. biogenesi, fissione/fusione della rete mitocondriale) e cellulari (ad es., autofagia, apoptosi) costituiscono la risposta cellulare ai ROS e al danno indotto dai ROS (Redman et al 2015). Una

perossidazione lipidica deregolata può causare disfunzioni e danni cellulari. Molti cambiamenti endoteliali di potenziale rilevanza per la pre-eclampsia possono essere indotti dalla perossidazione lipidica. La pre-eclampsia è associata a una lesione patologica delle arteriole decidue. Questa arteriopatia appare in regioni delle arterie spirali e miometriali in cui sono assenti i cambiamenti fisiologici di trasformazione. La morfologia di questi vasi suggerisce similitudini con il processo aterogenico delle arterie carotidi, in cui la perossidazione lipidica delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e comparsa di cellule schiumose ha un ruolo fondamentale (Costa Ferreira et al 2020).

1.5 Implicazioni del ECS nella pre-eclampsia

I componenti del sistema endocannabinoide sono coinvolti nei vari processi di sviluppo, migrazione ed apoptosi del citotrofoblasto. Nel citotrofoblasto umano isolato da placenti a termine, l' Anandamide ha indotto la perdita di vitalità cellulare per apoptosi e il TRPV1 può modulare la segnalazione e l'omeostasi del calcio nel citotrofoblasto, contribuendo così all'apoptosi indotta dal TRPV1 (Costa 2016). E' stato dimostrato che il 2-AG ostacola la sincizializzazione in vitro di TC umane isolate a termine, attraverso un meccanismo dipendente dall'ECS (Costa et al. 2015). Infatti, il 2-AG ha ridotto il numero di nuclei nella

ST e ha diminuito la trascrizione dei geni che codificano per la proteina fusogena sincitina-2 e per il fattore di trascrizione specifico per corion 1 (GCM-1), che regola la trascrizione della sincitina (Costa et al. 2016). Queste alterazioni sono state innescate dall'attivazione di CB1 e riflettono una compromissione della differenziazione morfologica della CT indotta dal 2-AG (Costa et al. 2015). Inoltre è dimostrato un cross-talk tra gli endocannabinoidi e i loro analoghi lipidici e vari processi dipendenti dallo stress ossidativo. L'attivazione di CB1 determina uno squilibrio redox. Nel complesso, i meccanismi con cui i recettori CB2, in seguito all'attivazione mediata dalle EC, sono coinvolti nella riduzione del danno ossidativo sembrano essere principalmente mediati dalla riduzione di NOX2 e NOX4 e dalla contemporanea induzione della difesa antiossidante attraverso l'aumento degli enzimi scavenging SOD1 e catalasi (Mukhopadhyay et al. 2010, 2016).

1.6 Ipotesi del lavoro

Le alterazioni molecolari legate allo stress ossidativo e del sistema endocannabinoide descritte in condizioni di pre-eclampsia potrebbero avere un impatto sulla composizione macromolecolare, istologica e sulla trascrizione genica delle placente affette da pre-eclampsia.

1.7 Scopo del lavoro

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di studiare nella placenta pre-eclamptica in fase terminale, il legame tra lo stress ossidativo, le alterazioni e la distribuzione del sistema endocannabinoide e la composizione macromolecolare oltre a possibili alterazioni a livello trascrizionale. A questo scopo si è resa necessaria la valutazione dei livelli proteici della SOD1, della catalasi, di CB1 e di TRPV1, di questi ultimi due abbiamo valutato anche la localizzazione nei villi per poter avere un quadro più completo e dettagliato della loro distribuzione oltre alla loro quantificazione.

Capitolo secondo

MATERIALI E METODI

2.1 Campioni

I campioni di placenta, utilizzati per la realizzazione di questo lavoro di tesi, sono stati forniti dal reparto di ostetricia e ginecologica dell'ospedale pediatrico Salesi di Ancona. Le pazienti donatrici hanno firmato un modulo di consenso alla sperimentazione. Sono stati prelevati e conservati due diversi gruppi di placentate da donne con gravidanza a termine: Controllo (CTRL) e Pre-eclampsia (PRE). Per ciascuno dei due gruppi è stata prelevata una porzione per l'analisi molecolare conservata in RNA protect (QIAGEN, Germania), una porzione dedicata alle analisi istologiche e di immunohistochimica conservata in soluzione di formalina (BioOptica, Milano, Italia) ed una porzione congelata a -80°C per la colorazione con Oil O Red, l'analisi con FTIR e il Western Blot.

2.2 Analisi istologica

Per effettuare l'analisi istologica sono stati utilizzati 5 campioni di placenta per ciascun gruppo sperimentale (CTRL e PRE). Dopodiché le porzioni sono state conservate in etanolo al 70% fino all'esecuzione dell'inclusione in paraffina. La tecnica di inclusione in paraffina prevedeva una disidratazione in etanolo in

serie a concentrazioni crescenti (80% per 1 ora, 95% per 1 ora, 100% per 1 ora). A seguire i campioni sono stati trattati con Xilene (BioOptica, Milano) per 45 minuti, immersi in paraffina bianca liquida per tre ore a 60°C, poi nella paraffina blu ed infine inclusi in blocchetti per l'istologia. Il passo successivo per l'esecuzione dell'analisi istologica è stato quello di tagliarli con l'utilizzo di un microtomo (Leica, RM2125RTS, GmbH, Wetzlar, Germany) per ottenere quattro sezioni diverse di ciascun campione aventi uno spessore di 4 µm. Le sezioni sono state disposte su un vetrino porta oggetti e fatte asciugare a temperatura ambiente e poi colorate con ematossilina-eosina di Mayer (H&E). Il protocollo per la colorazione eseguito prevedeva prima una rimozione della paraffina per immersione nello xilene per 20 minuti, poi una reidratazione dei campioni mediante l'utilizzo di etanolo in concentrazioni decrescenti di etanolo (100%, 95%,80%,70%) per 5 minuti ed un lavaggio finale in acqua corrente per 5 minuti. Le sezioni sono state colorate prima con ematossilina (BioOptica, Milano) per 2,5 minuti, lavate in acqua e poi colorate con eosina (BioOptica, Milano) per 20 secondi. Ed infine è stata fatta anche la colorazione Masson Tricromica (BioOptica, Milano), la quale viene utilizzata per la colorazione del collagene e vengono usati tre coloranti diversi: l'ematossilina che conferisce ai nuclei una tonalità quasi nerastra, la fucsina (acida, basofila) che colora il citoplasma in rosso più o meno vivo, il blu di anilina (basica, acidofila) che

dona alle fibre collagene ed al muco una colorazione azzurra. A seguire è stata eseguita una disidratazione con passaggi in EtOH a concentrazioni crescente, ed infine immerse in Xilene per 10 minuti e poi è stato montato un vetrino copri-oggetti grazie ad una resina chiamata Safemount® (BioOptica, Milano). Per la colorazione dei lipidi, non è stato possibile utilizzare campioni fissati ed inclusi in paraffina in quanto lo Xilene solubilizza i lipidi che quindi non sono più visualizzabili dopo inclusione in paraffina. I campioni di placenta congelati a -80°C sono stati quindi sezionati e la porzione di interesse è stata inclusa in Killik (BioOptica, Milano) e congelata a -26°C all'interno di un criostato (MC4000, Histo-Line) che è stato utilizzato poi per ottenere sezioni dello spessore di 8 µm poi poste su vetrini gelatinizzati per massimizzare l'adesione delle sezioni. Le sezioni sono state fatte asciugare a temperatura ambiente e poi post-fissate utilizzando paraformaldeide (PFA) 4% per 15 minuti all'interno di una camera umida. In seguito, è stato effettuato un lavaggio in acqua corrente per 10 minuti, seguito da immersione in isopropanolo 60% per 5 minuti. 0.5 gr del colorante Oil Red O è stato disciolto in 100 mL di isopropanolo 100% formando una soluzione madre di cui 30 mL sono stati diluiti con 20 mL di acqua deionizzata per ottenere una soluzione di Oil Red O al 60% di isopropanolo. Questa soluzione è stata poi filtrata tramite un filtro con maglie di 0.4 µm ed utilizzata per colorare le sezioni per 15 minuti. Un breve lavaggio

in 60% isopropanolo è stato effettuato dopo la colorazione e seguito da una lieve colorazione dei nuclei con Ematosilina per 5 minuti in camera umida. Dopo un breve lavaggio in acqua deionizzata i vetrini sono stati montati con una soluzione di glicerolo al 90% e conservati a 4°C fino al momento dell'osservazione al microscopio. I campioni processati tramite queste colorazioni sono stati osservati al microscopio ottico Zeiss Axio Imager A.2 (Zeiss, Oberkochen, Germany) e le immagini sono state acquisite mediante fotocamera a colori Axiocam 503. L'analisi dei dati è stata realizzata con il programma Fiji ImageJ (Image J, NIH, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>), usando tre immagini per ciascun campione di ogni gruppo.

2.3 FTIR Imaging

L'analisi FTIR Imaging (Fourier Transform InfrRed Imaging) è stata eseguita su campioni di placenta dei due gruppi sperimentali (CTRL e PRE) conservati a -80 °C. Si è utilizzato un interferometro Bruker INVENIO R accoppiato con un microscopio Hyperion 3000 Vis e equipaggiato con un Focal Plane Array detector (FPA) per analisi IR Imaging, strumentazione disponibile presso il Laboratorio di Spettroscopia Vibrazionale del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente - Università Politecnica delle Marche.

Da ogni campione sono state tagliate 3/4 sezioni dallo spessore di 4 μm alla distanza di 100 μm l'una dall'altra, tramite il criostato MC4000 Histo-Line; le sezioni sono state quindi depositate su supporti ottici di fluoruro di calcio CaF_2 e lasciate ad asciugare per 30 minuti a temperatura ambiente.

Prima di tutto, è stata acquisita la microfotografia completa di ogni sezione; ciò ha permesso di individuare le zone di interesse in corrispondenza dei villi corionici, su cui eseguire l'analisi IR Imaging. Le mappe IR sono state acquisite in trasmissione nell'intervallo spettrale $4000\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (medio Infrarosso, MIR) con un obiettivo 15X e una risoluzione spettrale di 4 cm^{-1} (software OPUS 7.5 Bruker Optics, Ettlingen, Germany). Ogni mappa ha le dimensioni di $164 \times 164\ \mu\text{m}$ e è costituita da 4096 pixel/spettri, le cui dimensioni sono $2,56 \times 2,56\ \mu\text{m}$ (risoluzione spaziale). Prima di ogni mappa IR è stato acquisito lo spettro del background su una porzione pulita del supporto di CaF_2 . Le mappe IR sono state processate come segue: eliminazione dei segnali IR della CO_2 e dell'acqua presenti nell'aria tramite la routine Atmospheric Compensation, e normalizzazione vettoriale per eliminare artefatti negli spettri dovuti a piccole differenze nello spessore delle sezioni, tramite la routine Vector Normalization (OPUS 7.5 Bruker Optics). Quindi, da ogni mappa IR sono state generate delle immagini a falsi colori rappresentanti la distribuzione topografica dei lipidi e delle proteine, tramite integrazione nei seguenti intervalli spettrali: $3050\text{-}2800$

cm^{-1} (regione rappresentativa delle vibrazioni dei lipidi, LIPIDS) e 1780-1480 cm^{-1} (regione rappresentativa delle vibrazioni delle proteine, PROTEINS).

Inoltre, per valutare la composizione macromolecolare dei villi corionici, su ogni mappa ogni stati selezionati e estratti ca. 200 spettri, che sono stati quindi mediati per ottenere lo spettro medio rappresentativo di ogni campione. Gli spettri medi così ottenuti sono stati sottoposti a procedura di Peak Fitting nelle seguenti regioni di interesse: 3050-2800 cm^{-1} (regione rappresentativa delle vibrazioni dei gruppi CH_2 , CH_3 e $=\text{CH}$ delle catene alchiliche dei lipidi); 1780-1480 cm^{-1} (bande Ammide I e II delle proteine, regione rappresentativa delle vibrazioni del legame peptidico); 1350-900 cm^{-1} (banda Ammide III delle proteine, regione rappresentativa del collagene, fosfati e carboidrati). L'area e la posizione delle bande componenti sono state calcolate e utilizzate per ottenere specifici rapporti di area delle bande.

2.4 Estrazione di RNA totale

L'estrazione dell'RNA totale è stata fatta utilizzando l'RNazol (Sigma, Milano, Italia) ed un omogenizzatore 21 (Janke&Kunkel) secondo le istruzioni del produttore. L'integrità dell'RNA è stata valutata mediante una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%. Ed infine è stata misurata la

concentrazione finale e la qualità tramite i rapporti A260/A230 e A260/A280 utilizzando con lo spettrofotometro Nanodrop P330 (Implem GmbH, Monaco, Germania). L'RNA estratto è stato conservato a -80°C.

2.4.1 Digestione con DNasi e preparazione di cDNA

Per eliminare le eventuali contaminazioni da parte di DNA genomico è stata fatta una digestione con DNasi (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) secondo le istruzioni del produttore. La retrotrascrizione del cDNA è stata eseguita da 1 µg di RNA totale usando il kit iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Milano, Italia).

2.4.2 Real-time qPCR

Le analisi in PCR Real time sono state eseguite con il metodo del SYBR Green Master Mix in un termociclatore CFX Connect Real-Time PCR Detection SystemiQ5 (BioRad) utilizzando il software Bio-Rad CFX Manager 3.1. I primers sono stati utilizzati ad una concentrazione finale di 10 µM. Per ogni campione è stato preparato il mix di reazione con 1 µl di cDNA (diluito 1/10), 5 µl di 2X SYBR Green PCR Master Mix (BioRad), 0,1 µM di primer forward 10 pmol/mL, 0,1 µM di primer reverse 10 pmol/mL, 3,8 µl di acqua milli-Q.

SEQUENZE PRIMERS

BGN FOR	CAGCCCGCCAAGTACTAGTCA
BGN REW	GGCCAGCAGAGACACGAG
DCN FOR	CAGCCCGCCAAGTACTAGTCA
DCN REW	CGTTCCAAGTTCACCAAAGG

SEQUENZE PRIMERS HK

RPLP0 FOR	CTGGAAAACAACCCAGCTCT
RPLP0 REW	GAGGTCCTCCTTGGTGAACA
RPS18 FOR	TGCGAGTACTACTCAACACCAACA
RPS18 REW	GCATATCTTCGGCCACA

2.5 Western Blot

Per valutare l'espressione del CB1, TRPV-1, catalasi e SOD-1 sono state estratte prima le proteine dai vari campioni (12 per trattamento), questo procedimento prevede il prelievo di una parte del campione dopodiché si pesa il campione su cui estrarre le proteine e si calcola la quantità di buffer Hanna da aggiungere, che deve essere cinque volte maggiore rispetto al peso del campione. La soluzione con cui è trattato il campione contiene 0.125 M di Tris, 4% (p/v) SDS, 20% (v/v) glicerolo, 10% (v/v) β -mercaptoetanolo e l'antiproteolitico con una diluizione 1:10. A questo punto i campioni sono stati omogenati e portati ad ebollizione per 5 minuti, centrifugati a 12000 \times g per 15 minuti ad una temperatura di 4 °C, il soprannatante è stato spostato in un'altra provetta. Terminata questa fase di estrazione si è passato a quantificare ad un'assorbanza di 595 nm con il Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit

(Invitrogen). Ciascun campione proteico (25 μ g) è stato separato utilizzando un gel di poliacrilamide al 4% e al 10%. Lo stacking è stato fatto prima a 30 mA per 30 minuti per fare migrare tutti i campioni insieme, poi la corsa a 60mA fin quando le proteine di interesse sono separate in base al loro peso molecolare. Il trasferimento è stato fatto su una membrana di nitrocellulosa a 250 mA per due ore utilizzando una soluzione di 25mM Tris, 192 mM glicina e 20% (v/v) etanolo e un mini trans-blot Bio-Rad. Dopodiché è stata fatta una colorazione con il Rosso Ponceau (per evidenziare le proteine trasferite) ed una decolorazione con TBS Novidet al 5% v/v in agitazione per 30 minuti. A questo passaggio è seguita la fase di bloccaggio in una soluzione contenente TBS, albumina di siero bovino (BSA; Sigma) al 5% p/v e 0,1% v/v di Tween-20 e lasciati per 1 ora a temperatura ambiente. Le varie membrane sono state incubate con i diversi anticorpi primari in base alla proteina di interesse, quindi anti- β actina (#4967, Cell Signalling TECHNOLOGY®), anti-CB1 (ab259323, Abcam), anti-TRPV1 (ab3487, Abcam) fatti in coniglio in diluizione 1:1000 in soluzione di bloccaggio ed incubati per una notte a 4°C in agitazione. Mentre per lo studio dello stress ossidativo è stato usato il kit Oxidative Stress Defense (ab179843, Abcam). Dopo l'incubazione overnight sono stati fatti tre lavaggi da 10 minuti ciascuno con una soluzione contenente TBS e 0,2% (v/v) di Tween-20. A questo punto le membrane sono state incubate per un'ora a 30 °C con

l'anticorpo secondario, anti-coniglio coniugato con la HRP (perossidasi di rafano) in diluizione 1:2500 in soluzione di bloccaggio. Sono stati fatti altri tre lavaggi identici a quelli descritti dopo l'incubazione con l'anticorpo primario. La reazione è stata visualizzata dopo l'incubazione ECL-PLUS (GE Healthcare, Milano, Italia), reagente chemiluminescente, utilizzando il Image Lab Software (Bio-Rad). L'analisi densitometrica è stata eseguita con il software Fiji Image J.

2.6 Immunoistochimica

Per lo studio immunoistochimico sono stati utilizzati 5 campioni di placenta per ciascun gruppo sperimentale. Dopodiché le porzioni sono state conservate in etanolo al 70% fino all'esecuzione dell'inclusione in paraffina come già descritto per le analisi istologiche. I vetrini sono stati trattati con una soluzione di antigen retrieval (10 mM citrato di sodio e 0,05% (v/v) Tween-20, a pH 6) per 20 minuti a 100°C. Dopo 5 min di lavaggio in acqua deionizzata, è stata aggiunta una soluzione di permeabilizzazione contenente 1% (v/v) Triton X-100 in PBS per 20 minuti. Sono stati fatti tre lavaggi con PBS per due minuti ciascuno. Poi il bloccaggio è stato effettuato con una soluzione al 3% (p/v) di BSA e 0,1% (v/v) di Tween-20 per un'ora ed i vetrini sono stati incubati overnight con gli anticorpi primari a 4°C (anti-CB1 e anti-TRPV-1, stesse referenze

che quelle descritte per il WB). In seguito sono stati fatti i tre lavaggi uguali a quelli descritti in precedenza, si è passati all'incubazione con l'anticorpo secondario Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150077, Abcam) a 37°C per un'ora. Sono stati ripetuti i lavaggi ed è stato montato un vetrino copri-oggetti grazie ad una soluzione di montaggio con il fluorocromo che colora i nuclei (Mounting Medium With DAPI - Aqueous, Fluoroshield (ab104139, Abcam)) . I vetrini sono stati visti al microscopio confocale Nikon A1R. L'analisi dei dati è stata realizzata con il programma Fiji ImageJ (Image J, NIH, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) selezionando l'area del villo con il canale blue, e all'interno del villo abbiamo misurato l'intensità verde (relativa alla fluorescenza di CB1 e TRPV1).

2.7 Analisi statistica

I risultati di tutte le analisi sono stati elaborati con il programma Graph Pad Prism V8.0.1. (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). La valutazione della distribuzione dei dati è stata fatta con il test di normalità Shapiro Wilk. Per analizzare le differenze tra gruppo controllo e pre-eclampsia dei campioni che seguono una distribuzione normale, è stato utilizzato il test t-student; invece i campioni che non seguono una distribuzione normale sono stati analizzati con il non-parametric test U-Mann Whitney, considerando come

significativo un valore di $p < 0,05$. Le lettere e gli asterischi (*) indicano cambiamenti statisticamente significativi tra i due gruppi. I valori di p sono indicati con i seguenti simboli: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

Capitolo terzo

RISULTATI

3.1 Caratterizzazione istologica

Dopo aver effettuato la colorazione Ematossilina ed Eosina delle sezioni istologiche per effettuare una caratterizzazione dell'organo in entrambi i gruppi sperimentali, sono state eseguite una colorazione con Oil Red O ed una colorazione Masson Tricomica per quantificare la presenza di lipidi e quella di collagene nelle sezioni di placenta PRE rispetto a quelle di CTRL. Dall'analisi statistica della colorazione con Oil Red O non emergono differenze significative nella concentrazione lipidica tra CTRL e PRE (Fig.4 A, B, C). Per quanto riguarda il collagene, grazie alla colorazione Tricomica di Masson, nei villi coriali è possibile notare un aumento nel gruppo PRE rispetto a CTRL (Fig. 1 D, E, F).

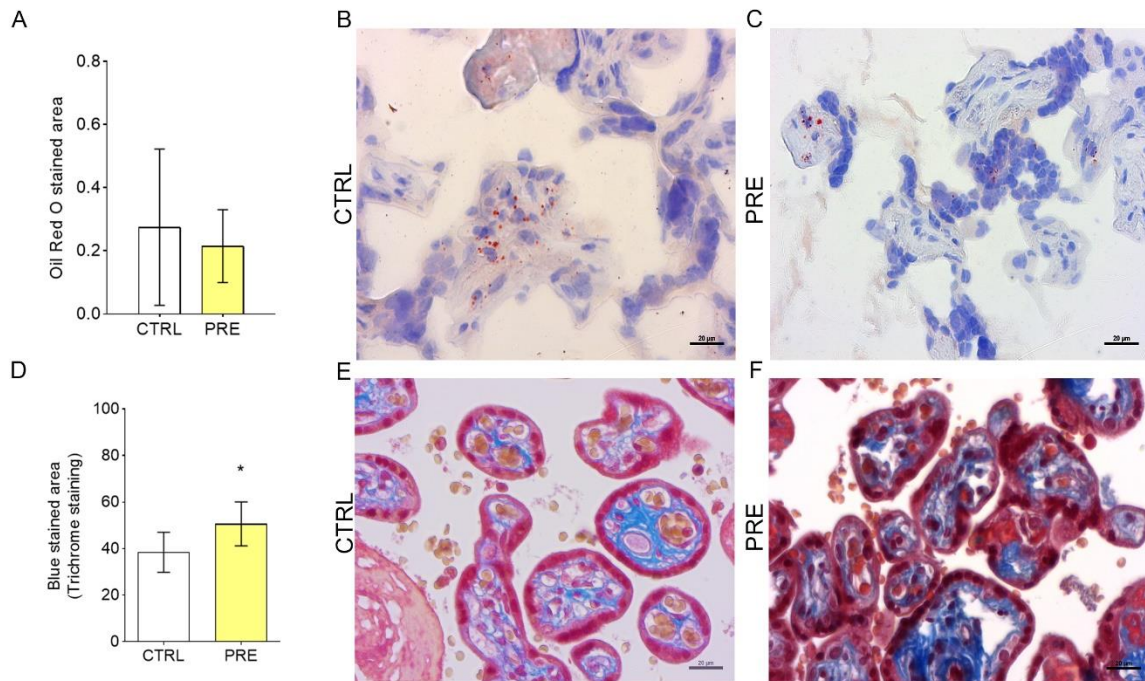


Figura 4. Analisi istologica. A: l'istogramma rappresenta la percentuale di lipidi presenti in 5 campioni del gruppo del CTRL e 5 campioni del gruppo PRE. D: l'istogramma rappresenta la percentuale di lipidi nei villi corionici dei campioni del gruppo del CTRL e 5 campioni del gruppo PRE. I risultati sono espressi come media \pm SD e gli asterischi indicano differenze significative rispetto al gruppo di controllo (* $p < 0,05$).

3.2 Analisi FTIR

Nel panel della Figura 5 sono riportate le immagini a falsi colori che mostrano la distribuzione topografica dei lipidi e delle proteine all'interno dell'area mappata nelle sezioni dei due gruppi sperimentali, CTRL e PRE.

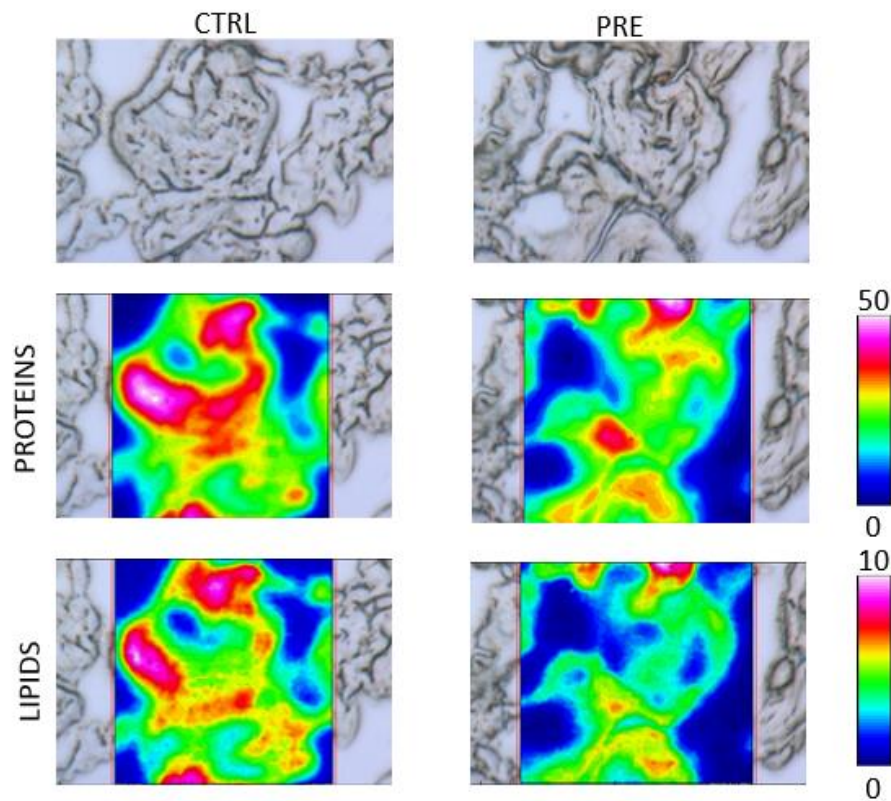


Figura 5. Immagini di microfotografie di sezioni rappresentative di villi corionici dei gruppi sperimentali CTRL e PRE e immagini a falsi colori rappresentanti la distribuzione topografica delle proteine (PROTEINS) e dei lipidi (LIPIDS) totali nei due gruppi sperimentali CTRL e PRE. È stata usata una scala arbitraria di colori, in cui il bianco/rosa chiaro indicano le zone con valori più alti di assorbanza, mentre il blu/nero quelle con valori più bassi.

Come atteso, le mappe chimiche riflettono la non omogeneità del tessuto analizzato e una maggiore presenza di proteine totali sui villi.

3.3 Analisi vibrazionale della composizione macromolecolare

Per individuare modificazioni nella composizione dei villi corionici, sono stati valutati specifici parametri spettrali relativi alle diverse componenti macromolecolari. Per quanto riguarda la componente lipidica, sono stati presi in considerazione i seguenti rapporti di area delle bande: CH₂/CH₃ (grado di saturazione e lunghezza delle catene alchiliche); CH/CH₃ (grado di insaturazione delle catene alchiliche) e 1740/AI (grado di perossidazione dei lipidi) (Fig. 6). Nei villi coriali del gruppo PRE rispetto a quelli del controllo CTRL, si osserva un maggiore grado di perossidazione lipidica (1740/AI; P < 0.05) accompagnato da una maggiore insaturazione, anche se non statisticamente significativa (CH/CH₃; P > 0.5). Non si osservano variazioni nella lunghezza e saturazione delle catene alchiliche (CH₂/CH₃; P > 0.05).

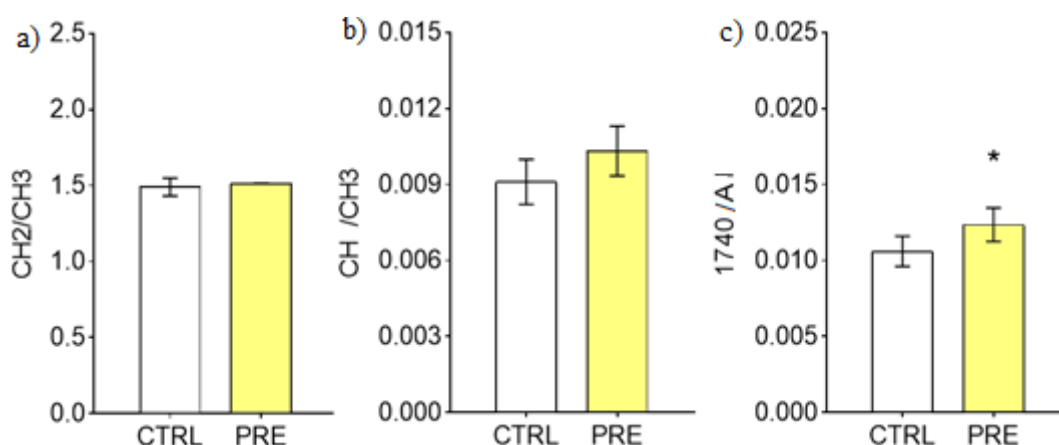


Figura 6. Analisi vibrazionale della composizione macromolecolare dei villi corionici dei gruppi sperimentali CTRL e PRE: a) CH₂/CH₃, lunghezza e grado di saturazione delle

catene alchiliche; b) CH/CH₃, grado di insaturazione delle catene alchiliche; c) 1740/AI, grado di perossidazione lipidica. I risultati sono espressi come media ± SD e gli asterischi indicano differenze significative rispetto al gruppo di controllo (*=p < 0,05; Student's t-test).

Per quanto riguarda la componente proteica, sono stati analizzati il contenuto relativo e le caratteristiche strutturali del collagene. In particolare, sono stati presi in considerazione i seguenti rapporti di area delle bande relative al collagene: la prolina, calcolata come rapporto tra l'area della banda a 1340 cm⁻¹ della prolina e la somma delle aree di tutte le bande dell'intervallo 1350-900 cm⁻¹, α CHAIN, calcolato come rapporto tra l'area della banda a 1320 cm⁻¹ relativa alla alfa elica e la somma delle aree di tutte le bande dell'intervallo 1350-900 cm⁻¹, e TRIPLE HELIX, calcolato come rapporto tra l'area della banda a 1284 cm⁻¹ relativa alla tripla elica e la somma delle aree di tutte le bande dell'intervallo 1350-900 cm⁻¹ (Fig.7). Nei villi coriali del gruppo PRE rispetto a quelli del gruppo CTRL, si osservano differenze nella quantità di collagene, come evidenziato dai rapporti della prolina, anche se non statisticamente significativo, e TRIPLE HELIX (P<0.05); inoltre, l'aumento significativo nel gruppo PRE del rapporto di banda α CHAIN suggerisce un aumento della sintesi delle catene di collagene.

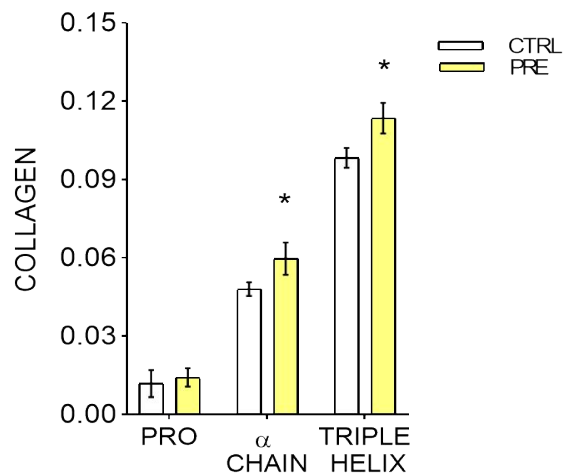


Figura 7. Analisi vibrazionale del collagene dei villi corionici dei gruppi sperimentali CTRL e PRE:PRO, rappresentativo del contenuto di prolina, α CHAIN, rappresentativo del contenuto di catene α del collagene, e TRIPLE HELIX, rappresentativo del contenuto di triple eliche del collagene. I risultati sono espressi come media \pm SD e gli asterischi indicano differenze significative rispetto al gruppo di controllo (*= $p < 0,05$; Student's t-test).

Infine, per l'analisi del contenuto di composti fosforilati e glicosilati, sono stati presi in considerazione i seguenti rapporti di area delle bande: COP, calcolato come rapporto tra l'area della banda a 1170 cm^{-1} relativa ai composti fosforilati e la somma delle aree di tutte le bande dell'intervallo $1350-900 \text{ cm}^{-1}$ e COH, calcolato come rapporto tra l'area della banda a 1161 cm^{-1} relativa ai composti

glicosilati e la somma delle aree di tutte le bande dell'intervallo 1350-900 cm^{-1} (Fig.8). Nel gruppo sperimentale PRE si evidenzia un valore significativamente più alto del rapporto di banda COP, relativo ai composti fosforilati, marker associato a proliferazione cellulare. Al contrario, non si evidenzia nessuna differenza significativa relativa al marker COH dei composti glicosilati.

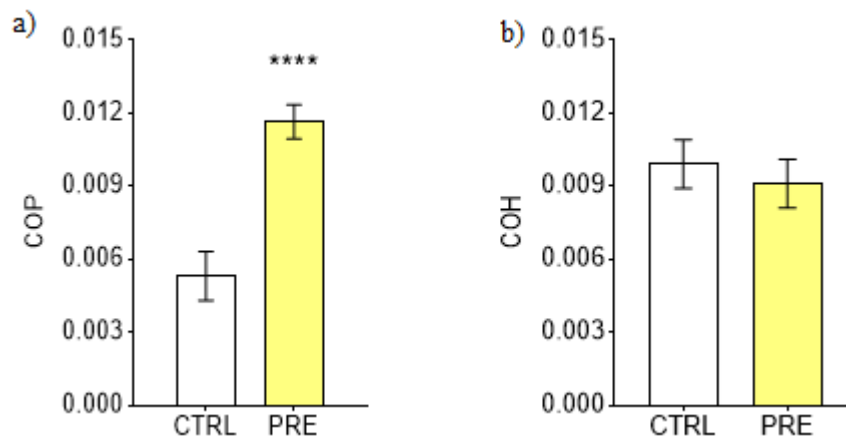


Figura 8. Analisi vibrazionale dei composti fosforilati e glicosilati dei villi corionici dei gruppi sperimentali CTRL e PRE: COP, rappresentativo dei composti fosforilati e COH, rappresentativo dei composti glicosilati. I risultati sono espressi come media \pm SD e gli asterischi indicano differenze significative rispetto al gruppo di controllo (****= $p < 0,0001$; Student's t-test).

3.4 Analisi dell'espressione genica mediante RT-qPCR

L'analisi dei trascritti è stata effettuata tramite RT-qPCR per studiare cambiamenti a livello dell'espressione di geni che codificano per le componenti della matrice cellulare: biglicano (*BGN*) e decorina (*DCN*). Dall'analisi emerge una diminuzione significativa dell'espressione dei due geni analizzati, *BGN* e *DCN*, nelle placente del gruppo PRE rispetto al gruppo CTRL (Fig. 9).

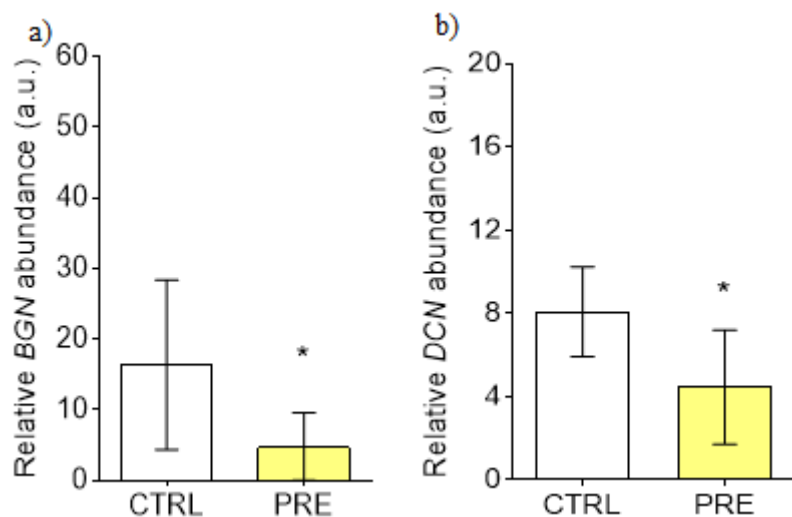


Figura 9. Analisi dell'espressione genica di *BGN* (a) e del gene *DCN* (b) nei gruppi CTRL e PRE eseguita su 12 campioni. Gli istogrammi mostrano l'abbondanza relativa dell'espressione genica determinata tramite t-test considerando $P < 0.05$ come soglia per i cambiamenti significativi. * indica cambiamenti statisticamente significativi tra i due gruppi. I risultati sono espressi come media \pm SD e gli asterischi indicano differenze significative rispetto al gruppo di controllo (* $p < 0,05$);).

3.5 Quantificazione delle proteine mediante WB

La quantificazione dei livelli delle proteine relative al sistema endocannabinoide (CB1 e TRPV1), e quelle coinvolte nello stress ossidativo (catalase e SOD-1), è stata condotta mediante Western Blot. Dall'analisi statistica non emergono differenze significative tra i due gruppi sperimentali (Fig.10).

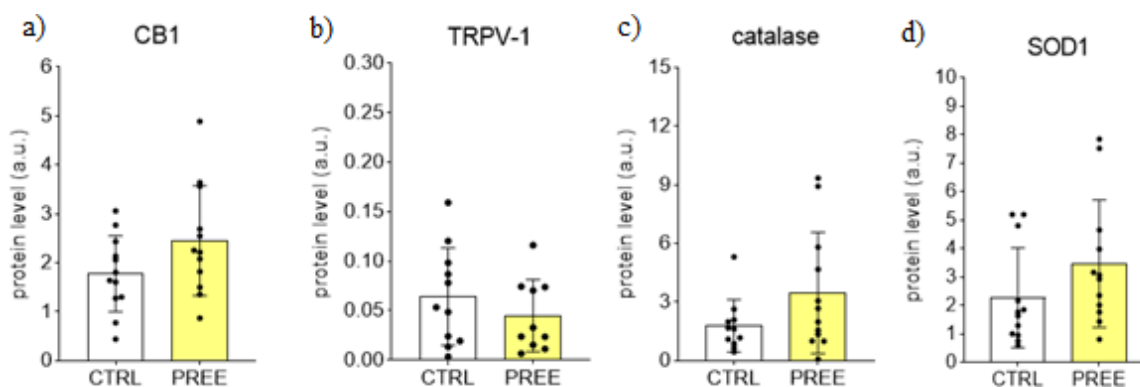


Figura 10. Analisi della concentrazione delle proteine nei campioni dei gruppi sperimentali ottenuti su 12 campioni. a) CB1; b)TRPV-1; c) catalasi; d) SOD1; I risultati sono espressi come media \pm SD.

3.6 Quantificazione dell'espressione dei recettori dell'ECS nei villi mediante analisi immunostochimica

Grazie alla tecnica dell'immunostochimica è stato possibile studiare e quantificare la presenza dei recettori CB1 e TRPV1 del sistema

endocannabinoide in maniera più specifica sulle membrane dei villi dei campioni dei due gruppi sperimentali, CTRL e PRE. Le Figure 11 e 12 mostrano le fotografie a microscopia confocale delle sezioni dei due gruppi sperimentali. Dalla quantificazione delle fotografie con il programma Fiji Image J e dalla successiva analisi statistica è emerso un aumento statisticamente significativo del recettore CB1 nel gruppo sperimentale PRE rispetto al gruppo CTRL.

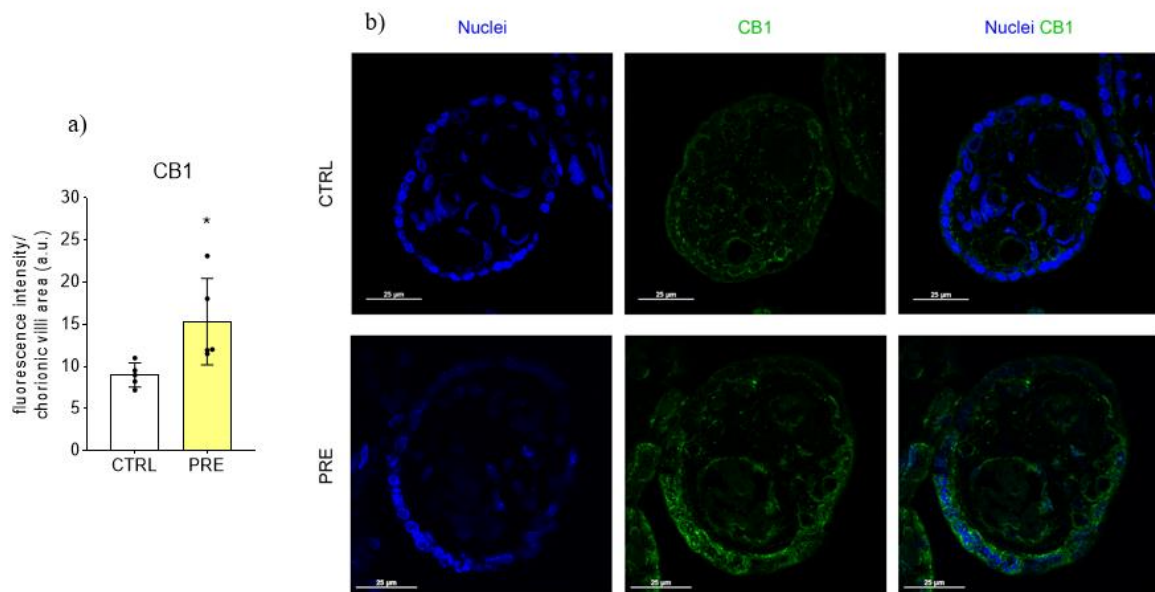


Figura 11. Quantificazione dei livelli di CB1 su 12 campioni. a) quantificazione di CB1; * indica cambiamenti statisticamente significativi tra i due gruppi. I risultati sono espressi come media \pm SD e gli asterischi indicano differenze significative rispetto al gruppo di controllo (* $p < 0,05$). b) Fotografie delle sezioni di placenta dei gruppi PRE e CTRL per la quantificazione del CB1.

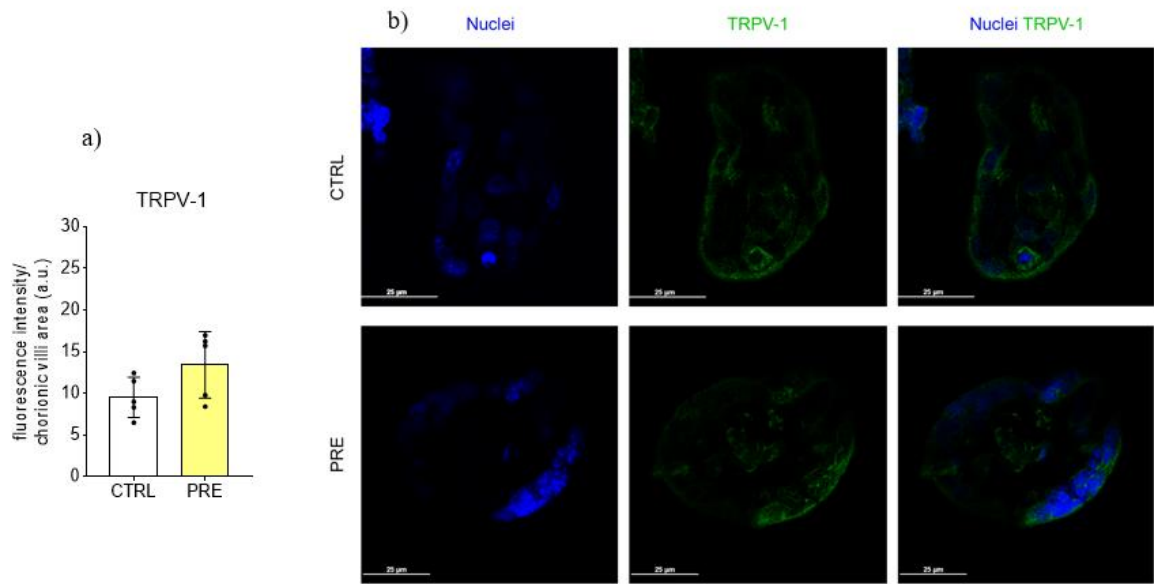


Figura 12. Quantificazione dei livelli di TRPV1 su 12 campioni. a) quantificazione di TRPV1. b) Fotografie delle sezioni di placenta dei gruppi PRE e CTRL per la quantificazione del TRPV1. TRPV1 non mostra cambiamenti significativi tra il gruppo CTRL e PRE.

Capitolo quarto

DISCUSSIONE

Si ritiene che l'insorgenza della pre-eclampsia sia dovuta ad alterazioni morfo-funzionali durante le prime fasi di sviluppo della placenta (Jung Min Lee et al. 2012). E' un complesso disturbo multisistemico presente esclusivamente nella specie umana, contraddistinto da proteinuria ed ipertensione. Uno sviluppo anomalo della placenta porta all'ischemia placentare (Gupta et al. 2014). La lesione da ischemia della placenta fa sì che venga generato lo stress ossidativo placentare. Quest'ultimo può avere un ruolo nella patofisiologia della pre-eclampsia. Delle analisi FTIR è stato riscontrato un aumento statisticamente significativo della perossidazione lipidica e dei composti fosforilati nel gruppo sperimentale della patologia suggerendo un aumento dello stress ossidativo, in quanto marker dello stress ossidativo. Non abbiamo avuto cambiamenti rilevanti per i composti fosforilati. Mentre dalla quantificazione dell'enzima SOD1, che catalizza la trasformazione dell'eccesso di superossido (O_2^-), e la catalasi, che scinde l'acqua ossigenata in acqua e ossigeno, non si vedono cambiamenti statisticamente rilevanti rispetto al CTRL. Questi dati sono in linea con quanto già presente in bibliografia. Ricerche precedenti hanno dimostrato che le alterazioni istologiche della placenta in pre-eclampsia (PE) comprendono infiammazione cronica, lesioni vascolari, coagulazione dei villi

e fibrosi dei villi. Tra queste alterazioni la fibrosi è una caratteristica importante (Ducray et al 2011). La fibrosi è un processo patogeno che comporta la perdita progressiva della struttura e della funzione dell'organo. È causata dalla sovrapproduzione di matrice extracellulare (ECM) nei tessuti connettivi (Yinglin Feng et al. 2021). Il collagene è uno dei componenti principali della ECM (Rockey DC et al. 2015), quindi l'aumento del deposito e i cambiamenti nell'organizzazione della struttura di collagene è direttamente associato alla fibrosi (Zhang Y, Stefanovic B 2016). Il collagene fibroso è una proteina elicoidale altamente ordinata, a triplo filamento, in cui tre catene polipeptidiche di collagene, chiamate catene α , sono avvolte l'una intorno all'altra a formare una super-elica destrorsa simile a una corda. Le catene α sono costituite dalla sequenza ripetuta di aminoacidi Gly - X - Y, dove X e Y possono essere qualsiasi aminoacido, ma spesso sono rispettivamente prolina (Pro, 28%) e idrossiprolina (Hyp, 38%). Quindi, Gly - Pro -Hyp è la tripletta più comune (10,5%) nel collagene. Ogni catena α è stabilizzata dalla repulsione sterica dovuta ai residui Pro e Hyp, che distanziano le tre catene formando la caratteristica tripla elica del collagene (Stani et al. 2020). Secondo i risultati da noi ottenuti con la colorazione tricomatica di Masson, la deposizione del collagene tipo I nei villi è marcatamente aumentata nelle placente pre-eclamptiche. Dall'analisi FTIR è possibile notare che si ha un aumento

significativo della catena α . La decorina e il biglicano fanno parte della famiglia dei piccoli proteoglicani ricchi di leucina (SLRP) e sono contenuti sia della ECM che sulla superficie cellulare, il piccolo proteoglicano decorina è noto per interagire con le fibrille di collagene di tipo I, influenzando così la cinetica di formazione delle fibrille e la distanza tra fibrille di collagene adiacenti. È stato proposto che il proteoglicano biglicano, strutturalmente correlato, non si leghi ai collagene fibrillari. Tuttavia, quando le cellule di osteosarcoma sono state coltivate su fibrille di collagene di tipo I ricostituite, sia la decorina che il biglicano sono stati trattenuti dalla matrice (Schönherr et al. 1995). Gli SLRP regolano l'assemblaggio della matrice legandosi a diversi tipi di collagene e regolano la fibrillogenesi. Svolgono un ruolo nel controllo di eventi cellulari come l'adesione, la migrazione, la proliferazione e la disponibilità e la funzione dei fattori di crescita (Iozzo 1998). Dall'analisi dei trascritti di questi due geni che codificano per proteine che interagiscono con il collagene e competono con esso si nota una riduzione statisticamente significativa della loro espressione che potrebbe essere correlata alla placentazione anomala nei PRE. Il sistema endocannabinoide svolge un ruolo chiave nella riproduzione femminile, compresi l'impianto, la decidualizzazione e la placentazione. Dai dati presenti in bibliografia sappiamo che nelle placente con pre-eclampsia si ha un aumento dei livelli di CB1 (Fügedi et al. 2015), riscontrata anche nei nostri studi. Dal

Wester blotting non abbiamo osservato un aumento statisticamente significativo, mentre dall'immunoistochimica risulta un aumento dei livelli di CB1. Questa differenza è spiegata dal fatto che effettuando il Wester blotting abbiamo analizzato un campione contenete villi, tessuto connettivo e fibroso, mentre l'immunoistochimica ha un quadro più preciso, che permette di quantificare e localizzare CB1 sulle membrane dei villi. Per quanto riguarda i livelli di TRPV1, come evidenziato anche in altri lavori dello stato dell'arte (Martínez N. et al. 2016), è stato riscontrato un aumento non significativo. Gli studi presenti in bibliografia dimostrano il ruolo centrale dello stress ossidativo nello sviluppo di lesioni tissutali, che si traducono in diverse patologie come la pre-eclampsia. Le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto e le aldeidi reattive derivate dalla perossidazione lipidica, tra cui l'acroleina, la malondialdeide e il 4-idrossi-2-nonenale, sono i principali responsabili dei danni cellulari e tissutali che si verificano nei processi redox-dipendenti. Il legame tra il sistema endocannabinoide (ECS) e l'alterazione dell'omeostasi redox è fondamentale. È stato infatti osservato che l'attivazione di CB1 determina uno squilibrio redox. Nel complesso, i meccanismi con cui i recettori CB2, in seguito all'attivazione mediata dalle EC, sono coinvolti nella riduzione del danno ossidativo sembrano essere principalmente mediati dalla riduzione di NOX2 e NOX4 e dalla contemporanea induzione della difesa antiossidante attraverso

l'aumento degli enzimi scavenging SOD1 e catalasi (Mukhopadhyay et al. 2010, 2016). L'aumento dell'espressione di SOD1 e della catalasi nella pre-eclampsia è emerso anche dai nostri studi seppur non significativo, suggerendo la presenza di un aumento dello stress ossidativo. Alcune differenze sono date dal fatto che i nostri studi sono stati eseguiti su campioni di placenta a termine del terzo trimestre di gravidanza. L'inizio del travaglio comporta l'azione di una serie di fattori che permettono la transizione dalla quiescenza uterina alla contrattilità. Infatti, è necessaria un'interazione tra i diversi mediatori prodotti dalla placenta, dalla madre e dal feto per innescare l'inizio ed il proseguimento del travaglio. Negli ultimi anni, numerose ricerche hanno cercato di chiarire quali fattori fossero coinvolti nel meccanismo del parto. Molti studi hanno postulato il sistema endocannabinoide come un nuovo componente della complessa gamma di fattori che regolano l'inizio del travaglio. Inoltre dagli studi presentati in bibliografia è stato evidenziato che l'attivazione di CB1 comporta la differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti e la deposizione di collagene (Inês B Correia-Sá et al. 2021). L'aumento di collagene nei villi, osservato sia nelle analisi istologiche che nell'analisi FTIR potrebbe essere causato dall'aumento dei livelli di CB1 nei villi patologici.

Capitolo quinto

CONCLUSIONI

Questo studio evidenzia il ruolo importante del sistema endocannabinoide nei cambiamenti molecolari riscontrati nella placenta pre-eclamptica al termine della gravidanza. Poiché il CB1 promuove la differenziazione dei fibroblasti, l'aumento della deposizione di collagene potrebbe essere il risultato dei livelli più elevati di CB1 osservati nei villi delle pazienti affette da pre-eclampsia. Inoltre, le condizioni di pre-eclampsia hanno portato a una repressione di due geni che codificano proteine della matrice extracellulare, come la decorina e il biglicano. Per quanto riguarda lo stress ossidativo, sebbene non abbiamo riportato alcuna variazione nei livelli degli enzimi antiossidanti, la perossidazione lipidica è risultata aumentata nelle pazienti con pre-eclampsia. Questo risultato potrebbe essere dovuto anche al potenziamento dello squilibrio redox indotto dal CB1.

BIBLIOGRAFIA

Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine*, 6(237), 237ra65-237ra65.

Benirschke, K., & Driscoll, S. G. (1967). The pathology of the human placenta. In *Placenta* (pp. 97-571). Springer, Berlin, Heidelberg.

Benirschke, K., Burton, G. J., & Baergen, R. N. (2012). Early development of the human placenta. In *Pathology of the human placenta* (pp. 41-53). Springer, Berlin, Heidelberg.

Boss, A. L., Chamley, L. W., & James, J. L. (2018). Placental formation in early pregnancy: how is the centre of the placenta made?. *Human reproduction update*, 24(6), 750-760.

Boyd, J. D., & Hamilton, W. J. (1970). *The human placenta* (Vol. 212). Heffer.

Boyd, P. A. (1984). Quantitative structure of the normal human placenta from 10 weeks of gestation to term. *Early human development*, 9(4), 297-307.

Brocato, B., Zoerner, A. A., Janjetovic, Z., Skobowiat, C., Gupta, S., Moore II, B. M., ... & Schlabritz-Loutsevitch, N. (2013). Endocannabinoid crosstalk

between placenta and maternal fat in a baboon model (*Papio spp.*) of obesity. *Placenta*, 34(11), 983-989.

Brosens, I., & Renaer, M. (1972). On the pathogenesis of placental infarcts in pre-eclampsia. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 79(9), 794-799. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1972.tb12922.x>

Burton, G. J., & Fowden, A. L. (2015). The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1663), 20140066. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0066>

Burton, G. J., Jauniaux, E., & Charnock-Jones, D. S. (2009). The influence of the intrauterine environment on human placental development. *International Journal of Developmental Biology*, 54(2-3), 303-311.

Burton, G. J., Jauniaux, E., & Watson, A. L. (1999). Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *American journal of obstetrics and gynecology*, 181(3), 718-724.

Castellucci, M., Schepe, M., Scheffen, I., Celona, A., & Kaufmann, P. (1990). The development of the human placental villous tree. *Anatomy and embryology*, 181(2), 117-128.

Coan, P. M., Vaughan, O. R., Sekita, Y., Finn, S. L., Burton, G. J., Constancia, M., & Fowden, A. L. (2010). Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. *The Journal of physiology*, 588(3), 527-538. [https://doi: 10.1113/jphysiol.2009.181214](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.181214)

Correia-Sá, I. B., Carvalho, C. M., Serrão, P. V., Machado, V. A., Carvalho, S. O., Marques, M., & Vieira-Coelho, M. A. (2021). AM251, a cannabinoid receptor 1 antagonist, prevents human fibroblasts differentiation and collagen deposition induced by TGF- β –An in vitro study. *European Journal of Pharmacology*, 892, 173738.

Costa, M. A. (2016). The endocrine function of human placenta: an overview. *Reproductive biomedicine online*, 32(1), 14-43.

Costa, M. A., Fonseca, B. M., Teixeira, N. A., & Correia-da-Silva, G. (2015). The endocannabinoid anandamide induces apoptosis in cytotrophoblast cells: involvement of both mitochondrial and death receptor pathways. *Placenta*, 36(1), 69-76.

Coyle, C. W., Hulse, K. E., Wisner, K. L., Driscoll, K. E., & Clark, C. T. (2015). Placentophagy: therapeutic miracle or myth?. *Archives of women's mental health*, 18(5), 673-680.

Damsky, C. H., Fitzgerald, M. L., & Fisher, S. J. (1992). Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *The Journal of clinical investigation*, 89(1), 210-222.

Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C., & Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372(6507), 686-691.

English, F. A., Kenny, L. C., & McCarthy, F. P. (2015). Risk factors and effective management of preeclampsia. *Integrated blood pressure control*, 8, 7.

Feng, Y., Chen, X., Wang, H., Chen, X., Lan, Z., Li, P., ... & Huang, L. (2021). Collagen I induces preeclampsia-like symptoms by suppressing proliferation and invasion of trophoblasts. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 664766.

Ferreira, R. C., Fragoso, M. B. T., Bueno, N. B., Goulart, M. O. F., & de Oliveira, A. C. M. (2020). Oxidative stress markers in preeclamptic placentas: A systematic review with meta-analysis. *Placenta*, 99, 89-100.

Fisher, S. J., Cui, T. Y., Zhang, L., Hartman, L., Grahl, K., Zhang, G. Y., ... & Damsky, C. H. (1989). Adhesive and degradative properties of human placental

cytotrophoblast cells in vitro. *The Journal of cell biology*, 109(2), 891-902.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2115717/>.

Gamage, T. K., Chamley, L. W., & James, J. L. (2017). Stem cell insights into human trophoblast lineage differentiation. *Human Reproduction Update*, 23(1), 77-103.

Gerbaud, P., & Pidoux, G. (2015). An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. *Placenta*, 36, S35-S42.

Hamilton, W. J., & Boyd, J. D. (1960). Development of the human placenta in the first three months of gestation. *Journal of anatomy*, 94(Pt 3), 297.

Holland, O. J., Cuffe, J. S., Dekker Nitert, M., Callaway, L., Kwan Cheung, K. A., Radenkovic, F., & Perkins, A. V. (2018). Placental mitochondrial adaptations in preeclampsia associated with progression to term delivery. *Cell death & disease*, 9(12), 1-13.

Huppertz, B., Kivity, V., Sammar, M., Grimpel, Y., Leepaz, N., Orendi, K., ... & Lubzens, E. (2011). Cryogenic and low temperature preservation of human placental villous explants—a new way to explore drugs in pregnancy disorders. *Placenta*, 32, S65-S76.

Hustin, J., Jauniaux, E., & Schaaps, J. P. (1990). Histological study of the materno-embryonic interface in spontaneous abortion. *Placenta*, *11*(6), 477-486.

Keryer, G., Alsat, E., Taskén, K., & Evain-Brion, D. (1998). Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro. *Journal of cell science*, *111*(7), 995-1004.

Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, *299*(1-2), 1-34.

Lachman, E., Mali, A., Gino, G., Burstein, M., & Stark, M. (2000). Placenta accreta with placenta previa after previous cesarean sections--a growing danger in modern obstetrics. *Harefuah*, *138*(8), 628-31.

Lee, J. M., Jung, J., Lee, H. J., Jeong, S. J., Cho, K. J., Hwang, S. G., & Kim, G. J. (2012). Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. *International immunopharmacology*, *13*(2), 219-224.

Lokossou, A. G., Toudic, C., & Barbeau, B. (2014). Implication of human endogenous retrovirus envelope proteins in placental functions. *Viruses*, *6*(11), 4609-4627.

Loregger, T., Pollheimer, J., & Knöfler, M. (2003). Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast—a review. *Placenta*, *24*, S104-S110.

Martínez, N., Abán, C. E., Leguizamón, G. F., Damiano, A. E., & Farina, M. G. (2016). TPRV-1 expression in human preeclamptic placenta. *Placenta*, *40*, 25-28.

Molvarec, A., Fügedi, G., Szabó, E., Stenczer, B., Walentin, S., & Rigó, J. (2015). Decreased circulating anandamide levels in preeclampsia. *Hypertension Research*, *38*(6), 413-418.

Morrish, D. W., Dakour, J., & Li, H. (2001). Life and death in the placenta: new peptides and genes regulating human syncytiotrophoblast and extravillous cytotrophoblast lineage formation and renewal. *Current Protein and Peptide Science*, *2*(3), 245-259.

Moser, G., Weiss, G., Gauster, M., Sundl, M., & Huppertz, B. (2015). Evidence from the very beginning: endoglandular trophoblasts penetrate and replace uterine glands in situ and in vitro. *Human reproduction*, *30*(12), 2747-2757.

Moser, G., Windsperger, K., Pollheimer, J., de Sousa Lopes, S. C., & Huppertz, B. (2018). Human trophoblast invasion: new and unexpected routes and functions. *Histochemistry and cell biology*, *150*(4), 361-370.

Mukhopadhyay, A., Ravikumar, G., Meraaj, H., Dwarkanath, P., Thomas, A., Crasta, J., ... & Sridhar, T. S. (2016). Placental expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1): Gender-specific relation with human placental growth. *Placenta*, *48*, 119-125.

Murthi, P. (2014). Placental homeobox genes and their role in regulating human fetal growth. *Placenta*, *35*, S46-S50.

Pijnenborg, R., Dixon, G., Robertson, W. B., & Brosens, I. (1980). Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta*, *1*(1), 3-19.

Pijnenborg, R., Vercruyse, L., & Hanssens, M. (2006). The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta*, *27*(9-10), 939-958.

Poehlmann, T. G., Fitzgerald, J. S., Meissner, A., Wengenmayer, T., Schleussner, E., Friedrich, K., & Markert, U. R. (2005). Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3. *Placenta*, *26*, S37-S41.

Pollheimer, J., Haslinger, P., Fock, V., Prast, J., Saleh, L., Biadasiewicz, K., ... & Knöfler, M. (2011). Endostatin suppresses IGF-II-mediated signaling and invasion of human extravillous trophoblasts. *Endocrinology*, *152*(11), 4431-4442.

Pollheimer, J., Vondra, S., Baltayeva, J., Beristain, A. G., & Knöfler, M. (2018). Regulation of placental extravillous trophoblasts by the maternal uterine environment. *Frontiers in immunology*, *9*, 2597. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02597>

Pratt, A., Da Silva Costa, F., Borg, A. J., Kalionis, B., Keogh, R., & Murthi, P. (2015). Placenta-derived angiogenic proteins and their contribution to the pathogenesis of preeclampsia. *Angiogenesis*, *18*(2), 115-123.

Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Prakobphol, A., Foulk, R., McMaster, M., & Fisher, S. J. (2004). Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *The Journal of clinical investigation*, *114*(6), 744-754. <https://www.jci.org/articles/view/22991>.

Renaud, S. J., Kubota, K., Rumi, M. K., & Soares, M. J. (2014). The FOS transcription factor family differentially controls trophoblast migration and invasion. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(8), 5025-5039.

Rutland, C. S., Atkinson, S. D., Mukhopadhyay, M., Jiang, K., Soff, G. A., Mayhew, T. M., & Mitchell, C. A. (2011). Thrombophilic-type placental pathologies and skeletal growth delay following maternal administration of

angiostatin4. 5 in mice. *Biology of reproduction*, 84(3), 505-513.

<https://academic.oup.com/biolreprod/article/84/3/505/2530317?login=false>

Simpson, R. A., Mayhew, T. M., & Barnes, P. R. (1992). From 13 weeks to term, the trophoblast of human placenta grows by the continuous recruitment of new proliferative units: a study of nuclear number using the disector. *Placenta*, 13(5), 501-512.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/014340049290055X?via%3Dihub>

Taques, I. I. G. G., Barbosa, T. R., de Cássia Martini, A., Pitchenin, L. C., Braga, Í. A., de Melo, A. L. T., ... & de Aguiar, D. M. (2016). Molecular assessment of the transplacental transmission of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella canis* and *Ehrlichia canis* in dogs. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 49, 47-50.

Turco, M. Y., & Moffett, A. (2019). Development of the human placenta. *Development*, 146(22), dev163428.

Velicky, P., Windsperger, K., Petroczi, K., Pils, S., Reiter, B., Weiss, T., ... & Pollheimer, J. (2018). Pregnancy-associated diamine oxidase originates from extravillous trophoblasts and is decreased in early-onset preeclampsia. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.

Wakeland, A. K., Soncin, F., Moretto-Zita, M., Chang, C. W., Horii, M., Pizzo, D., ... & Parast, M. M. (2017). Hypoxia directs human extravillous trophoblast differentiation in a hypoxia-inducible factor–dependent manner. *The American journal of pathology*, 187(4), 767-780.

Zhang, Y., Pan, Y., Lin, C., Zheng, Y., Sun, H., Zhang, H., ... & Chen, J. (2016). Bile acids evoke placental inflammation by activating Gpbar1/NF- κ B pathway in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Journal of Molecular Cell Biology*, 8(6), 530-541.