



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
Biologia Molecolare e Applicata

**STUDIO DELLA PLACENTA UMANA: LA SPETTROSCOPIA VIBRAZIONALE PER LA
CARATTERIZZAZIONE DELLA COMPOSIZIONE MACROMOLECOLARE E LA
PRESENZA DI MICROPLASTICHE.**

**STUDY OF THE HUMAN PLACENTA: VIBRATIONAL SPECTROSCOPY FOR
THE CHARACTERIZATION OF THE MACROMOLECULAR COMPOSITION
AND THE PRESENCE OF MICROPLASTICS.**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Sara Matassa

Relatore Chiar.ma Prof.ssa
Oliana Carnevali

Correlatore Chiar.ma Prof.ssa
Elisabetta Giorgini

Sessione Estiva

Anno Accademico 2020/2021

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 Placenta: struttura e funzioni.	3
1.2 Microplastiche: origine e potenziali effetti sugli organismi viventi.....	17
1.3 Spettroscopia FTIR Imaging: teoria e applicazioni in campo biologico..	21
1.4 Microspettroscopia Raman	26
2. SCOPO DELLA TESI	31
3. MATERIALI E METODI.....	32
3.1 Raccolta dei campioni di placenta	32
3.2 Analisi istologica.....	33
3.3 Analisi FTIR Imaging	34
3.4 Analisi RMS.....	37
4. RISULTATI	40
4.1 Caratterizzazione morfologica e macromolecolare di porzioni di placenta umana.....	40
4.2 Analisi istologica.....	40
4.3 Analisi spettroscopica FTIRI.....	45
4.4 Identificazione e caratterizzazione di microplastiche in placenta umana	56
5. DISCUSSIONE	61
6. CONCLUSIONI	68
7. BIBLIOGRAFIA.....	69

1. INTRODUZIONE

1.1 Placenta: struttura e funzioni.

La placenta è l'interfaccia tra la madre ed il feto ed è fondamentale per lo sviluppo intrauterino del feto stesso. Oltre a fornire i nutrienti e l'ossigeno necessari per l'accrescimento tissutale, contribuisce anche al metabolismo fetale mediante il rilascio di fattori di crescita. Produce e metabolizza anche una serie di ormoni che agiscono sia direttamente a livello fetale sia indirettamente in quanto vengono metabolizzati dalla placenta e determinano l'apporto di sostanze nutritive al feto e il metabolismo fetale. (Sandovici, I. et al., 2012)

L'apparato endocrino placentare gioca un ruolo fondamentale nell'adattamento materno alla gravidanza (ad esempio tramite l'accumulo di lipidi come fonte di energia nella prima parte della gravidanza). Un corretto sviluppo e una corretta funzione placentare sono dunque fattori importanti per lo sviluppo fetale. Una corretta crescita fetale dipende da un efficiente rilascio dei nutrienti dalla madre ma richiede anche un corretto scambio transplacentare di sostanze ed una adeguata perfusione placentare (Pasca, A.M., et al., 2010). La capacità della placenta di fornire sostanze nutritive al feto dipende pertanto da una serie di fattori tra cui le dimensioni, la morfologia, il flusso ematico, la presenza di trasportatori, la velocità di consumo/produzione di sostanze nutritive, ecc.

Questi fattori sono strettamente correlati tra loro durante lo sviluppo intrauterino e possono venir modulati da cambiamenti ambientali materni e/o fetali (Fowden, A. L., et al., 2009).

La placenta umana è di tipo “emocoriale”, in quanto il corion al momento dell’impianto nell’utero, corrode epitelio e connettivo uterini sino a raggiungere i vasi sanguigni uterini (Soares, M. J., et al., 2018).

Al termine della gravidanza la placenta ha forma discoidale, con un diametro di ~20-22 cm, uno spessore centrale di 2,5 cm e il suo peso è compreso fra 500÷600 g. (Huppertz, B. 2008).

La placenta è composta da una piastra corionica, in stretto contatto durante la gravidanza con la decidua uterina, e da membrane fetali (amnios e corion) che racchiudono il feto (Furuya, M., et al., 2008). La piastra corionica è rivolta verso la cavità amniotica e da questa si estendono i villi coriali composti da un nucleo stromale centrale contenente un letto di capillari fetali e da fibroblasti e macrofagi residenti che prendono il nome di Hofbauer. I villi presentano uno strato esterno di sincizio-trofoblasto a diretto contatto con il sangue materno. La maggior parte dei villi terminano in uno spazio intervilloso e sono bagnati dal sangue materno, mentre altri invadono la decidua basale, porzione materna della placenta che permette l’ancoraggio di questa all’endometrio. L’invasione della decidua tramite l’ancoraggio dei villi porta alla formazione di setti

placentali che dividono la regione trofoblastica della placenta in cotiledoni irregolari. (Parolini, O., et al., 2008) (Fig. 1)

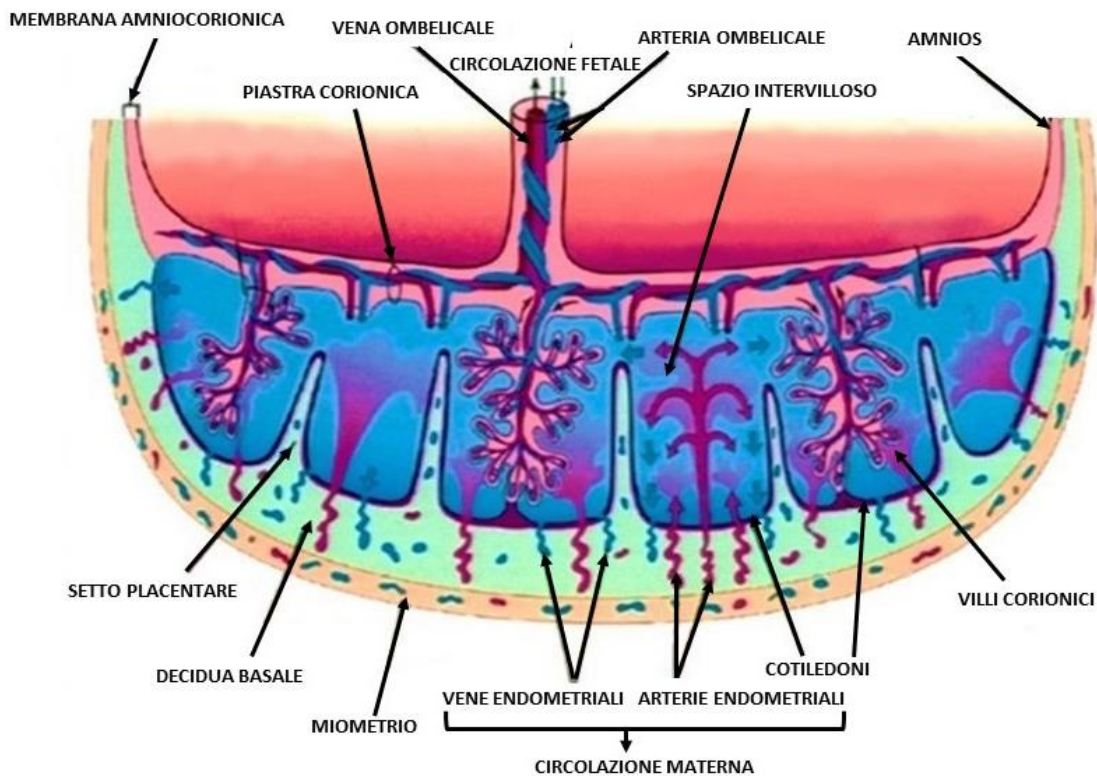


Figura 1. Sezione schematica della placenta umana a termine. (Saunders,2009).

Le membrane amniotiche e corioniche si estendono dai margini del piatto corionico fino ad includere il feto nella cavità amniotica. L'arnio è una sottile membrana avascolare composta da un singolo strato di cellule cuboidali e da epitelio colonnare, detto epitelio amniotico, (AE) bagnato dal fluido amniotico e contiguo attraverso il cordone ombelicale al feto. L'epitelio amniotico è adeso alla membrana amniotica (AM), uno strato compatto acellulare composto da

collagene I, III e fibronectina. Uno strato spugnoso di fibre sparse di collagene separa l'AM dal mesoderma corionico (CM) i quali hanno una composizione simile. Durante la gravidanza la maggior parte del corion è in contatto con la decidua capsulare e i vasi si atrofizzano generando una morbida regione del corion conosciuta come "corion leave" che è caratterizzata da una parte mesodermica e da una parte corion trofoblastica. La regione del corion in contatto con la regione basale e dalla quale i villi corionici si protendono verso l'endometrio è conosciuta come "corion frondosum". Nella placenta una lamina basale separa il mesoderma corionico dalle cellule extravilluose trofoblastiche che rappresentano l'unico residuo dei precedenti villi del corion frondosum. (Evangelista, M., et al., 2008)

Il processo che porta alla formazione della placenta viene indicato con il termine placentazione e procede attraverso due stadi importanti: l'attacco dell'embrione alla parete uterina (impianto), e la creazione delle connessioni vascolari necessarie per permettere gli scambi di gas e di nutrimenti tra la circolazione materna e quella fetale e l'eliminazione di cataboliti fetali nel sangue materno (circolazione placentare). (Norwitz, E. R., et al., 2001)

L'apporto di sangue materno è determinato alla fine del primo trimestre di gestazione e il sangue materno penetra nella placenta attraverso le arterie spirali che portano il sangue direttamente nello spazio intervilloso. Affinché il flusso

materno-placentare sia adeguato, è necessario che le cellule del trofoblasto invadano la zona delle arterie spirali durante la prima metà della gravidanza, causando la degenerazione dei tessuti muscolari lisci ed elastici della parete delle arterie spirali e la sostituzione delle cellule endoteliali con le cellule di trofoblasto. Quindi importanti modificazioni coinvolgono le arterie spirali, che vanno incontro ad un processo di progressiva “venulizzazione”: le pareti delle arterie spirali, specialmente a livello endoteliale, mostrano processi necrotici accompagnati da degenerazione della parete muscolare (Sheppard, B. L., et al, 1974). Queste alterazioni trasformano le pareti dei vasi, che perdono la loro caratteristica elasticità e risultano costituite soltanto da una parete di materiale amorfo extra cellulare.. La trasformazione dei vasi materni prosegue fino al secondo trimestre arrivando a coinvolgere anche i vasi miometrali (Pijnenborg, R., et al, 1980). Intorno alla dodicesima settimana di gestazione, inizia a definirsi la circolazione utero-placentare che è alla base degli scambi nutrizionali e gassosi tra madre e feto. Questo processo è normalmente completato entro la 16-18 settimana di gestazione e trasforma le arterie spirali in vasi dilatati, non responsivi alla vasocostrizione. (Wang Y., 2010)

In condizioni di sviluppo placentare fisiologico, a livello della placenta si stabiliscono così rapporti funzionali tra sangue materno e sangue fetale, mantenendo tuttavia separate le due circolazioni per mezzo della barriera

placentare. Il tessuto dei villi viene rifornito di ossigeno e di sostanze nutritive direttamente dal sangue materno che circola nello spazio intervilloso, formando quindi il compartimento dal quale il feto attinge le sostanze che gli sono necessarie (soprattutto ossigeno e nutrienti) e nel quale scarica le scorie che ha prodotto (anidride carbonica, ecc.).

Dai villi, poi, la maggior parte delle sostanze che hanno superato la barriera placentare raggiunge direttamente il feto tramite la circolazione feto-placentare. La “barriera placentare” ovvero la struttura attraverso la quale avviene lo scambio di sostanze, è dunque costituita dallo strato di tessuto che separa il sangue materno da quello fetale (rivestimento sinciziale, cito-trofoblasto, stroma villare, endotelio dei capillari fetali) (Avagliano, L., et al., 2016). La placenta è dunque un organo che presenta un suo proprio metabolismo, ed è responsabile di circa il 40% dell’assorbimento utero-placentare totale di ossigeno al termine della gravidanza (Carter, A. M. 2001).

Dopo il concepimento, l’embrione migra attraverso le tube di Falloppio e si stabilisce nella cavità uterina. Ha inizio la gravidanza e l'ovocita fecondato subisce le successive fasi di sviluppo. Tra lo stadio di sviluppo della morula e la blastocisti, inizia a differenziarsi una linea cellulare specializzata, definita trofoblasto. A circa 4 giorni dal concepimento, le cellule che compongono la morula, chiamate blastomeri, iniziano a secernere un fluido che si accumula

nella morula formando il blastocele. In questa fase, una massa cellulare compatta interna formerà l'embrione, mentre uno strato esterno di cellule forma il trofoblasto che darà origine ad una parte della placenta. Circa 6-7 giorni dopo il concepimento la blastocisti aderisce alla decidua uterina e inizia la formazione della placenta (Aplin, J. D. 2000). (Fig.2).

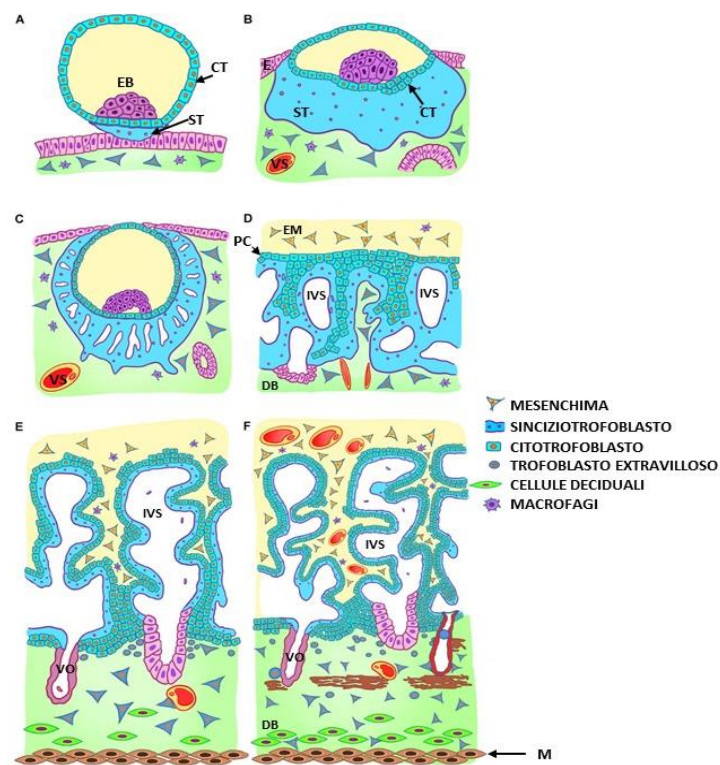


Fig.2 Fasi dello sviluppo della placenta. (A) impianto a 6-7 giorni dopo il concepimento; (B) stadio prelacunare (da 7 a 8 giorni); (C) inizio del periodo lacunare (da 8 a 9 giorni); (D) passaggio dal periodo lacunare allo stadio dei villi primari (da 12 a 15 giorni); (E) stadio dei villi secondari (da 15 a 21 giorni); (F) stadio dei villi terziari.

EB: massa cellulare interna; CT: cito-trofoblasto; ST: sincizio-trofoblasto; EM: mesoderma extraembrionale; PC: piastra corionica; IVS: spazio

intervilloso; DB: decidua basale; VS: vaso sanguigno; VO vena ombelicale; M: miometrio. (Silini, A. R., 2020).

Durante la fase di attacco e successivo impianto nell'epitelio endometriale, le cellule del polo embrionale di impianto proliferano a formare un trofoblasto bi-stratificato. Lo strato più esterno, in diretto contatto con i tessuti materni, si trasforma in sincizio-trofoblasto attraverso la fusione di cellule trofoblastiche vicine. I rimanenti componenti cellulari della parete della blastocisti, che non prendono contatto con i tessuti materni, rimangono distinte, tra loro separate e prendono il nome di cito-trofoblasto (Pötgens, A. J. G et al., 2002). Nei giorni successivi, al procedere dell'invasione, nuove aree della superficie del trofoblasto vengono in contatto stretto con i tessuti materni ed a questo processo seguono quelli di proliferazione trofoblastica e successiva fusione sinciziale. Il polo di impianto si presenta come una superficie ricoperta da digitazioni ramificate che invadono in profondità l'endometrio. Questo primo stadio che dura fino al giorno 7-8 dopo il concepimento è stato definito stadio pre-lacunare. Al giorno 8 post-concepimento, piccoli vacuoli compaiono al polo di impianto nella massa di sincizio-trofoblasto: essi si allargano e confluiscono tra loro a formare il cosiddetto sistema lacunare, ovvero il precursore dello spazio intervilloso. Le lacune comunicano tra di loro e con i sinusoidi e le vene

materne; queste connessioni vascolari consentono l'inizio della circolazione materna della placenta.

Intorno al dodicesimo giorno la blastocisti è così profondamente impiantata che l'epitelio uterino la ricopre interamente. La formazione delle lacune suddivide il trofoblasto che ricopre la blastocisti in tre strati:

- Il piatto corionico primario, che si affaccia sulla cavità della blastocisti
- Il sistema lacunare
- Il guscio trofoblastico che prende contatto con l'endometrio (Knöfler, M., et al., 2019).

Negli stadi precoci dell'impianto, l'erosione dei tessuti materni si verifica tramite l'azione litica del sincizio-trofoblasto. In un secondo momento, l'attività proliferativa del cito-trofoblasto e la sua rapida migrazione nella profondità dell'endometrio, sembrano essere responsabili dell'invasione successiva e dunque, dell'ulteriore espansione dell'area di impianto. Nel corso di questo processo lo stroma endometriale subisce notevoli trasformazioni: la presenza del trofoblasto che erode, induce le cellule stromali endometriali a proliferare ed allargarsi, dando così origine alle cellule deciduali. L'attività di invasione del sincizio-trofoblasto basale causa la disintegrazione delle pareti dei vasi endometriali materni a partire dal dodicesimo giorno post-concepimento (Staun-Ram, E., et al., 2005).

Circa 12 giorni dopo il concepimento, l'impianto può essere considerato finalizzato. L'embrione e i tessuti circostanti sono completamente incorporati all'interno dell'endometrio (Avagliano, L., et al., 2016).

Verso il quindicesimo giorno la circolazione materna diviene pienamente funzionante, poiché le lacune divengono ampie e confluenti e si connettono con il sangue delle arterie spirali e con le vene dell'endometrio. Dalla superficie del corion verso l'esterno, cominciano a formarsi cordoni di trofoblasto, detti villi coriali primari, per la rapida proliferazione del cito-trofoblasto che costituisce un fondamentale meccanismo cellulare di espansione della parte fetale della placenta.

Dopo il quindicesimo giorno nella porzione prossimale, attaccata al corion dei villi, compare del mesenchima che si estende progressivamente verso l'estremità distale di accrescimento dei villi stessi. Man mano che al loro interno si forma un'asse mesenchimale, i villi primari si trasformano gradualmente in villi secondari. Ogni villo secondario è formato da un'asse centrale di mesenchima, circondato da uno strato continuo di cito-trofoblasto, che è a sua volta rivestito da una lamina di sincizio-trofoblasto. Il sangue materno scorre attraverso gli ampi spazi intercomunicanti che si formano per la confluenza delle lacune del primitivo sincizio-trofoblasto, e che vengono ora indicati complessivamente con il termine di spazio intervilloso. Le estremità distali dei

villi secondari sono ora colonne solide (colonne cellulari del cito-trofoblasto) che si uniscono alla periferia formando il guscio trofoblastico che riveste tutto l'impianto e costituisce il limite più esterno dei tessuti dell'embrione. È principalmente costituito da cito-trofoblasto, ma contiene anche alla periferia tratti irregolari di sincizio-trofoblasto, che in parte penetrano abbastanza profondamente nell'endometrio e prendono contatto con i vasi sanguigni dell'utero corrodendoli. La formazione delle colonne di cito-trofoblasto e l'organizzazione della lamina trofoblastica costituiscono un meccanismo di allungamento dei villi e di espansione circonferenziale della parte fetale della placenta. (Fig 3) (Carter, A.M. et al., 2015; Arshad, M., et al., 2015).

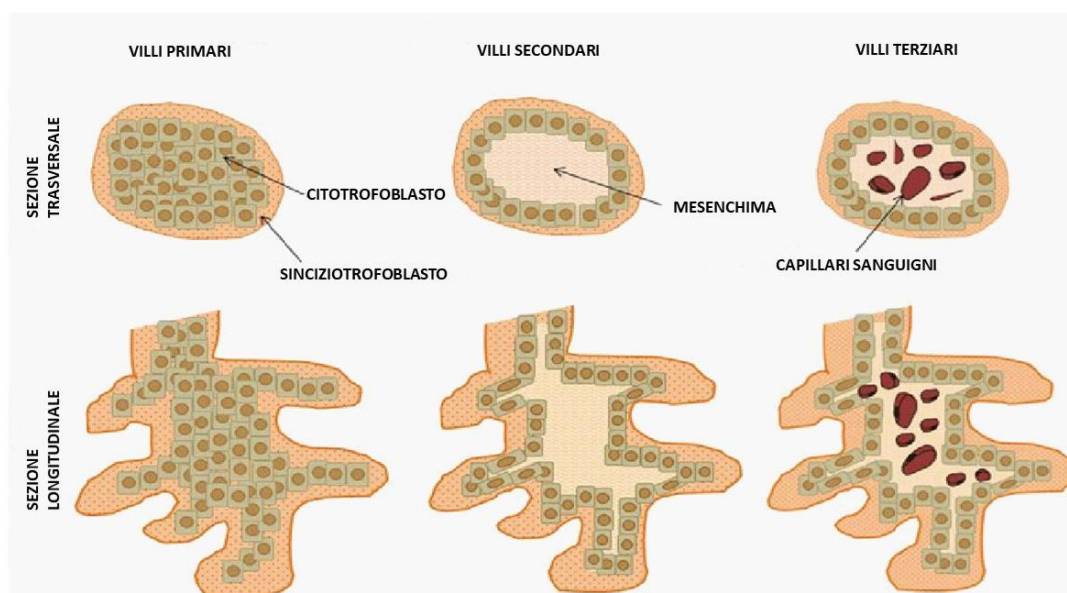


Fig 3. Sviluppo dei villi placentari del primo trimestre. (L.Avagliano et al., 2016).

In questo modo si forma una progressiva separazione tra il lato fetale (rivestito dall'amnios) e il lato materno (a contatto con la decidua), spazio occupato dai villi in evoluzione sino alla fine della gravidanza, immersi nel sangue materno (Herrick EJ et al., 2021).

Guardando la placenta dal lato fetale, la superficie appare liscia per la presenza del rivestimento amniotico, trasparente e sotteso sul corion nel quale sono evidenti le arterie e le vene che dal cordone ombelicale si distribuiscono nel disco placentare. Sul lato materno, la placenta presenta una superficie opaca, dal momento che essa non è rivestita da nessun epitelio: la superficie corrisponde alla zona spongiosa della decidua che si distacca al momento del parto dalla decidua compatta che rimane aderente al miometrio. I villi coriali sorgono dalla lamina coriale e costituiscono la porzione più estesa della parte fetale della placenta. Tra i villi si insinuano lamine derivanti dalla decidua compatta che costituiscono i setti placentari intervillosi. Questi formano fra loro i compartimenti intersettali, o cotiledoni materni, che comprendono diversi cotiledoni fetali (Resta L. et al., 2018).

Sulla base della struttura e dell'organizzazione vascolare si differenziano villi: mesenchimali, intermedi immaturi, staminali, intermedi maturi, terminali (Kaufmann P. et al., 1979; Sen, D. K., et al., 1979).

I villi mesenchimali si sviluppano nella prima fase di gravidanza, misurano circa 100-250 μm di diametro e sono caratterizzati da un nucleo stromale costituito prevalentemente da cellule mesenchimali. I capillari fetali dei villi mesenchimali sono poco sviluppati. Fino a sei settimane di gestazione, i villi mesenchimali rappresentano l'unico tipo di villi presenti nella placenta; sono quindi molto importanti durante le prime settimane di gravidanza per l'attività endocrina e la proliferazione degli altri tipi di villi.

I villi intermedi immaturi si sviluppano dai villi mesenchimali differenziati e misurano circa 100-400 μm di diametro. Questo tipo di villi è caratterizzato da uno stroma lasso di tipo reticolare. Il reticolo corrisponde a vere strutture canalicolari, con funzioni analoghe ai vasi linfatici del tessuto connettivo dell'adulto, all'interno dei quali sono sospese particolari cellule ad attività macrofagica, denominate cellule di Hoffbauer. I villi intermedi immaturi sono considerati i principali siti di scambi materno-fetale da 8 a 22 settimane di gestazione.

I villi staminali derivano dalla differenziazione dei villi intermedi immaturi, sono i villi più grandi della placenta con un diametro di 100-3000 μm e forniscono stabilità all'albero villosa. Sono caratterizzati da uno stroma fibroso contenente arterie e vene centrali con una spessa parete muscolare liscia.

I villi intermedi maturi sono villi lunghi e sottili, hanno un diametro di 80-150 μm e consistono in uno stroma sciolto contenente piccoli vasi periferici e capillari. Grazie alla loro intensa vascolarizzazione fetale, i villi intermedi maturi sono considerati la prima struttura importante per gli scambi fetale-materni.

I villi terminali sono i rami finali dell'albero villosa placentare. Misurano 30-80 μm di diametro e 100 μm di lunghezza e sono costituiti da un'ansa vascolare che si porta a immediato contatto con la membrana basale del trofoblasto superficiale del villo. Il complesso, noto come "membrana vasculo-sinciziale", rappresenta il modello fondamentale di scambio della placenta matura. Le membrane basali dell'endotelio e del trofoblasto sono fuse, mentre i nuclei del trofoblasto risultano defilati rispetto al punto di contatto. Il risultato di questo tipo di architettura è che tra il sangue materno e quello fetale si viene a trovare una distanza minima costituita dal citoplasma sottile dell'endotelio e del trofoblasto, separate da un'unica membrana basale (Demir, R., et al., 1989; Kaufmann P. et al., 1987; Hamilton, W.J., et al., 1960).

Dal punto di vista istologico, il corion villosa umano in una gravidanza normale mostra il sincizio-trofoblasto (STB) come un monostrato di cellule cubiche discontinue che circondano l'esterno dei villi. Il tessuto mesenchimale (M) e i capillari fetali (FC) si trovano all'interno dei villi, presentano dimensioni

diverse e si trovano alla periferia dei villi e vicino al sincizio-trofoblasto (Carrasco-Wong, I., et al., 2020; Ibrahim, N.A., et al., 2014).

1.2 Microplastiche: origine e potenziali effetti sugli organismi viventi

Negli ultimi decenni la contaminazione da plastica è diventata una delle principali problematiche in ambito ambientale, in quanto la produzione di plastica per uso medico, sanitario, tecnologico, alimentare, ecc. è aumentata vertiginosamente. L'importanza della plastica per il consumatore di oggi è innegabile (Shahul Hamid, F., et al., 2018). La plastica infatti grazie agli innumerevoli vantaggi che offre, negli anni è andata a sostituire materiali più tradizionali come vetro, metallo e carta, soprattutto per quanto riguarda i prodotti monouso o gli imballaggi (Auta, H.S., et al., 2017). “Plastica” è sinonimo di “malleabilità” e “flessibilità”, e i prodotti che si ottengono hanno caratteristiche eccezionali: sono economici, leggeri, durevoli e resistenti alla corrosione (Hammer, J., et al., 2012).

Attualmente, la dipendenza dai polimeri plastici per la produzione di prodotti di largo consumo è inevitabile, in particolare per ridurre i costi di produzione di beni leggeri ma durevoli. Anche in ambito medico i prodotti in plastica giocano un ruolo cruciale come nel caso di strumenti sterili monouso che garantiscono un elevato livello di igiene.

Purtroppo proprio per queste sue proprietà e per la sua persistenza e durata, la plastica sta creando un grave problema di gestione dei rifiuti. A tutt'oggi, rappresenta circa il 10% dei rifiuti che generiamo; di questa grande quantità, solo una piccola parte viene riciclata, mentre tutto il resto viene smaltito in discarica (Barnes, D.K., et al., 2009).

La plastica quando viene rilasciata nell'ambiente subisce degradazione chimica, fisica e meccanica (Thompson, R.C., et al., 2009). Infatti, gli agenti atmosferici, come le onde, l'abrasione, la radiazione ultravioletta e la foto-ossidazione in combinazione con i batteri, degradano gli oggetti di plastica in frammenti più piccoli che a loro volta vengono ridotti in particelle micro e nanometriche, che finiscono in gran parte in mare. Le nanoplastiche misurano da 0,001 μm a 0,1 μm (ossia da 1 a 100 nanometri), mentre le microplastiche (MPs) vanno da 0,1 μm a 5 mm.

Le micro e nanoplastiche non sono quindi visibili ad occhio umano ma hanno importanti ricadute sulla salute degli organismi viventi, sia animali che umani. La maggior parte dei fondali marini in tutto il mondo, e del Mar Mediterraneo in particolare, è costituita da plastica, derivante dai rifiuti lasciati sulle coste e in mare (de Souza Machado, A.A., et al., 2018).

La natura ubiquitaria delle MPs nell'ambiente e nei prodotti di consumo porta all'inevitabile esposizione umana a queste particelle. Infatti, il corpo umano è

esposto alle microplastiche per ingestione di alimenti contenenti microplastiche, inalazione di microplastiche nell'aria e per contatto dermico di tali particelle, contenute nei prodotti, nei tessuti o nelle polveri (Prata, J.C., et al., 2019). L'ingestione è considerata la principale via di esposizione umana alle microplastiche. Le particelle possono raggiungere il sistema gastrointestinale attraverso alimenti contaminati o dopo l'inalazione, che può portare a risposta infiammatoria, aumento della permeabilità e cambiamenti nella composizione e nel metabolismo dei microbi intestinali (Rahman, A., et al., 2020).

L'ingestione di MPs è molto probabile, in quanto le microplastiche sono state riscontrate in prodotti alimentari, come le cozze (Su, L., et al. 2016), il pesce commerciale (Neves, D., et al. 2015), lo zucchero (Liebezeit, G., et al., 2013) e l'acqua in bottiglia (Oßmann, B. E., et al. 2018). Parallelamente, essendo le microplastiche rilasciate nell'aria da numerose fonti, attraverso l'inalazione possono causare lesioni all'apparato respiratorio.

Anche il contatto cutaneo con le microplastiche è considerato una via di esposizione seppur meno significativa. Questa via è più spesso associata all'esposizione a monomeri e additivi della plastica, come gli interferenti endocrini bisfenolo A e ftalati, derivanti dall'uso quotidiano dei comuni apparecchi (Revel, M., et al., 2018).

Le microplastiche sono quindi particelle potenzialmente dannose per gli organismi in quanto l'esposizione alle microplastiche può portare a stress ossidativo, citotossicità e traslocazione ad altri tessuti, mentre la loro natura persistente ne limita la rimozione dall'organismo, portando a infiammazioni croniche (Anbumani, S., et al., 2018). Numerosi studi hanno dimostrato gli effetti negativi degli MP nei vertebrati e negli invertebrati marini (Wang, J., et al., 2016). Questi studi hanno dimostrato che zooplancton, invertebrati ed echinodermi sono tutti vulnerabili all'assunzione di MP (Tourinho, P.S., et al., 2010 ; Thompson, R.C 2006). In effetti, è stato dimostrato che i percolati di MP causano tossicità acuta in copepodi marini come *Nitocra spinipes* (Bejgarn, S., et al., 2015). È stata studiata anche la tossicità dei monomeri MP e degli additivi sia nei teleostei che nei roditori compreso nell'uomo (Carnevali, O., et al., 2020; Santangeli, S., et al.; Forner-Piquer, I., et al., 2018; Wang, J., et al., 2016; Mettang, T., et al., 1996; Karbalaei, S., et al., 2018; Garrigós, M.C., et al., 2004; Vom Saal, F.S., et al., 2005). In effetti, è stato dimostrato che le MP rilasciano monomeri tossici e/o additivi associati al cancro e ad anomalie riproduttive (Garrigós, M.C., et al., 2004 ; Vom Saal, F.S., et al., 2005).

1.3 Spettroscopia FTIR Imaging: teoria e applicazioni in campo biologico

La spettroscopia infrarossa (IR) è una tecnica di assorbimento normalmente impiegata nel campo della chimica analitica e chimica fisica per la caratterizzazione dei materiali, in termini di composizione e struttura. Il principio su cui si basa questa tecnica stabilisce che i legami chimici presenti in una molecola vengono eccitati subendo delle transizioni vibrazionali quando vengono in contatto con un fotone nella regione dell'infrarosso. Questo assorbimento della radiazione viene riportato su uno spettro infrarosso avente in ascissa la frequenza della radiazione assorbita (espressa in numero d'onda, cioè inverso della lunghezza d'onda, cm^{-1}) e in ordinata l'assorbanza (espressa come percentuale in unità arbitrarie) (Atkins, P., et al., 2006). L'analisi dello spettro permette di indentificare i gruppi funzionali presenti in una molecola sulla base delle vibrazioni dei legami all'interno degli stessi gruppi funzionali.

La radiazione infrarossa può essere suddivisa in tre zone spettrali (Fig. 4):

- 1) Vicino infrarosso NIR ($13000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$)
- 2) Medio infrarosso MIR ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$)
- 3) Lontano infrarosso FIR ($400 - 10 \text{ cm}^{-1}$)

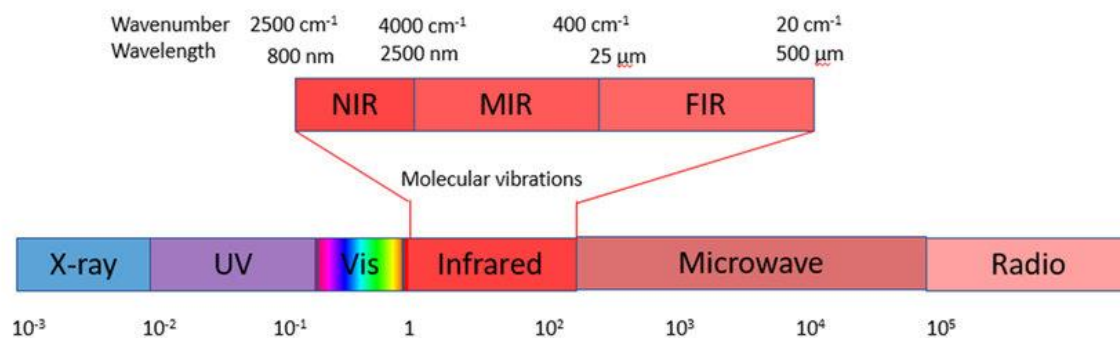


Figura 4. Radiazione elettromagnetica e regioni della radiazione infrarossa.

I moderni spettrometri IR montano l'interferometro di Michelson, e si basano sulla Trasformata di Fourier (FT). Questo tipo di interferometro si compone di uno specchio semitrasparente, che divide il fascio di luce proveniente da una sorgente luminosa e contenente tutte le lunghezze d'onda (4000-400 cm⁻¹) in due fasci di intensità pressoché uguale che vanno rispettivamente verso uno specchio fisso e uno specchio mobile (Fig. 5). Gli specchi fisso e mobile riflettono i due raggi che vengono nuovamente inviati allo specchio semiriflettente e infine al rivelatore. I due raggi hanno così compiuto un diverso cammino ottico e la differenza del cammino dà origine a interferenze che tramite l'interferometro vengono tradotte nell'interferogramma (Chiappe C. et al., 2003). La Trasformata di Fourier permette di trasformare l'interferogramma dal grafico nel dominio del tempo al dominio delle frequenze.

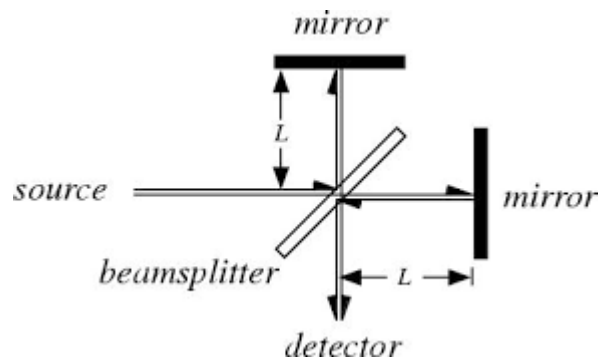


Figura 5. Interferometro di Michelson.

Le transizioni vibrazionali possono essere di due tipi: stretching (ν , allungamento della lunghezza di legame) e bending (δ , deformazione dell'angolo di legame) (Fig. 6). Ad ogni transizione vibrazionale corrisponde un preciso numero d'onda e quindi un picco nello spettro IR.

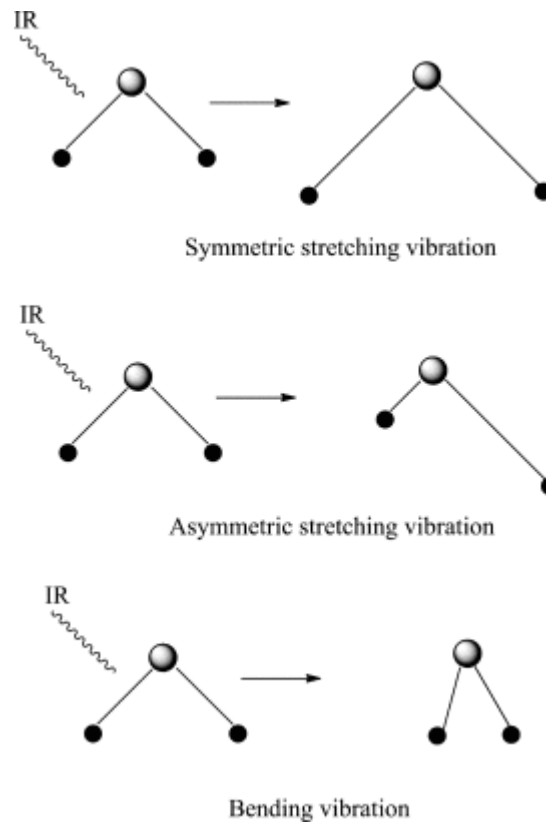


Figura 6. Vibrazioni di stretching e bending.

La spettroscopia FTIR viene oggi usata anche in campo biologico e biomedico per l'analisi di campioni cellulari e di tessuti. Questo è stato possibile grazie all'accoppiamento di uno spettrometro FTIR con un microscopio IR-Vis. Nasce quindi la spettroscopia FTIR Imaging, dove l'informazione biochimica e spaziale si combinano fra loro. Infatti, grazie allo sviluppo di detector bidimensionali, quali il Focal Plane Array (FPA) detector, è possibile ottenere mappe IR ad alta risoluzione di materiali biologici, da cui estrapolare, tramite adeguati software, informazioni sulla struttura, composizione e distribuzione

spaziale delle principali biomolecole. Il detector FPA consiste in una matrice di detector single point MCT (Mercurio-Cadmio-tellurio) che mappa contemporaneamente una specifica area; viene utilizzato per l'analisi di campioni biologici non omogenei. La mappa IR generata è costituita da migliaia di pixel/spettri, con una risoluzione spaziale di circa 2,5 micron. L'acquisizione della mappa avviene in pochi minuti dato che l'utilizzo dell'FPA non richiede lo spostamento del detector durante l'analisi (Miller, L.M., et al., 2005). Utilizzando questa tecnica di analisi e studiando gli spettri di assorbimento del campione in esame è possibile, in riferimento ai modelli di bande di assorbimento delle principali biomolecole, individuare i vari costituenti biologici (Giorgini E., 2016).

La spettroscopia FTIRI è una potente tecnica analitica in ambito biomedico, in quanto prevede la caratterizzazione di biomolecole tramite l'acquisizione del loro spettro vibrazionale con una analisi diretta del campione. L'utilizzo di opportuni dispositivi micro-fluidici permette di analizzare campioni cellulari in soluzione fisiologica senza l'uso di marcatori esterni. La spettroscopia IR, infatti, costituisce una tecnica di elezione per studi biochimici sia *in vivo* che *ex vivo* e può fornire informazioni su materiali biologici, singole cellule, fluidi biologici o tessuti complessi, proponendosi anche come valido metodo di indagine per lo studio della natura di malattie (Dukor et al., 2006; Liu, K.Z., et

al., 2005; Heraud, P., et al., 2009). Per quanto riguarda l'uomo, è possibile ottenere informazioni utili sia dal punto di vista diagnostico che prognostico, attraverso l'analisi di spettri caratteristici di cellule sane, displastiche, neoplastiche o di tessuti sani e patologici. L'analisi vibrazionale, infatti, consente di rilevare distorsioni biochimiche di vari componenti cellulari che sono connesse ad uno stato patologico. Nell'ambito dello studio delle malattie tumorali sono stati ottenuti risultati su distretti come seno (Conti, C., et al., 2009), polmone (Sulé-Suso, J., et al., 2005), fegato (Wang, J.S., et al., 2003), colon (Conti C., et al., 2008), pelle (Tosi, G., et al., 2010) e prostata (Gazi, E., et al., 2010).

1.4 Microspettroscopia Raman

La spettroscopia Raman è una tecnica di spettroscopia vibrazionale che, come la spettroscopia FTIR, sfrutta l'interazione della luce con la materia per ottenere informazioni sulla struttura o sulle caratteristiche di un materiale. Mentre la spettroscopia FTIR è basata sull'assorbimento della radiazione, la spettroscopia Raman sfrutta la diffusione (scattering) della luce. Entrambe forniscono uno spettro caratteristico delle specifiche vibrazioni di una molecola che sono utili per identificare una sostanza.

La spettroscopia Raman prende il nome da Sir C. V. Raman che scoprì il principio dello scattering della radiazione elettromagnetica e per cui vinse un Nobel per la Fisica nel 1930. È appunto una spettroscopia di scattering dove si fa incidere sul campione la radiazione elettromagnetica monocromatica iniziale di intensità e frequenza nota e viene misurata la radiazione diffusa tramite rivelatore posto a 90° o 180° rispetto al cammino ottico lungo il campione (Fig. 7). La radiazione può essere diffusa in tre modi: Stokes, anti-Stokes e Rayleigh; le prime due sono definite scattering anelastico, mentre la terza è definita scattering elastico. In generale, la maggior parte dei fotoni viene dispersa o diffusa mantenendo la stessa energia (scattering *Rayleigh*). Una quantità molto piccola di questi fotoni, circa un fotone su 10^6 fotoni, dopo la diffusione ha una frequenza diversa da quella del fotone incidente (scattering anelastico). La radiazione *Stokes* possiede energia minore rispetto alla radiazione originaria incidente, visto che una parte di tale energia è utilizzata per promuovere una transizione a un livello superiore. La radiazione *anti-Stokes* riceve invece un contributo energetico dallo stato eccitato quando passa a un livello inferiore, per cui è caratterizzata da maggiore energia. risulta invece da scattering elastico e possiede la stessa energia della radiazione incidente.

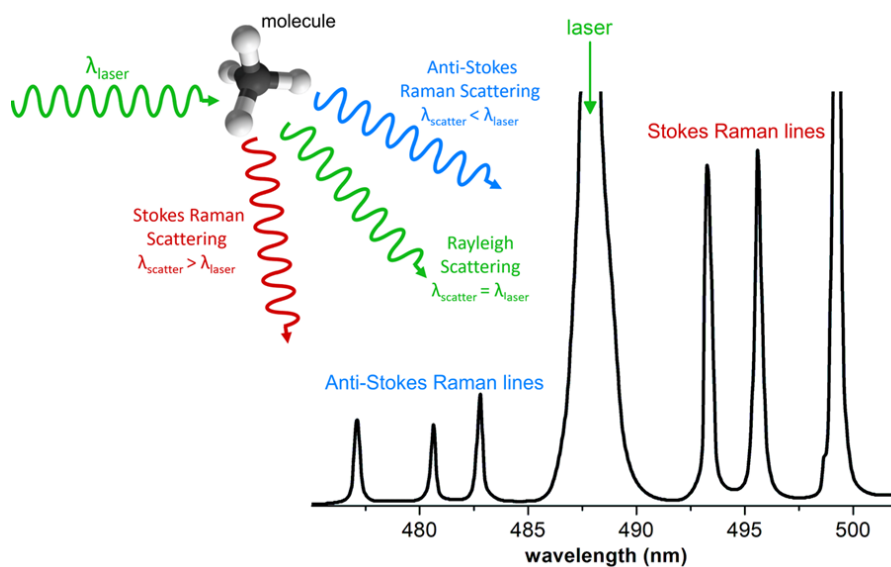


Figura 7. Scattering Raman.

La diffusione Raman è stata utilizzata per una vasta gamma di applicazioni che vanno dalla diagnostica medica alla scienza dei materiali e all'analisi delle reazioni. La diffusione Raman consente di esaminare le caratteristiche vibrazionali specifiche di una molecola e fornisce quindi informazioni sulla sua struttura e su come essa interagisce con le molecole circostanti.

A differenza della spettroscopia FTIR, che si basa sulle variazioni dei momenti di dipolo, la spettroscopia Raman si basa sulle variazioni nella polarizzabilità dei legami molecolari. Infatti, l'interazione della luce con una molecola può indurre una deformazione della nube elettronica di quest'ultima, provocando una variazione della polarizzabilità. I legami molecolari sono caratterizzati da

specifiche transizioni energetiche corrispondenti a una variazione della polarizzabilità che genera bande spettrali Raman attive.

Poiché l'effetto Raman è intrinsecamente debole, i componenti ottici di uno spettrometro Raman devono essere ben ottimizzati e combinati tra loro. Inoltre, dal momento che le molecole possono avere una maggiore tendenza alla fluorescenza se si utilizzano radiazioni di lunghezza d'onda minori, generalmente si utilizzano sorgenti di eccitazione monocromatiche con lunghezze d'onda maggiori, per esempio diodi laser a stato solido che producono luce con lunghezza d'onda di 532, 785 e 1024 nm.

La condizione necessaria affinché si verifichi la risonanza con la radiazione elettromagnetica è che la molecola sia anisotropicamente polarizzabile nel caso di transizione rotazionale, ovvero la vibrazione deve implicare una variazione della polarizzabilità nel caso di transizione vibrazionale. La cosiddetta “*regola di esclusione*” stabilisce che se una molecola possiede un centro di simmetria nessun modo vibrazionale può essere contemporaneamente -attivo al Raman e all'infrarosso: ad esempio, nel caso della molecola CO₂ le transizioni Raman sono legate allo stretching simmetrico del legame C=O, che non produce variazione del momento di dipolo molecolare, mentre quelle IR allo stretching asimmetrico del legame C=O e al bending O-C-O (Fig. 8).

Vibrazioni di CO₂

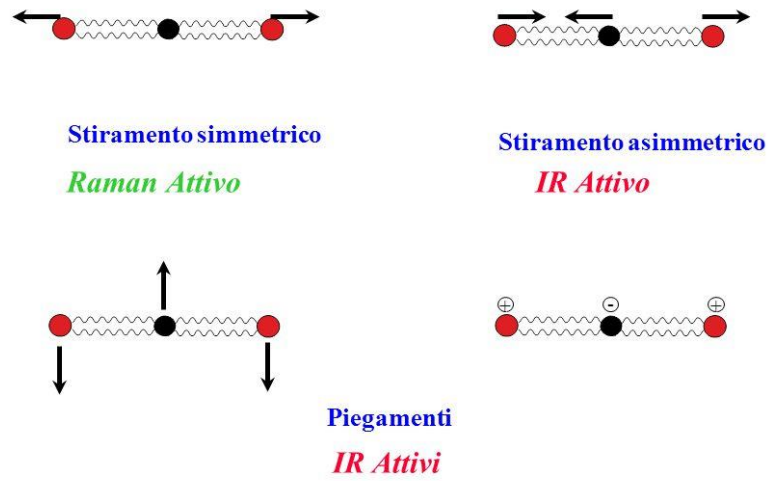


Figura 8. Transizioni Raman e IR attive.

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro di tesi è (1) caratterizzare l'architettura tissutale e la composizione macromolecolare della componente materna e fetale della placenta umana tramite analisi istologica, spettroscopia FTIR Imaging, e (2) verificare la presenza di microplastiche in porzioni di placenta umana mediante microspettroscopia Raman.

3.MATERIALI E METODI

3.1 Raccolta dei campioni di placenta

I campioni di placenta sono stati raccolti presso il Reparto di Ostetricia e Ginecologia dell'Ospedale San Giovanni Calibita Fatebenefratelli di Roma dal gruppo del Dottor Antonio Ragusa. Sono state arruolate N. 6 partorienti che hanno firmato un modulo di consenso per donare la loro placenta. Nessuna paziente presentava patologie e tutti i parti sono avvenuti a termine gravidanza. Subito dopo il parto, alcuni campioni di placenta (prelevati da N. 4 partorienti) sono stati raccolti per l'analisi istologica e FTIR e fissati mediante immersione in formalina tamponata al 10%. Per ogni campione sono state isolate porzioni di placenta sia dal lato materno che dal lato fetale.

Altri campioni di placenta (prelevati da N. 6 partorienti) sono stati raccolti seguendo un protocollo plastic-free per evitare contaminazioni esterne, per verificare l'eventuale presenza di microplastiche. A tale proposito, il personale sanitario ha utilizzato guanti di cotone per assistere le donne durante il travaglio e nella sala parto sono stati usati solo asciugamani di cotone per coprire i letti delle pazienti. Dopo il parto, le placente sono state deposte su un contenitore metallico e sezionate in porzioni (peso medio: $23,3 \pm 5,7$ g) prelevate dal lato

materno, dal lato fetale e dalle membrane corio-amniotiche. I campioni sono stati quindi posti in contenitori di vetro con coperchi di metallo a -20°C senza ulteriore trattamento.

Tutti i campioni sono stati etichettati in maniera anonima con codici numerici.

3.2 Analisi istologica

Per l'analisi istologica, piccoli campioni ($\sim 0.5\text{ cm}^2$) di porzione fetale e porzione materna sono stati fissati con formalina tamponata al 10 %. Successivamente i campioni sono stati allocati in biocassette per processazioni istologiche e sottoposti a disidratazione utilizzando serie crescenti di etanolo (70, 80, 95, 100 %). In seguito, i campioni sono stati trattati con xilene per 45 min, immersi in paraffina liquida per 4 h ed infine inclusi in paraffina solida.

I blocchetti così ottenuti sono stati tagliati mediante l'utilizzo di un microtomo (Leica, RM2125RTS, GmbH, Wetzlar, Germany) al fine di ottenere sezioni dello spessore di $5\mu\text{m}$. Le sezioni istologiche ottenute sono state poste su vetrino porta-oggetto e colorate con Ematossilina-Eosina (H&E) e con colorazione Masson tricromica elettiva per il tessuto connettivo. La colorazione di Masson tricromica è un metodo che associa una colorazione nucleare ottenuta con Ematossilina ferrica di Weigert, una colorazione delle emazie con acido picrico e una colorazione del connettivo con due coloranti acidi.

A tal fine, le sezioni sono state deparaffinate in Xilene e reidratate mediante serie discendente di alcool. Dopo le colorazioni con H&E e Masson tricromica, le sezioni sono state disidratate e diafanizzate in xilene. Al fine di preservare le sezioni ed evitare ossidazione dei coloranti utilizzati, su ciascuna sezione è stato posto un vetrino copri-oggetto il quale è stato montato mediante l'utilizzo di resina sintetica Safe mount (Bio-Optica). Al termine della procedura, i vetrini contenenti le sezioni colorate sono stati lasciati ad asciugare a T ambiente prima delle osservazioni.

Le sezioni sono state osservate mediante microscopio ottico a trasmissione Zeiss Axio Imager.A2 (Zeiss, Oberkochen, Germany) e le immagini sono state acquisite mediante fotocamera a colori ad alta risoluzione Axiocam 503.

3.3 Analisi FTIR Imaging

Gli stessi campioni inclusi in paraffina sono stati usati per l'analisi FTIRI. A tale proposito sono stati tagliate sezioni dello spessore di 8 micron; le sezioni sono state depositate su appositi supporti ottici speciali in Fluoruro di Calcio CaF₂, per la spettroscopia FTIR e quindi lasciati asciugare all'aria per 30 minuti. Le sezioni sono state quindi deparaffinate tramite l'immersione in xilene per circa 45 min.

L'analisi è stata effettuata tramite un interferometro Bruker INVENIO R accoppiato con un microscopio IR-Vis e con un detector bidimensionale FPA presso il Laboratorio di Spettroscopia Vibrazionale, Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche (Ancona, Italia) (Fig. 9). Per ogni sezione è stata dapprima acquisita la microfotografia con un obiettivo 15X e quindi sono state scelte diverse aree su cui acquisire le mappe IR. Ogni mappa aveva le dimensioni di 164x164 micron ed era composta da 4096 pixel/spettri. Le dimensioni di ogni pixel (risoluzione spaziale) erano 2.56x2.56 micron).

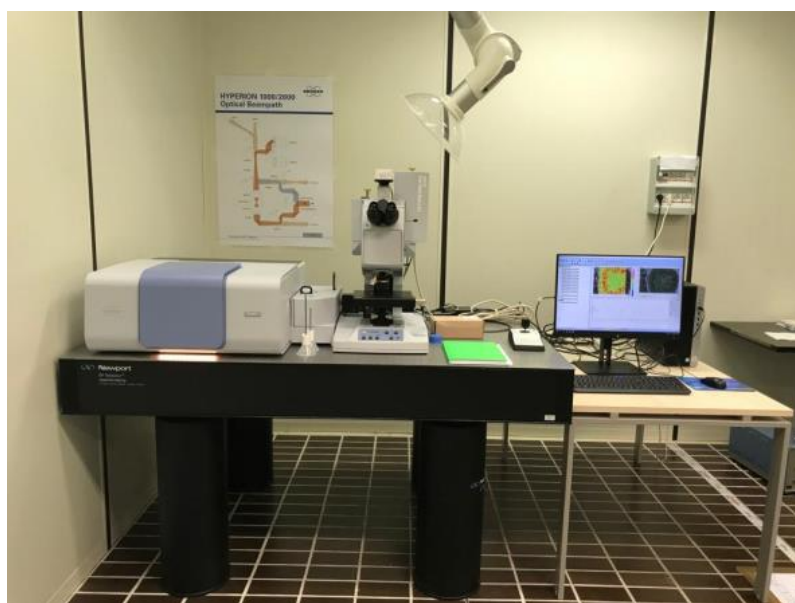


Figura 9. Interferometro Bruker INVENIO R accoppiato con microscopio IR-Vis e con detector bidimensionale FPA.

Le mappe IR sono state processate come segue, tramite il software OPUS 7.5 Bruker Optics: Atmospheric Compensation routine (per eliminare il contributo della CO₂ e dell'umidità dell'aria) e Vector Normalization (per eliminare artifici dovuti a differenze nello spessore della sezione).

Per valutare la distribuzione spaziale di specifiche macromolecole all'interno delle aree mappate, dalle mappe IR pre-processate sono state generate delle False Color Images, tramite integrazione negli intervalli spettrali rappresentativi di: lipidi (3050-2800 cm⁻¹, LIP), delle proteine (1780-1480 cm⁻¹, PRT) e dei composti glicosilati (1180-1005 cm⁻¹, GLY).

La composizione macromolecolare delle sezioni di placenta analizzate è stata valutata tramite i seguenti rapporti di area delle bande: LIP/TBM (rapporto fra l'area della regione spettrale 3050-2800 cm⁻¹, rappresentativa dei lipidi e la somma delle aree delle regioni spettrali 3050-2800 cm⁻¹ e 1800-900 cm⁻¹, rappresentativa della biomassa totale, TBM); PRT/TBM (rapporto fra l'area della regione spettrale 1780-1480 cm⁻¹, rappresentativa dei lipidi e la somma delle aree delle regioni spettrali 3050-2800 cm⁻¹ e 1800-900 cm⁻¹, rappresentativa della biomassa totale, TBM);

3.4 Analisi RMS

A tale proposito, N. 6 placenti sono state raccolte secondo un protocollo plastic-free per valutare la presenza di eventuali microplastiche. Da ogni placenta sono state prelevate delle porzioni dal lato materno, lato fetale e membrane corioamniotiche.

I campioni sono stati quindi digeriti tramite una soluzione di KOH al 10% preparata utilizzando acqua deionizzata e compresse di KOH (Sigma-Aldrich). Questa soluzione è stata aggiunta a ciascun contenitore in un rapporto con il campione di 1:8 (p/v). I contenitori sono stati sigillati e incubati a temperatura ambiente per 7 giorni. Per prevenire la contaminazione da plastica, durante la manipolazione dei campioni e durante l'intero esperimento sono stati indossati camici da laboratorio in cotone, maschere per il viso e guanti in lattice monouso. Le superfici di lavoro sono state lavate accuratamente con etanolo al 70% prima di iniziare tutte le procedure. Tutti i liquidi (acqua deionizzata per la pulizia e per la preparazione della soluzione) sono stati filtrati attraverso una membrana filtrante della dimensione dei pori di 1.6 μm (Whatman GF/A). Vetreria e strumenti, comprese forbici, pinzette e bisturi, sono stati lavati utilizzando detersivo per piatti, risciacquati con acqua deionizzata e infine risciacquati con acqua deionizzata filtrata. I digestati sono stati filtrati attraverso una membrana della dimensione dei pori di 1.6 μm (Whatman GF/A)

utilizzando una pompa a vuoto collegata a un imbuto filtrante. I filtri sono stati quindi essiccati a temperatura ambiente e conservati in piastre Petri di vetro fino all'analisi RMS. Per monitorare e correggere potenziali contaminazioni, sono stati preparati anche N. 3 contenitori contenenti solo KOH al 10%, trattati con lo stesso protocollo usato per i campioni di placenta, considerati come bianchi.

L'analisi Raman dei filtri è stata effettuata tramite un microspettrometro Raman XploRA Nano (Horiba Scientific) presso il Laboratorio di Spettroscopia Vibrazionale, Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche (Ancona, Italia) (Fig. 10).

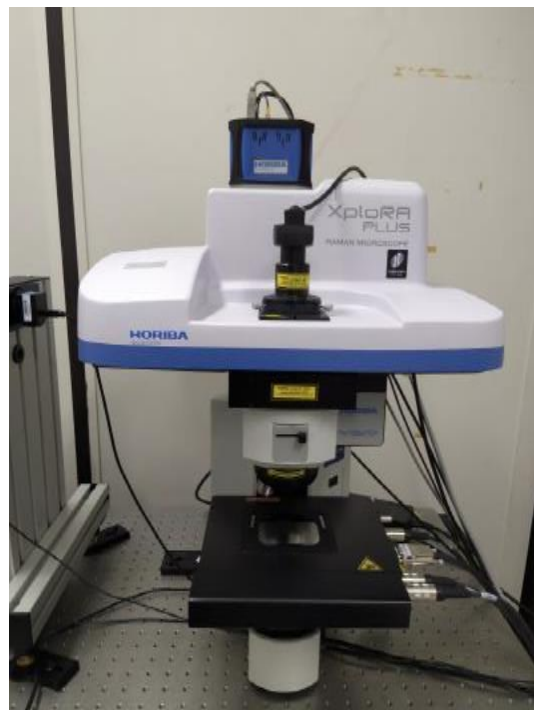


Figura 10. Microspettrometro Raman XploRA Nano (Horiba Scientific).

I filtri sono stati ispezionati in maniera preliminare tramite un obiettivo 10X (Olympus MPLAN10x/0.25); le MPs individuate sono state quindi caratterizzate morfologicamente tramite un obiettivo 100X (Olympus MPLAN100x/0.90) e quindi analizzate direttamente sul filtro mediante laser diodo a 785 nm nell'intervallo spettrale 160-2000 cm^{-1} (grating 600 linee per mm). Gli spettri sono stati dispersi su un rivelatore CCD raffreddato con Peltier; lo spettrometro è stato calibrato sul Silicio a 520.7 cm^{-1} prima dell'acquisizione spettrale. Gli spettri Raman grezzi sono stati sottoposti a correzione della linea di base polinomiale e normalizzazione vettoriale, al fine di ridurre il rumore e migliorare la qualità dello spettro (software Labspec 6, Horiba Scientific). Gli spettri Raman raccolti sono stati confrontati con quelli riportati nella SLOPP Library of Microplastics ("SLOPP Library of Microplastics," nd) e nella libreria spettrale del software KnowItAll (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

4. RISULTATI

4.1 Caratterizzazione morfologica e macromolecolare di porzioni di placenta umana

Nella prima parte di questo lavoro di tesi, porzioni di placenta umana prelevate dal lato materno e dal lato fetale, sono state analizzate tramite analisi istologiche e spettroscopia FTIRI, al fine di correlare la morfologia e l'architettura tissutale con la composizione macromolecolare delle aree investigate.

4.2 Analisi istologica

Lo studio morfologico delle diverse porzioni di placenta è stato effettuato su sezioni istologiche colorate con H&E, utilizzata come colorazione di routine, e colorazione Masson tricromica elettiva per il tessuto connettivo.

Immagini rappresentative della porzione materna della placenta sono riportate in Fig. 1. Nello specifico, l'analisi istologica della porzione materna della placenta ha messo in evidenza una sottile membrana di natura connettivale in corrispondenza della zona di distacco dalla parete uterina. Procedendo in senso materno-fetale è possibile osservare una porzione di tessuto muscolare liscio riconducibile allo strato basale. La successione tissutale in senso materno-fetale mostra la presenza di una zona maggiormente vascolarizzata e inframezzata da

propaggini di tessuto connettivo che prende il nome di decidua basale. Dalla porzione deciduale è stato possibile osservare l'emanarsi di sepimenti connettivali di largo spessore (~150-200µm) costituenti i setti deciduali. Come messo in evidenza dalla colorazione Masson tricromica (Fig. 11b), l'asse portante dei setti deciduali è costituito per la quasi totalità da tessuto connettivo compatto.

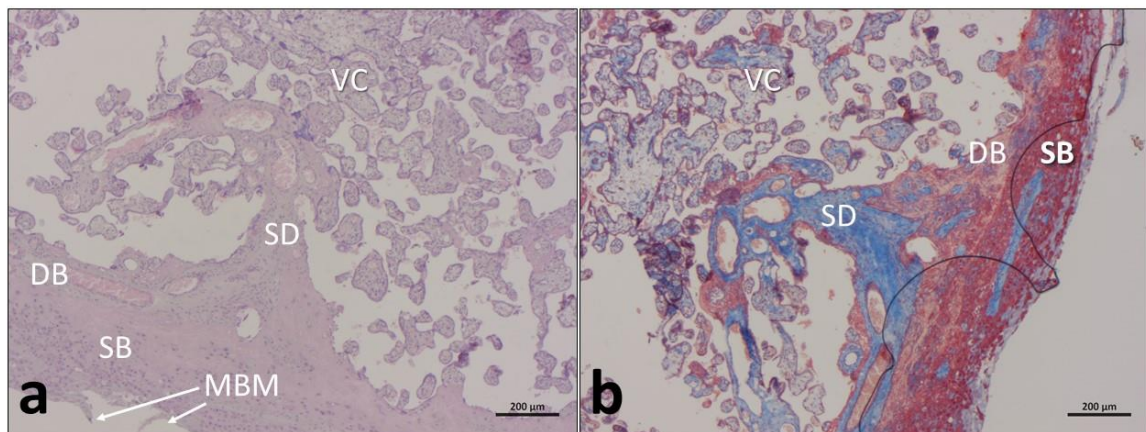


Fig. 11 Sezioni istologiche di porzione materna di placenta colorate con H&E (a) e Masson tricromica (b). SB: strato basale; DB: decidua basale; SD: setto deciduale; VC: villi coriali; MBM: membrana basale materna. Scala: 200µm.

Ingrandimenti maggiori hanno permesso di mettere in evidenza la presenza di una rete vasale all'interno dei setti deciduali costituita da vene e da arterie endometriali che originano dal sistema vasale di circolazione materna (Fig. 12). Lo spazio all'esterno dei setti deciduali costituisce lo spazio intervilloso fisiologicamente riempito da sangue materno e che nelle sezioni istologiche

osservate, a causa delle processazioni necessarie per le analisi, risulta per la gran parte svuotato. Nell'ambito dello spazio intervilloso è stato invece possibile osservare le propaggini dei villi corionici terminali che costituiscono le terminazioni dell'albero villare che si diparte dalla porzione fetale della placenta.

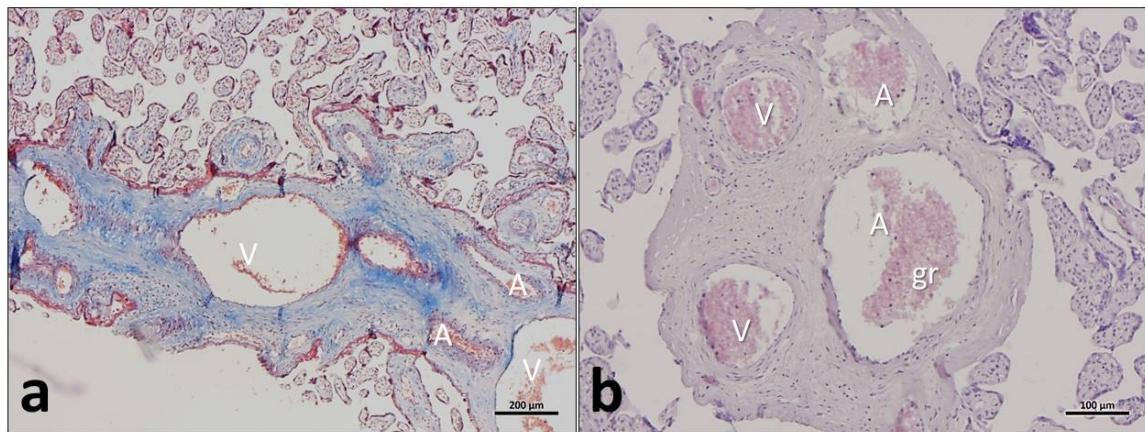


Fig. 12. Sezione istologica longitudinale (a) e trasversale (b) di setto deciduale della porzione placentare materna. a) Masson tricromica; b) H&E. V: vene materne; A: arterie materne; gr: globuli rossi. Scala a) 200µm b) 100µm.

Immagini istologiche rappresentative della porzione fetale della placenta sono riportate in Fig. 13. Dalle diverse colorazioni effettuate è stato possibile evidenziare come la faccia fetale esterna di questa porzione di placenta, sia costituita da una sottile pellicola connettivale che prende il nome di membrana amniotica. Al di sotto della membrana amniotica è possibile riscontrare una porzione spugnosa nella quale si trovano fibre sparse di collagene a costituire il tessuto connettivo più o meno lasso. A questo strato spugnoso segue il

mesoderma corionico dal quale si dipartono le basi degli alberi villosi che in alcuni casi raggiunge il millimetro di diametro. Dalla colorazione Masson tricromica (Fig. 13b) è stato possibile mettere in evidenza come il mesoderma corionico e l'albero villare abbiano una preponderante componente connettivale che funge da supporto all'intera struttura tissutale. Similmente a quanto osservato nella porzione materna, lo spazio inter-villoso periferico della porzione fetale della placenta si presenta svuotato dal contenuto sanguigno e caratterizzato dalla presenza delle terminazioni dei villi corionici.

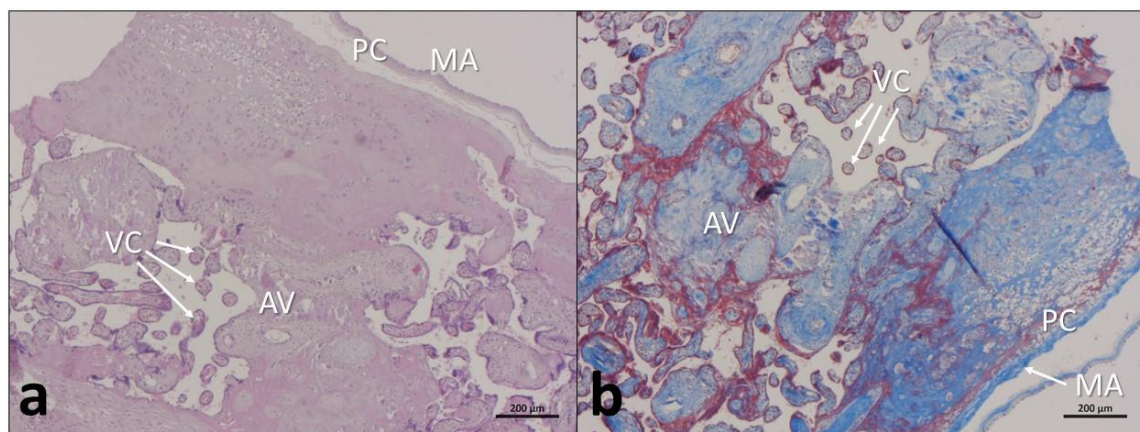


Fig. 13. Sezioni istologiche di porzione fetale di placenta colorate con H&E (a) e Masson tricromica (b). MA: membrana amniotica; PC: piastra corionica; AV: base dell'albero villare; VC: villi coriali. Scala: 200µm

In Fig. 14 è riportata una panoramica dell'intera porzione placentale fetale colorata con Masson tricromica ed ingrandimenti di alcune sue porzioni. Dalle immagini riportate in Fig. 14 si apprezza in maniera evidente la componente connettivale che caratterizza gli strati basali di questa porzione. Inoltre, in Fig.

14d è ben evidente come le terminazioni dei villi coriali siano caratterizzate dalla presenza di sinusoidi villari e dall'anastomosi delle arteriole e venule ombelicali che in questa porzione sono adibite all'assorbimento di ossigeno e sostanze nutritive dal sangue materno presente negli spazi intervillosi.

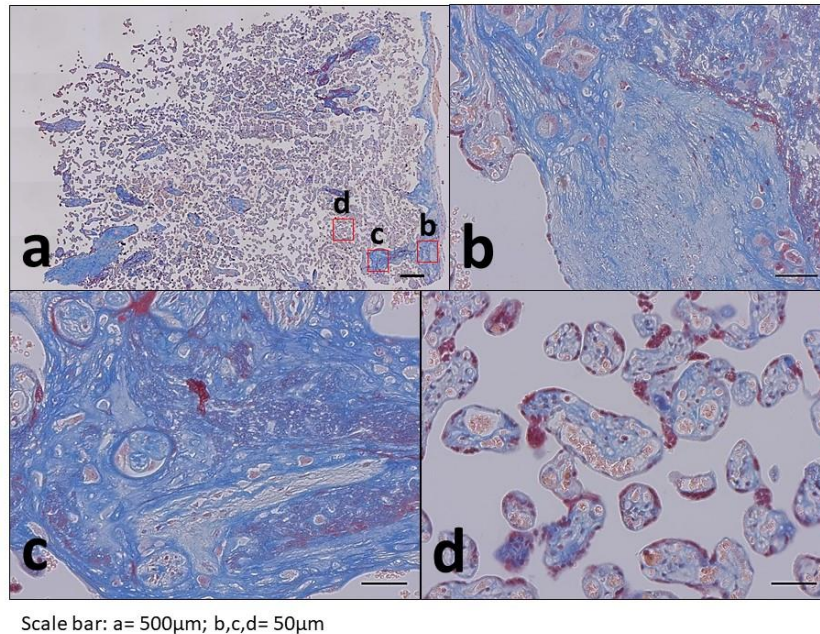


Fig 14. Basso (a) ed alti (b,c,d) ingrandimenti di sezione istologica di porzione fetale di placenta. b) Piastra corionica; c) base dell'albero villare; d) villi coriali. Scala: a) 500µm; b,c,d) 50µm.

La fitta vascolarizzazione che caratterizza sia l'albero villare che le sue terminazioni è meglio evidente in Fig. 15. Ad elevato ingrandimento (x1000), è possibile apprezzare l'epitelio esterno che riveste i villi coriali caratterizzato da uno strato monostratificato di cellule contigue che costituisce il sinciziotrofoblasto (Fig. 15a), mentre in Fig. 5b sono ben visibili le terminazioni della rete capillare del villo che raggiungono un calibro molto ridotto ($\sim 2\mu\text{m}$) che fa

sì che il passaggio degli eritrociti attraverso i capillari risulti fisicamente forzato, favorendo in tal modo gli scambi gassosi.

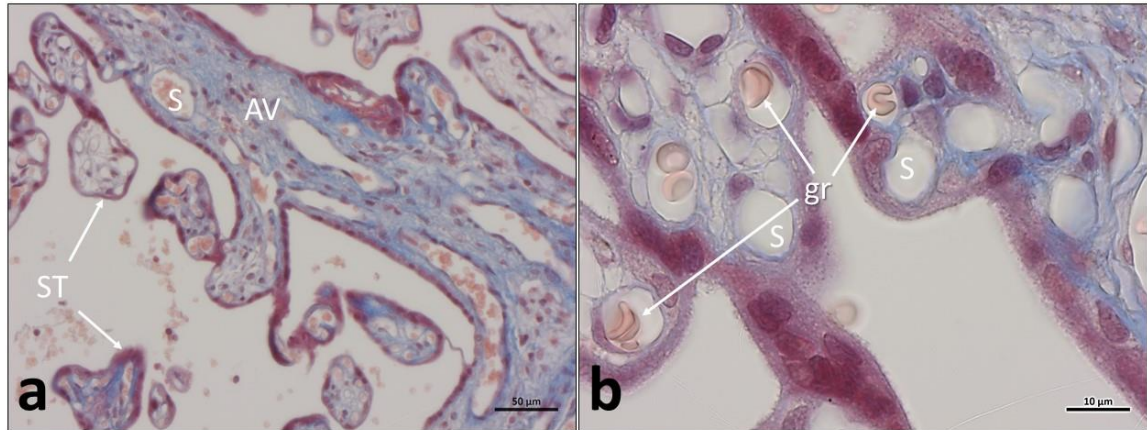
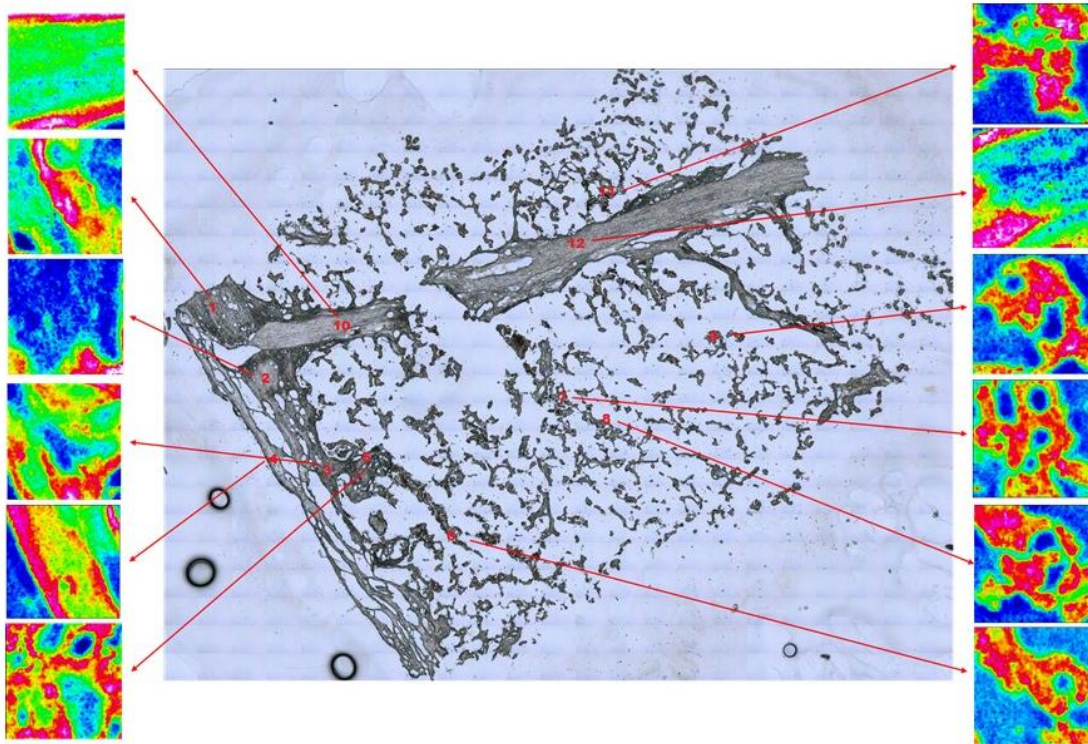


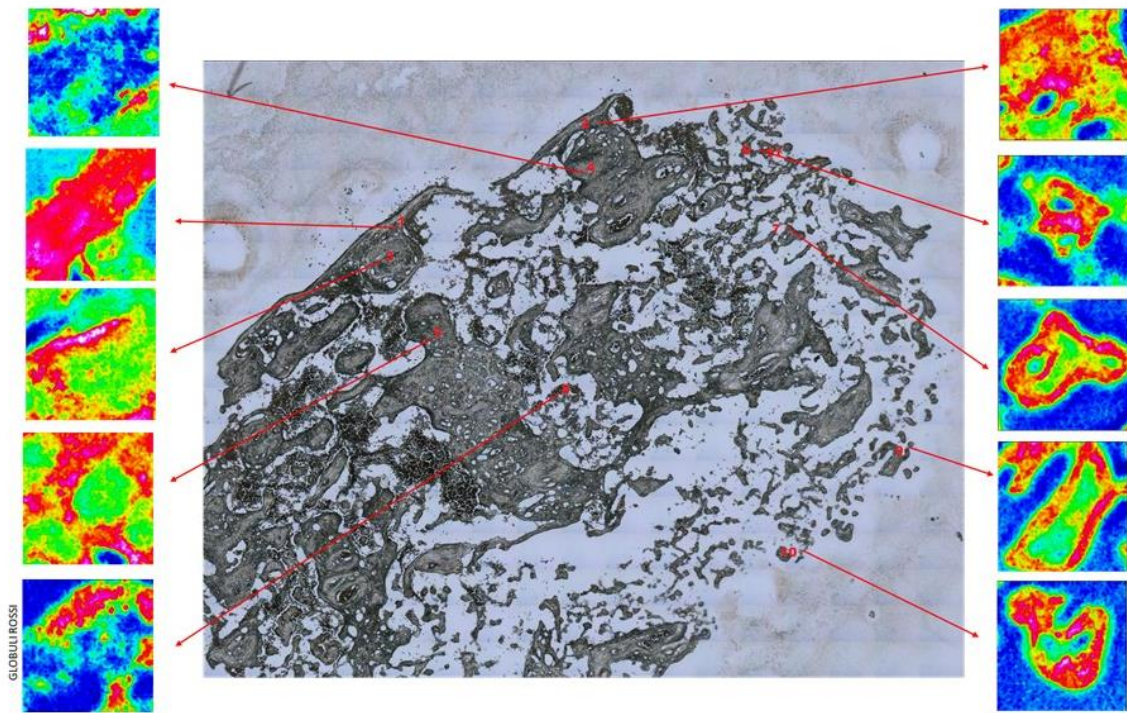
Fig 15 Basso (a) ed alto ingrandimento (b) di sezione istologica di albero villare (AV) di porzione fetale di placenta. S: sinusoidi; ST: sincizio-trofoblasto; gr: globuli rossi. Scala a) 50µm b) 10µm.

4.3 Analisi spettroscopica FTIRI

In Fig. 16 e 17, sono riportate le microfotografie di porzioni materna e fetale di placenta umana analizzate tramite spettroscopia FTIRI e le aree su cui sono state acquisite le mappe IR (immagini a falsi colori).



*Fig 16 Analisi FTIRI di sezione di placenta (porzione materna).
 (1,2,3,5: decidua basale; 4 Membrana basale; 6,7,8,9: villi; 10,12: setto
 deciduale)*



*Fig 17 Analisi FTIRI di sezione di placenta (porzione fetale).
 (1,2: Membrana amniotica; 3,4,5: piastra corionica; 8: base dell'albero
 villare; 6,7,9,10,11: villi corionici)*

In Fig. 18 è riportata l'analisi spettroscopica FTIRI su aree rappresentative della porzione basale materna, setto deciduale e villi coriali. Le immagini a falsi colori forniscono informazioni sull'assorbimento della radiazione IR all'interno della mappa IR e permettono di valutare la composizione macromolecolare del campione, in termini di lipidi, proteine, collagene, e carboidrati, e di correlarla alla topografia dell'area mappata. Per quanto riguarda la porzione basale, si osserva una prevalenza della componente proteica e in particolare di collagene, soprattutto a livello della sottile

membrana adiacente alla parete dell'utero identificata dall'analisi. Nella parte più interna si rileva comunque la presenza di aree di colocalizzazione di lipidi e carboidrati. Il setto deciduale è composto esclusivamente da fibre di collagene, mentre nella membrana dei villi coriali risultano presenti tutte le componenti (lipidi, proteine, collagene, e carboidrati).

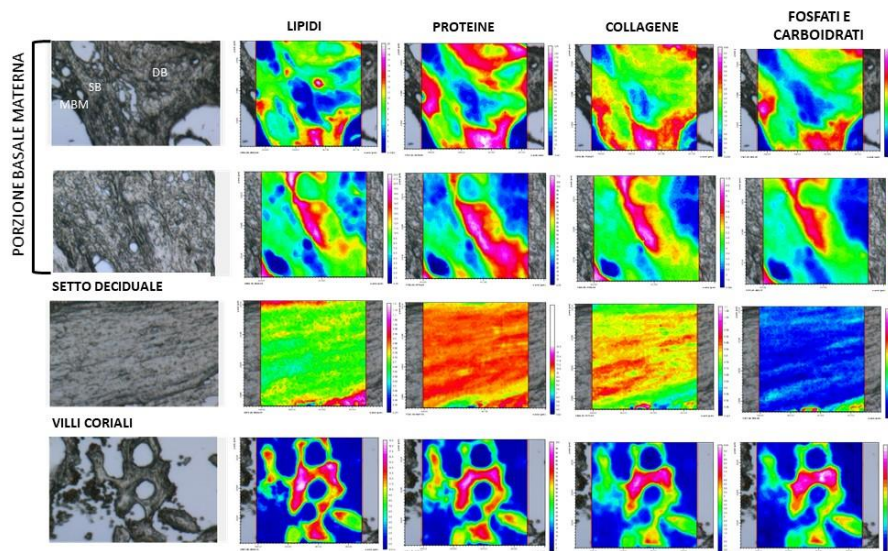


Fig. 18 Analisi FTIRI di sezione di placenta (porzione fetale). Microfotografie di aree rappresentative della porzione basale materna, del setto deciduale e dei villi coriali, e corrispondenti immagini a falsi colori rappresentanti la distribuzione topografica di lipidi, proteine, collagene, fosfati e carboidrati.

In Fig. 19 è riportata l'analisi spettroscopica FTIRI su aree rappresentative della membrana amniotica, piastra corionica, base dell'albero villare e villi coriali nella porzione fetale. In questo caso, si osserva come la membrana amniotica sia ricca di lipidi e carboidrati nella parte più esterna, mentre proteine e

collagene si trovano anche nella parte interna. La piastra corionica risulta maggiormente composta da una componente proteica e in particolare da collagene. La base dell'albero villare mostra un elevato contenuto di proteine, mentre nella membrana dei villi coriali, risultano presenti tutte le componenti (lipidi, proteine, collagene e carboidrati).

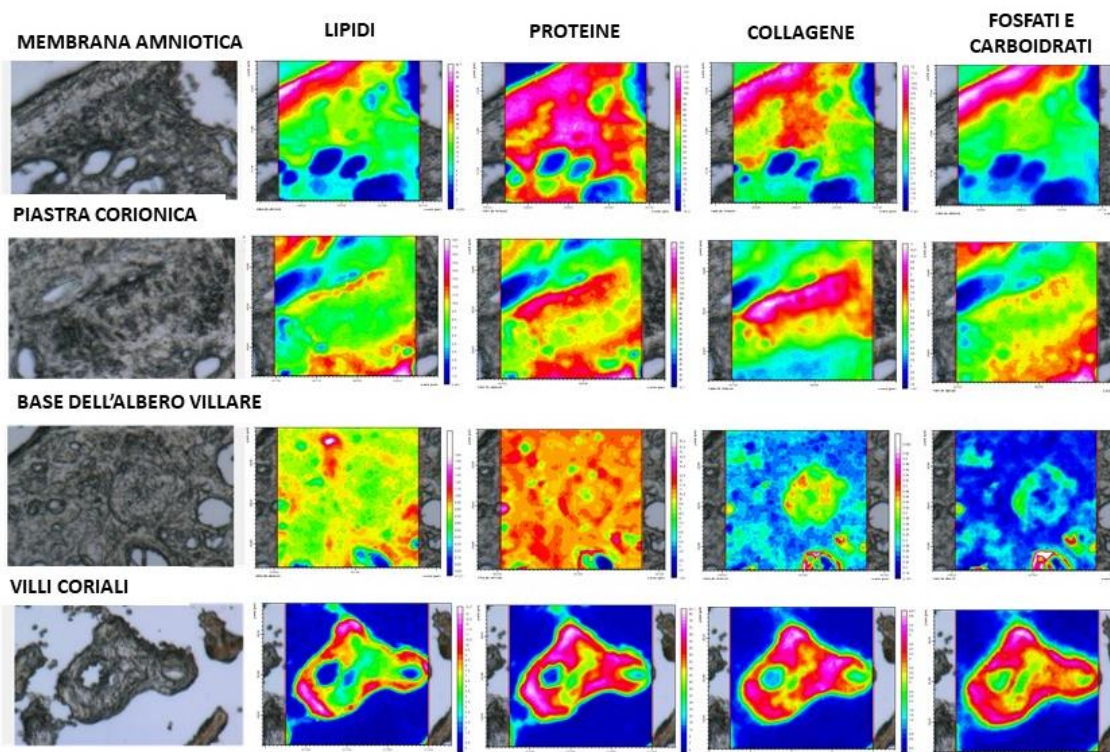


Fig 19 Analisi FTIRI di sezione di placenta (porzione fetale). Microfotografie di aree rappresentative della membrana amniotica, piastra corionica, base dell'albero villare e villi coriali, e corrispondenti immagini a falsi colori rappresentanti la distribuzione topografica di lipidi, proteine, collagene, fosfati e carboidrati.

Infine, in fig. 20 è riportata l'analisi imaging di un'area della porzione fetale contenente globuli rossi, composti principalmente da componente proteica.

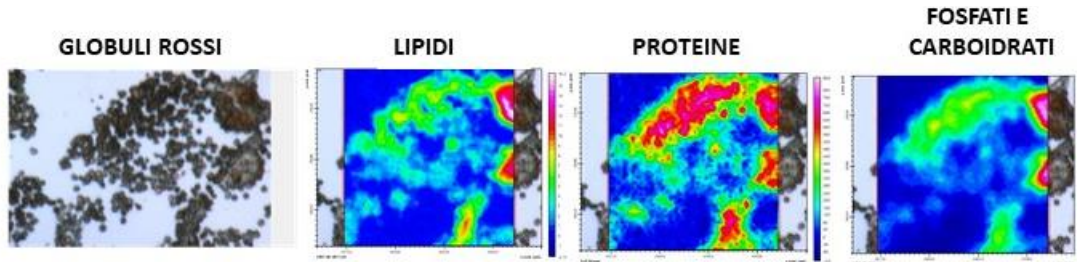
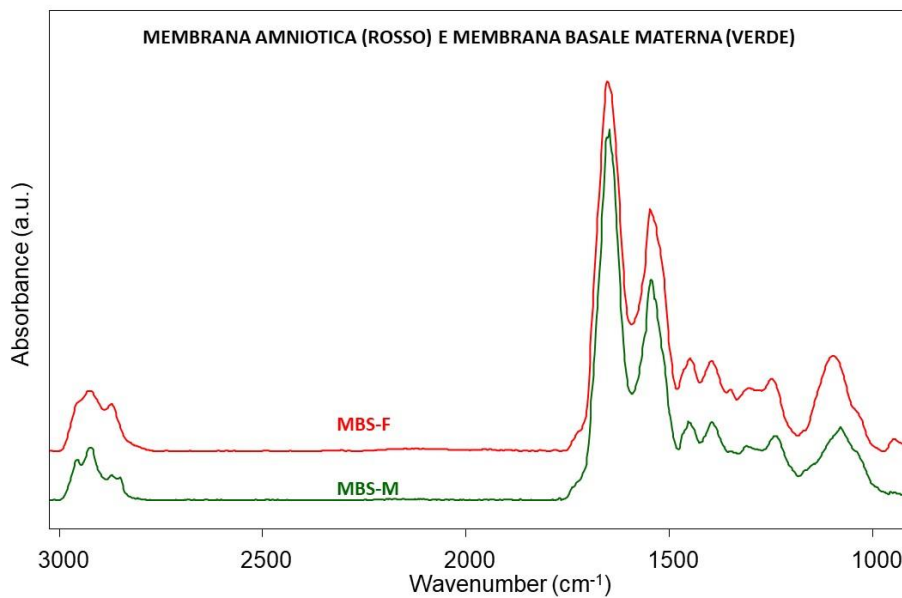


Fig 20 Analisi FTIRI di un'area della porzione fetale contenente globuli rossi. Microfotografia e corrispondenti immagini a falsi colori rappresentanti la distribuzione topografica di lipidi, proteine, collagene, fosfati e carboidrati.

In Fig. 21a sono riportati gli spettri medi della membrana amniotica fetale e della membrana basale materna. Le principali bande IR di assorbimento sono elencate in Tabella 1, insieme con il relativo modo vibrazionale e il significato biochimico.



MEMBRANA AMNIOTICA (ROSSA) E MEMBRANA BASALE MATERNA (VERDE)

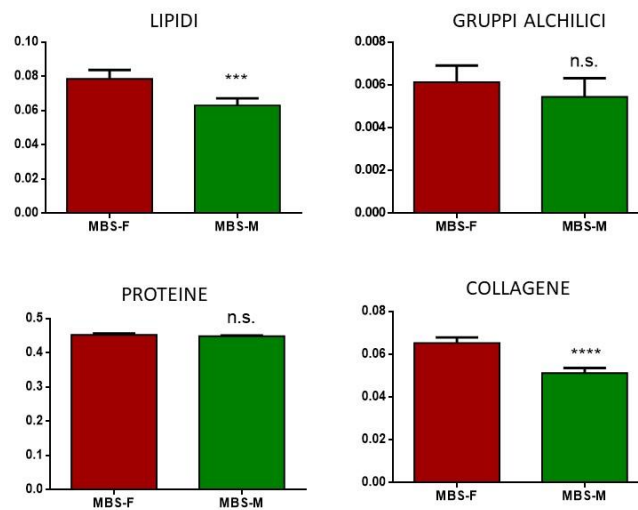


Fig. 21. (A) Spettri medi rappresentativi e (B) composizione macromolecolare della membrana amniotica (lato fetale) e della membrana basale (lato materno). Asterischi=differenze statisticamente significative fra la porzione di placenta fetale e la porzione di placenta materna ($p < 0,05$); n.s.=differenze statisticamente non significative ($p > 0,05$).

<i>Tabella 1. Principali bande IR di assorbimento rilevate negli spettri medi.</i>	
Numeri d'onda (cm⁻¹)	Modo vibrazionale e significato biochimico
2962, 2866	Stretching asimmetrico e simmetrico dei gruppi CH ₃ (catene alchiliche dei lipidi)
2925, 2853	Stretching asimmetrico e simmetrico dei gruppi CH ₂ (catene alchiliche dei lipidi)
1650, 1540	Ammide I e II delle proteine
1460	Bending dei gruppi CH ₂ (catene alchiliche dei lipidi)
1400	Stretching del gruppo COO degli amino acidi
1340, 1315, 1280, 1240, 1205	Modi vibrazionali del collagene
1171	Stretching dei gruppi C-O- in composti glicosilati
1087	Stretching simmetrico dei gruppi fosfato
1058	Stretching dei gruppi C-OH nei carboidrati

L'analisi statistica riportata in Fig. 21b permette di affermare che la membrana amniotica fetale e la membrana basale materna hanno diversa composizione macromolecolare in termini di lipidi e proteine. In particolare, nella membrana amniotica fetale si osserva un maggior contenuto di lipidi totali (LIPIDI, $p < 0.001$) e di gruppi alchilici, anche se non statisticamente significativo (GRUPPI ALCHILICI, $p > 0.05$); per quanto riguarda il contenuto proteico, le due membrane presentano lo stesso contenuto in termini di proteine totali (PROTEINE, $p > 0.05$), ma diverso contenuto in collagene, maggiore nella membrana amniotica (COLLAGENE, $p < 0.0001$).

In Fig. 22a sono riportati gli spettri medi della piastra corionica fetale e della decidua basale della porzione materna. Le principali bande IR di assorbimento sono elencate in Tabella 1, insieme con il relativo modo vibrazionale e il significato biochimico.

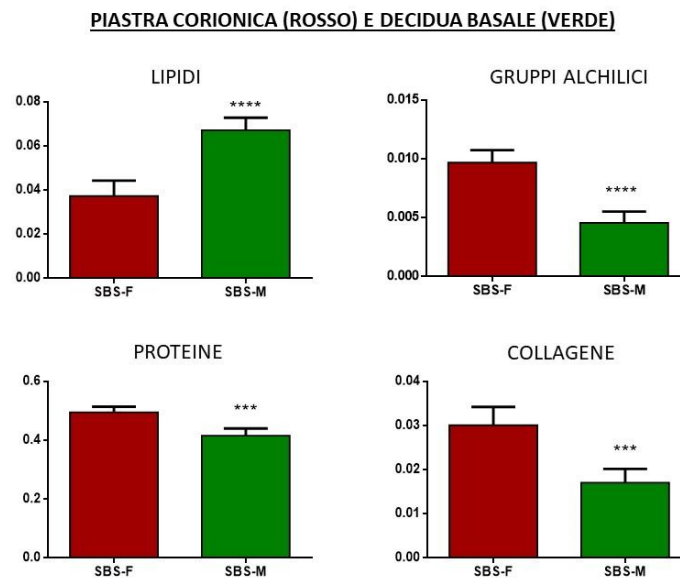
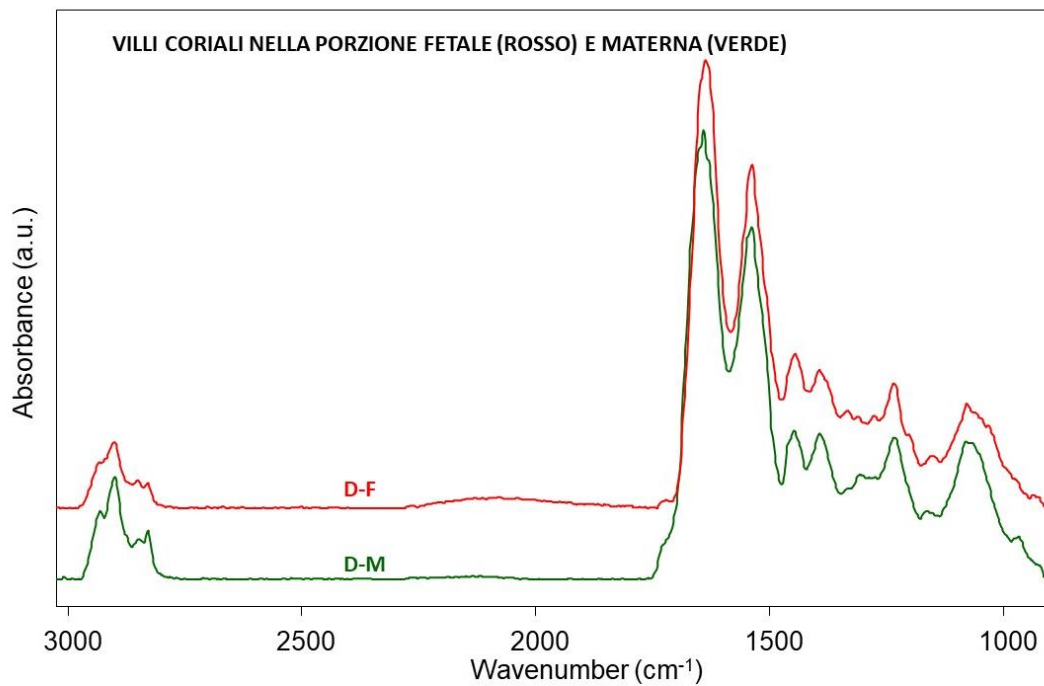


Fig. 22. (A) Spettri medi rappresentativi e (B) composizione macromolecolare della piastra corionica (lato fetale) e della decidua basale (lato materno). Asterischi=differenze statisticamente significative fra la porzione di placenta fetale e la porzione di placenta materna ($p < 0,05$); n.s.=differenze statisticamente non significative ($p > 0,05$).

Anche in questo caso si può osservare una diversa composizione macromolecolare in termini di lipidi e proteine fra la piastra corionica (lato

fetale) e la decidua basale (lato materno) (Fig. 22b). In particolare, rispetto alla decidua basale, la piastra corionica fetale presenta una minore quantità di lipidi totali (LIPIDI, $p < 0.0001$), con prevalenza di lipidi a catena lunga (GRUPPI ALCHILICI, $p < 0.0001$), e un maggior contenuto di proteine totali (PROTEINE, $p < 0.001$) e di collagene (COLLAGENE, $p < 0.001$).

Infine, in Fig. 23a sono riportati gli spettri medi dei villi coriali presenti nel lato materno e fetale. Le principali bande IR di assorbimento sono elencate in Tabella 1, insieme con il relativo modo vibrazionale e il significato biochimico. Per quanto riguarda la composizione macromolecolare, i villi coriali presenti nel lato fetale, hanno un maggior contenuto di collagene (COLLAGENE, $p < 0.0001$), mentre nessuna differenza si osserva fra i villi nel lato materno e fetale in termini di lipidi totali (LIPIDI, $p > 0.05$) e proteine totali (PROTEINE, $p > 0.05$).



VILLI CORIALI NELLA PORZIONE FETALE (ROSSO) E MATERNA (VERDE)

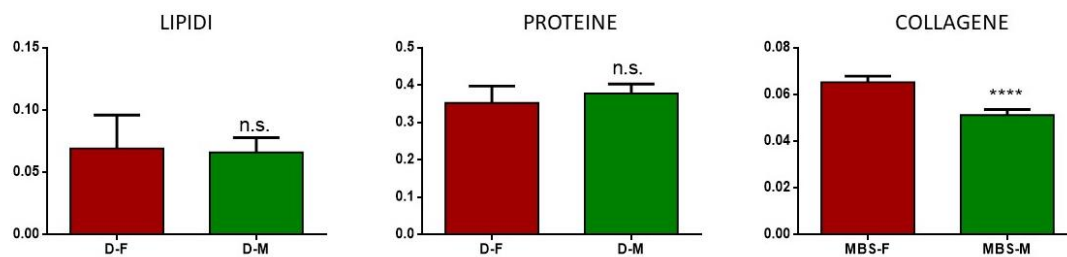


Fig. 23. (A) Spettri medi rappresentativi e (B) composizione macromolecolare dei villi coriali nel lato fetale e materno. Asterischi=differenze statisticamente significative fra la porzione di placenta fetale e la porzione di placenta materna ($p < 0,05$); n.s= differenze statisticamente non significative ($p > 0,05$).

4.4 Identificazione e caratterizzazione di microplastiche in placenta umana

Nella seconda parte del lavoro di tesi, è stata verificata la presenza di microplastiche in porzioni di placenta umana prelevate da pazienti con parto naturale a termine. A tale proposito, da ciascuna placenta sono state prelevate tre porzioni dal lato materno, dal lato fetale e dalle membrane corioamniotiche. Tutte le porzioni sono state opportunamente processate e analizzate mediante Microspettroscopia Raman.

In totale, sono stati rilevati 12 frammenti di microplastiche (MP) (denominati #1–#12) nelle placente di quattro pazienti; più in dettaglio, 5 MP sono state trovate nelle porzioni fetali, 4 nelle porzioni materne e 3 nelle membrane corioamniotiche. Tutte le microplastiche individuate avevano dimensioni di ~ 10 μm , ad eccezione della #5 e la #8 che avevano dimensioni più piccole (~ 5 μm). Tutti le MP che sono state analizzate erano pigmentate; in particolare, per quanto riguarda le particelle #2, #10 e #11 è stato possibile identificare la matrice polimerica che è risultata essere polipropilene, mentre nel caso delle particelle #1, #3-#9 e #12 è stato possibile identificare solo i pigmenti usati per rivestimenti, pitture e coloranti (Imhof, H. K., et al., 2016).

Le microfotografie e gli spettri Raman di tutti le particelle rinvenute nelle porzioni di placenta umana analizzate sono riportati in Fig. 24.

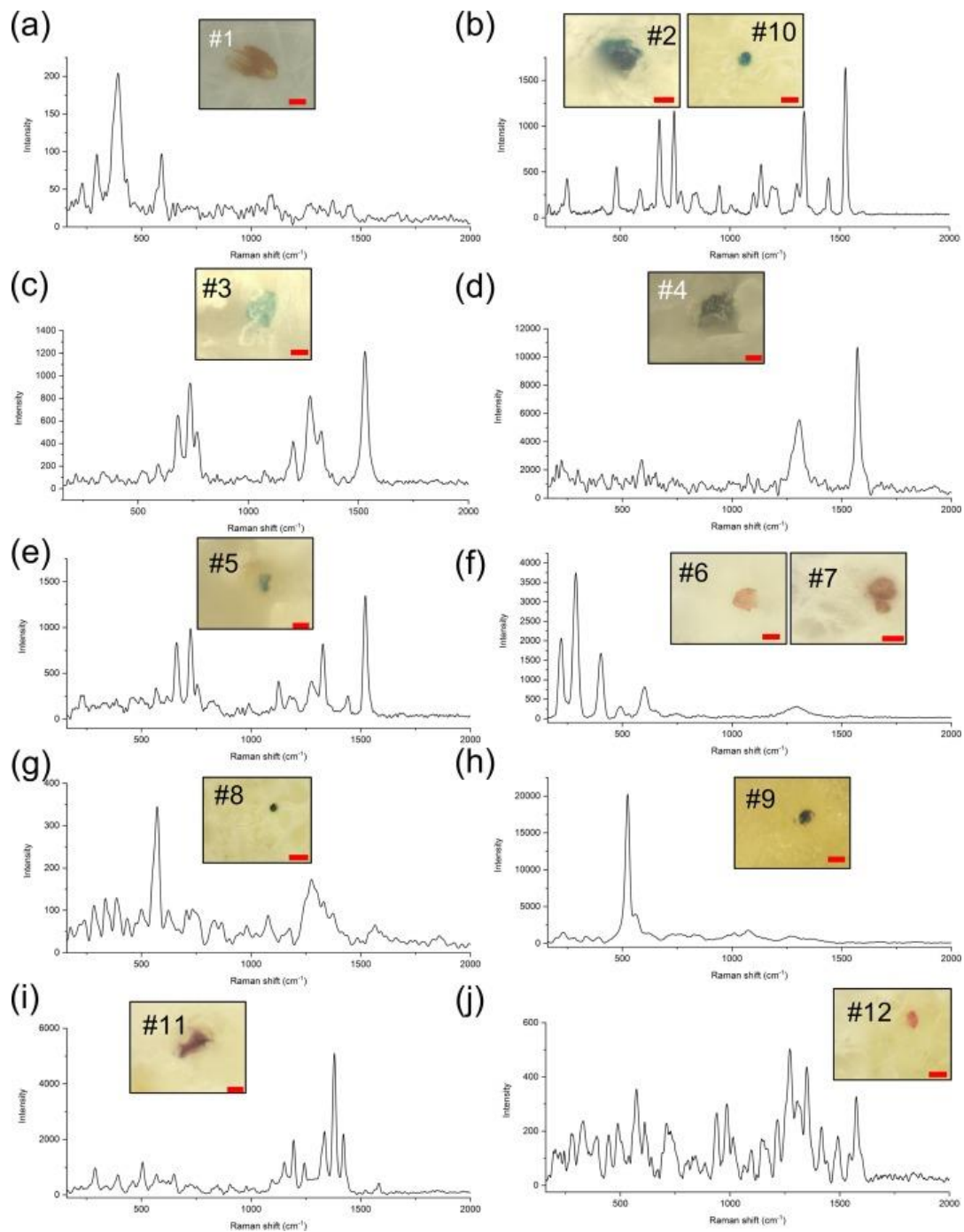


Fig. 24. Microfotografie e spettri Raman delle microplastiche rinvenute nelle porzioni di placenta umana analizzate: (a) MP # 1 (scala: 5 μm); (b) MP # 2 e # 10 (scala: 5 μm per # 2 e 10 μm per # 10); (c) MP #3 (scala: 5 μm); (d) MP #4 (scala: 5 μm); (e) MP #5 (scala: 5 μm); (f) MP #6 e #7 (scala: 10 μm per #6

e 5 μm per #7); (g) MP #8 (scala: 10 μm); (h) MP #9 (scala: 10 μm); (i) MP #11 (scala: 5 μm) e (l) MP #12 (scala: 10 μm). (Ragusa et al., 2021)

Di seguito è riportata l'analisi spettrale di tutte le particelle.

Particella #1 (Fig. 24a). Lo spettro Raman è risultato sovrapponibile a quello del pigmento *Iron Hydroxide Oxide Yellow* (picco principale a 396 cm^{-1} , relativo alle vibrazioni degli ossidi/idrossidi di ferro) (Sklute, E. C., et al., 2018).

Particelle #2, #5 e #10 (Fig. 24b,e). Gli spettri Raman sono risultati paragonabili a quelli di un campione di *Blu di Polipropilene* (PP). Negli spettri delle MP sono stati trovati i picchi principali del PP (253 cm^{-1} e 397 cm^{-1} , bending dei gruppi CH_2 e CH ; 839 cm^{-1} , bending dei gruppi CH_2 e CH_3 , e stretching dei legami CC e C-CH_3 ; 970 cm^{-1} , bending dei gruppi CH_3 ; 1455 cm^{-1} , bending dei gruppi CH_3 e CH_2) (Andreassen, E., 1999). Sono state trovati inoltre picchi a 679 cm^{-1} , 1143 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} e 1527 cm^{-1} , attribuibili al *Blu di Polipropilene*, comunemente correlate con i segnali Raman dei pigmenti blu, di solito costituiti da *Ftalocianina di Rame* (Aguayo, T., et al., 2010, Scherrer, N. C., et al., 2009).

Particella #3 (Fig. 24c). Lo spettro Raman è risultato sovrapponibile a quello del pigmento *Blu Ftalocianina* (picchi principali a 679 cm^{-1} , 1143 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} e 1527 cm^{-1}) (Aguayo, T., et al., 2010; Scherrer, N. C., et al., 2009).

Particella #4 (Fig. 24d). Lo spettro Raman è risultato sovrapponibile a quello del pigmento *Violantrone* (picchi principali a 1577 cm^{-1} , stretching dei legami CC dell'anello benzenico, e 1307 cm^{-1} (stretching dei legami CC e bending dei legami HC-C) (Socrates, 2001).

Particelle #6 e #7 (Fig. 24f). Gli spettri Raman sono risultati sovrapponibili a quello del pigmento *Red Oxo(Oxoferriooxy)Iron* (picchi principali a 220 cm^{-1} , 287 cm^{-1} e 401 cm^{-1} , tipici degli ossidi di ferro) (Testa-Anta, M., et al., 2019).

Particella #8 (Fig. 24g). Lo spettro Raman è risultato sovrapponibile a quello del pigmento *Direct Blue 80* (picchi principali a 578 cm^{-1} e 1275 cm^{-1} (entrambi assegnati a deformazioni d'anello del benzene sostituito) (Socrate, 2001).

Particella #9 (Fig. 24h). Lo spettro Raman è risultato sovrapponibile a quello del pigmento *Ultramarine Blue* (picco principale a 525 cm^{-1} , assegnato ai modi di vibrazione dell'ortosilicato) (Socrates, 2001).

Particella #11 (Fig. 24i). Lo spettro Raman è risultato paragonabile a quello di una fibra viola di Polipropilene PP (Andreassen, E., 1999) (397 cm^{-1} , bending dei gruppi CH_2 e CH , e 1455 cm^{-1} , bending dei gruppi CH_3 e CH_2). Nello spettro sono presenti anche dei picchi attribuibili al pigmento *Viola* (1193 cm^{-1} , 1335 cm^{-1} e 1381 cm^{-1}) (Scherrer, N.C., et al., 2009).

Particella #12 (Fig. 24j). Lo spettro Raman è risultato sovrapponibile a quello del pigmento *Rosa Novoperm Bordeaux HF3R* (picchi principali a 731 cm^{-1} ,

961 cm^{-1} , 1219 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} e 1580 cm^{-1}), usato per rivestire e proteggere in modo permanente le superfici in legno, in prodotti chimici fotografici, inchiostri e toner (Scherrer, N.C et al., 2009).

5. DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi sono stati complessivamente analizzati 10 campioni di placenta umana provenienti da donne sane e con parti avvenuti a termine gravidanza. Di ogni campione è stato analizzato sia il lato materno che quello fetale al fine di fornire una descrizione accurata della morfologia sotto il profilo istologico. L'FTIR imaging è stato adottato come approccio innovativo al fine di ottenere informazioni dettagliate sulla composizione macromolecolare delle diverse componenti placentari. Inoltre, l'analisi semiquantitativa ottenuta dallo studio degli spettri ricavati mediante FTIRI ha permesso di mettere in evidenza differenze in termini di abbondanza relativa di lipidi, gruppi alchilici, proteine e collagene fra il lato materno e fetale delle porzioni di placenta analizzate. Un risultato interessante e di grande rilievo è infine emerso dall'analisi di microspettroscopia Raman, la quale ha permesso di evidenziare la presenza di microplastiche a livello di diverse porzioni di placenta.

Le sezioni istologiche analizzate hanno mostrato come sia la componente materna che quella fetale della placenta siano caratterizzate da sottili membrane di natura connettivale. Sul lato materno, è possibile osservare una membrana basale materna che costituisce la struttura di adesione con la parete uterina, mentre sulla faccia fetale la membrana amniotica costituisce il limite fisico che delimita la cavità amniotica dalla struttura placentale. La membrana amniotica

rappresenta un annesso embrionale, chiamato anche amnios o sacco amniotico, e racchiude la cavità amniotica contenente il liquido amniotico. Durante lo sviluppo embrionale, l'allargamento della cavità amniotica fa sì che la membrana amniotica venga a contatto con il corion portando alla formazione della membrana amnio-corionica, che è la membrana della placenta umana direttamente rivolta verso l'embrione/feto. (Silini, A.R., et al., 2020). Allo stesso tempo, la membrana amniotica rappresenta lo strato più prossimo al feto essendo adesa al mesenchima della placca corionica da cui i villi corionici raggiungono lo spazio intervilloso (Furuya, M., et al., 2008).

Lo studio istologico della intera struttura placentale ha permesso di distinguere le diverse strutture costituenti la porzione di scambio dell'organo stesso e che risultano isolate dall'ambiente extra placentale grazie alle suddette membrane (basale, decidua e amniotica).

Muovendosi dalla faccia materna, il primo tessuto ad essere riscontrato è costituito dalla decidua basale, la quale è adibita alla modulazione dello scambio delle risorse trofiche fra la madre ed il feto. Questi scambi fondamentali per lo sviluppo fetale avvengono grazie ad una fitta rete di capillari che originano proprio a livello della decidua basale dove si innestano vene ed arterie endometriali provenienti dal circolo ematico materno (Benirschke, K., et al., 2012). Come osservato dalle immagini microscopiche

ottenute nel presente lavoro, dalla decidua basale dipartono sepimenti connettivali che prendono il nome di setti deciduali. Questi setti deciduali si intercalano tra i villi e unendosi tra di loro formano i cotiledoni materni (Silini, A.R., et al., 2020).

Inoltre, i setti deciduali delimitano spazi colmi di sangue materno che prendono il nome di spazi intervillosi e dove è possibile osservare le terminazioni dei villi corionici che si dipartono dalla porzione fetale e grazie ai quali avvengono gli scambi di sostanze tra madre e feto. La fitta arborizzazione dei villi corionici è alla base della estrema efficienza di scambio che avviene a questo livello. Infatti, è stato stimato che, a termine gravidanza, la superficie totale di scambio dell'epitelio corionico può raggiungere $\sim 12-14 \text{ m}^2$ (Burton, G.J., et al., 2015). Le immagini ad alto ingrandimento e risoluzione ottenuti durante il presente studio hanno permesso di evidenziare in maniera apprezzabile come le terminazioni dei villi corionici, i quali costituiscono la porzione più estesa della faccia fetale della placenta, siano ricoperti da sincizio-trofoblasto che entra in diretto contatto con il sangue materno. A causa della sua posizione, il sincizio-trofoblasto è coinvolto in molte delle funzioni della placenta, come la sintesi e la secrezione di grandi quantità di ormoni steroidei. (Burton, G.J, et al., 2015).

In questo lavoro l'analisi istologica è stata di fondamentale supporto all'applicazione dell'approccio spettroscopico innovativo, rappresentato dall'FTIRI.

L'FTIR rappresenta una tecnica spettroscopica già adottata in diversi campi delle scienze dei materiali (Nandiyanto, A.B.D., et al., 2019; Mylläri, V., et al., 2015) e recentemente adottata per analizzare matrici biologiche (Conti, C., et al., 2009; Sulé-Suso, J., et al., 2005; Wang, J.S., et al., 2003; Conti C., et al., 2008; Tosi, G., et al., 2010; Gazi, E., et al., 2010; Notarstefano, V., et al., 2019; Carnevali, O., et al., 2019). Nel caso del presente lavoro di tesi l'FTIR ha fornito importanti informazioni riguardo la distribuzione delle macromolecole analizzate e la loro abbondanza relativa nelle diverse porzioni di placenta studiate.

In particolare, confrontando le membrane presenti nel lato fetale e materno è stato possibile evidenziare come le due membrane presentino lo stesso contenuto in termini di proteine totali. Infatti, la membrana amniotica della porzione fetale, contiene molte proteine strutturali e fattori di crescita (Dadkhah Tehrani, F., et al., 2012), possedendo quindi proprietà e struttura interessanti che hanno anche portato alla scelta di questo annesso embrionale per lo sviluppo di applicazioni mediche, come ad esempio per applicazione in

oftalmologia (Ehredt Jr, D. J., et al., 2020), ustioni cutanee (Hossain, M. L., et al., 2020).

Per uno studio più approfondito sono state confrontate anche la piastra corionica della porzione fetale e la decidua basale della porzione materna. Dai risultati ottenuti si evincono differenze nel contenuto macromolecolare tra queste due porzioni, osservando una presenza maggiore di lipidi e proteine nella zona materna rispetto a quella fetale, giustificata dal fatto che durante la gravidanza si ha un accumulo di lipidi tale da consentire la formazione di una riserva di nutrienti, derivante dalla dieta e dal metabolismo materno, che sostenga un'adeguata crescita fetale (Herrera, E., et al., 2006). Allo stesso tempo, anche l'apporto proteico è importante per un corretto sviluppo fetale, infatti, una diminuzione del contenuto di queste macromolecole è stata riscontrata dall'analisi spettrale di placenti di madri affette da pre-eclampsia (Dahabiyeh, L.A., et al., 2020).

Dalla porzione fetale della placenta dipartono i villi coriali i quali condividono la stessa struttura morfologica generale possedendo un *core* di cellule mesenchimali derivate dal mesoderma extra-embryonale all'esterno del quale il sincizio trofoblastico costituisce il rivestimento e l'interfaccia assorbente.

Tramite analisi spettrale dei villi coriali è stato possibile caratterizzare la composizione della matrice extracellulare e dell'albero villare,

prevalentemente composta da collagene come anche dimostrato dall'analisi istologica ottenuta mediante colorazione Masson tricromica e in accordo con quanto precedentemente osservato da (Silini, A.R., et al.,2020), riflettendo la funzione biologica di queste strutture che sono atte al sostegno dei capillari che vi sono contenuti.

Oltre alla caratterizzazione istologica e macromolecolare della porzione materna e fetale della placenta, la microspettroscopia Raman è stata adottata al fine di individuare la presenza di microplastiche nell'ambito del tessuto placentare. Tale approccio del tutto innovativo è stato applicato grazie al microspettrometro Raman XploRA Nano (Horiba Scientific) presente presso il Laboratorio di Spettroscopia Vibrazionale, Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche (Ancona, Italia).

Anche se non è ancora ben nota la principale via d'ingresso, è stato ipotizzato che il raggiungimento di queste MP a livello placentare sia stato possibile attraverso il trasporto per via ematica (Ragusa, A., et al., 2021).

Le microplastiche, infatti, possono accedere al flusso sanguigno e raggiungere la placenta dal sistema respiratorio materno (Schlesinger, R.B. 1988) e dal tratto gastrointestinale. (Arumugasaamy, N., et al., 2019), mediante meccanismi di endocitosi mediati da cellule M o trasporto paracellulare.

Inoltre, il passaggio di MP a livello placentare può dipendere da diverse condizioni fisiologiche. Questo potrebbe spiegare, insieme alle diverse abitudini alimentari e stile di vita dei pazienti, l'assenza di MP in 2 delle 6 placentate analizzate.

Le MP possono alterare diverse vie di regolazione cellulare nella placenta, come i meccanismi immunitari durante la gravidanza, la segnalazione del fattore di crescita durante e dopo l'impianto, le funzioni dei recettori atipici delle chemochine che regolano la comunicazione materno-fetale, la segnalazione tra l'embrione e l'utero e il traffico di cellule dendritiche uterine, cellule natural killer, cellule T e macrofagi durante la gravidanza normale (Du, M. R., et al., 2014). Tutti questi effetti possono provocare l'insorgenza di patologie come pre-eclampsia e restrizione della crescita fetale (Ilekis et al., 2016).

6. CONCLUSIONI

Lo studio della placenta è estremamente affascinante per l'enorme importanza delle funzioni che essa svolge. In particolare, l'analisi di campioni di placenta umana tramite caratterizzazione istologica e determinazione della composizione macromolecolare, ha permesso una maggiore comprensione della struttura di questo organo. Inoltre, l'utilizzo della microspettroscopia Raman ha evidenziato la presenza di microplastiche a livello placentare. La natura ubiquitaria delle microplastiche nell'ambiente e nei prodotti di consumo porta all'inevitabile esposizione umana a queste particelle costituendo un pericolo per la salute e l'ambiente. La presenza di queste particelle a livello placentare, pone un rischio per lo sviluppo fetale, in quanto la presenza di microplastiche può alterare diverse vie di regolazione nella placenta che a loro volta potrebbero causare complicazioni durante la gravidanza. Per via delle loro dimensioni nell'ordine dei 5-10 μ m, le MP sono compatibili con un potenziale trasporto nei vasi sanguigni, permettendogli di raggiungere anche organi un tempo ritenuti non accessibili, come la placenta. Questo studio dimostra come questo organo possa essere quindi utilizzato nel valutare l'avvenuta esposizione a microplastiche e contaminanti, permettendo di studiarne gli effetti e le conseguenze sullo sviluppo embrionale.

7. BIBLIOGRAFIA

Aguayo, T., Clavijo, E., Villagrán, A., Espinosa, F., Sagüés, F. E., & CAMPOS-VALLETTE, M. (2010). Raman vibrational study of pigments with patrimonial interest for the Chilean cultural heritage. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 55(3), 347-351.

Anbumani, S., & Kakkar, P. (2018). Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(15), 14373-14396.

Andreassen, E. (1999). Infrared and Raman spectroscopy of polypropylene. In *Polypropylene* (pp. 320-328). Springer, Dordrecht.

Aplin, J. D. (2000). The cell biological basis of human implantation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 14(5), 757-764.

Arshad, M., & Rehman, F. U. (2015). Histoarchitectural study of chorionic villi in 1st & 2nd trimester placentas. *Journal of the Anatomical Society of India*, 64(2), 141-144.

Arumugasaamy, N., Navarro, J., Leach, J. K., Kim, P. C., & Fisher, J. P. (2019). In vitro models for studying transport across epithelial tissue barriers. *Annals of biomedical engineering*, 47(1), 1-21.

Atkins, P., & De Paula, J. (2006). *Atkins' Physical chemistry* 8th edition.

- Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment international*, *102*, 165-176.
- Avagliano, L., Massa, V., & Bulfamante, G. P. (2016). Histology of Human Placenta.
- Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*, *364*(1526), 1985-1998.
- Bejgarn, S., MacLeod, M., Bogdal, C., & Breitholtz, M. (2015). Toxicity of leachate from weathering plastics: An exploratory screening study with *Nitocra spinipes*. *Chemosphere*, *132*, 114-119.
- Benirschke, K., & Driscoll, S. G. (1967). The pathology of the human placenta. In *Placenta* (pp. 97-571). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Burton, G. J., & Fowden, A. L. (2015). The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *370*(1663), 20140066.
- Carnevali, O., Benedetti, M., Beolchini, F., Dell'Anno, A., Fattorini, D., Gorbi, S., ... & Regoli, F. (2020). New Insights for Early Warning and

Countermeasures to Aquatic Pollution. *The First Outstanding 50 Years of "Università Politecnica delle Marche"*, 431-445

Carnevali, O., Candelma, M., Sagrati, A., Pignalosa, P., Giorgini, E., & Gioacchini, G. (2019). Macromolecular characterization of swordfish oocytes by FTIR imaging spectroscopy. *Scientific reports*, 9(1), 1-9.

Carrasco-Wong, I., Moller, A., Giachini, F. R., Lima, V. V., Toledo, F., Stojanova, J., ... & San Martín, S. (2020). Placental structure in gestational diabetes mellitus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(2), 165535.

Carter, A. M. (2001). Evolution of the placenta and fetal membranes seen in the light of molecular phylogenetics. *Placenta*, 22(10), 800-807.

Carter, A. M., Enders, A. C., & Pijnenborg, R. (2015). The role of invasive trophoblast in implantation and placentation of primates. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1663), 20140070.

Chiappe C, D'Andrea F, tecniche spettroscopiche. ETS 2003

Conti, C., Ferraris, P., Giorgini, E., Rubini, C., Sabbatini, S., Tosi, G., ... & Valavanis, C. (2008). FT-IR microimaging spectroscopy: A comparison

between healthy and neoplastic human colon tissues. *Journal of Molecular Structure*, 881(1-3), 46-51.

Dadkhah Tehrani, F., Firouzeh, A., Shabani, I., & Shabani, A. (2021). A review on modifications of amniotic membrane for biomedical applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1444.

Dahabiyeh, L. A., Mansour, R. S., Saleh, S. S., & Kamel, G. (2020). Investigating the molecular structure of placenta and plasma in pre-eclampsia by infrared microspectroscopy. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 184, 113186.

de Souza Machado, A. A., Kloas, W., Zarfl, C., Hempel, S., & Rillig, M. C. (2018). Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems. *Global change biology*, 24(4), 1405-1416.

Demir, R., Kaufmann, P., Castellucci, M., Erbenli, T., & Kotowski, A. (1989). Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Cells Tissues Organs*, 136(3), 190-203.

Du, M. R., Wang, S. C., & Li, D. J. (2014). The integrative roles of chemokines at the maternal-fetal interface in early pregnancy. *Cellular & molecular immunology*, 11(5), 438–448. <https://doi.org/10.1038/Dukor>, Rina K.

"Vibrational spectroscopy in the detection of cancer." *Handbook of vibrational spectroscopy* (2006).

Ehredt Jr, D. J., Zulauf, E. E., min Kim, H., & Connors, J. (2020). Cryopreserved amniotic membrane and autogenous adipose tissue as an interpositional spacer after resection of a cubonavicular coalition: a case report and review of the literature. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 59(1), 173-177.

Evangelista, M., Soncini, M., & Parolini, O. (2008). Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy?. *Cytotechnology*, 58(1), 33-42.

Fornier-Piquer, I., Mylonas, C. C., Calduch-Giner, J., Maradonna, F., Gioacchini, G., Allarà, M., ... & Carnevali, O. (2018). Endocrine disruptors in the diet of male *Sparus aurata*: Modulation of the endocannabinoid system at the hepatic and central level by Di-isononyl phthalate and Bisphenol A. *Environment international*, 119, 54-65.

Fowden, A. L., Sferruzzi-Perri, A. N., Coan, P. M., Constancia, M., & Burton, G. J. (2009). Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. *The Journal of physiology*, 587(14), 3459-3472.

Furuya, M., Ishida, J., Aoki, I., & Fukamizu, A. (2008). Pathophysiology of placentation abnormalities in pregnancy-induced hypertension. *Vascular health and risk management*, 4(6), 1301.

Garrigós, M. C., Marin, M. L., Canto, A., & Sánchez, A. (2004). Determination of residual styrene monomer in polystyrene granules by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1061(2), 211-216.

Gazi, E., Dwyer, J., Lockyer, N., Gardner, P., Vickerman, J. C., Miyan, J., ... & Clarke, N. (2004). The combined application of FTIR microspectroscopy and ToF-SIMS imaging in the study of prostate cancer. *Faraday Discussions*, 126, 41-59.

Giorgini E., analisi strutturale di composti organici e biologici, UNIVPM, 2016

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.

Hammer, J., Kraak, M. H., & Parsons, J. R. (2012). Plastics in the marine environment: the dark side of a modern gift. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 1-44.

Heraud, P., & Tobin, M. J. (2009). The emergence of biospectroscopy in stem cell research. *Stem cell research*, 3(1), 12-14.

Herrick EJ, Bordoni B. Embryology, Placenta. 2021 May 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 31869098.

Hossain, M. L., Rahman, M. A., Siddika, A., Adnan, M. H., Rahman, H., Diba, F., ... & Asaduzzaman, S. M. (2020). Burn and wound healing using radiation sterilized human amniotic membrane and centella asiatica derived gel: A review. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 6(3), 347-357.

Huppertz, B. (2008). The anatomy of the normal placenta. *Journal of clinical pathology*, 61(12), 1296-1302.

Ibrahim, N. A., & Khaled, D. M. (2014). Histological and immunohistochemical study on human placental tissue in normal pregnancy and preeclampsia. *Cell Biology*, 2(6), 72.

Imhof, H. K., Laforsch, C., Wiesheu, A. C., Schmid, J., Anger, P. M., Niessner, R., & Ivleva, N. P. (2016). Pigments and plastic in limnetic ecosystems: A qualitative and quantitative study on microparticles of different size classes. *Water research*, 98, 64-74.

Karbalaei, S., Hanachi, P., Walker, T. R., & Cole, M. (2018). Occurrence, sources, human health impacts and mitigation of microplastic

pollution. *Environmental science and pollution research*, 25(36), 36046-36063.

Kaufmann, P., Luckhardt, M., Schweikhart, G., & Cantele, S. J. (1987). Cross-sectional features and three-dimensional structure of human placental villi. *Placenta*, 8(3), 235-247.

Kaufmann, P., Sen, D. K., & Schweikhart, G. (1979). Classification of human placental villi. *Cell and tissue research*, 200(3), 409-423.

Kendall, C., Isabelle, M., Bazant-Hegemark, F., Hutchings, J., Orr, L., Babrah, J., ... & Stone, N. (2009). Vibrational spectroscopy: a clinical tool for cancer diagnostics. *Analyst*, 134(6), 1029-1045.

Knöfler, M., Haider, S., Saleh, L., Pollheimer, J., Gamage, T. K., & James, J. (2019). Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(18), 3479-3496.

Liebezeit, G., & Liebezeit, E. (2013). Non-pollen particulates in honey and sugar. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(12), 2136-2140.

Liu, K. Z., Shi, M. H., & Mantsch, H. H. (2005). Molecular and chemical characterization of blood cells by infrared spectroscopy: a new optical tool in hematology. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(3), 404-412.

Mettang, T., Thomas, S., Kiefer, T., Fischer, F. P., Kuhlmann, U., Wodarz, R., & Retternmeier, A. W. (1996). Uraemic pruritus and exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *11*(12), 2439-2443.

Miller, L. M., & Smith, R. J. (2005). Synchrotrons versus globars, point-detectors versus focal plane arrays: Selecting the best source and detector for specific infrared microspectroscopy and imaging applications. *Vibrational spectroscopy*, *38*(1-2), 237-240.

Mylläri, V., Ruoko, T. P., & Syrjälä, S. (2015). A comparison of rheology and FTIR in the study of polypropylene and polystyrene photodegradation. *Journal of Applied Polymer Science*, *132*(28).

Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019). How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. *Indonesian Journal of Science and Technology*, *4*(1), 97-118.

Neves, D., Sobral, P., Ferreira, J. L., & Pereira, T. (2015). Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast. *Marine pollution bulletin*, *101*(1), 119-126.

Norwitz, E. R., Schust, D. J., & Fisher, S. J. (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *New England Journal of Medicine*, *345*(19), 1400-1408.

Notarstefano, V., Gioacchini, G., Byrne, H. J., Zaca, C., Sereni, E., Vaccari, L., ... & Giorgini, E. (2019). Vibrational characterization of granulosa cells from patients affected by unilateral ovarian endometriosis: New insights from infrared and Raman microspectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *212*, 206-214.

Oßmann, B. E., Sarau, G., Holtmannspötter, H., Pischetsrieder, M., Christiansen, S. H., & Dicke, W. (2018). Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water. *Water research*, *141*, 307-316.

Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G. P., Bilic, G., Bühring, H. J., Evangelista, M., ... & Strom, S. C. (2008). Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem cells*, *26*(2), 300-311.

Pasca, A. M., & Penn, A. A. (2010). The placenta: The lost neuroendocrine organ. *NeoReviews*, *11*(2), e64-e77.

- 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.
- Pötgens, A. J. G., Schmitz, U., Bose, P., Versmold, A., Kaufmann, P., & Frank, H. G. (2002). Mechanisms of syncytial fusion: a review. *Placenta*, *23*, S107-S113.
- Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2020). Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Science of the Total Environment*, *702*, 134455.
- Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., ... & Giorgini, E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment international*, *146*, 106274.
- Rahman, A., Sarkar, A., Yadav, O. P., Achari, G., & Slobodnik, J. (2020). Potential human health risks due to environmental exposure to microplastics and knowledge gaps: a scoping review. *Science of The Total Environment*, 143872.
- Resta L., Sara Sblano, Riv. It. Ost. Gin. - Vol. 7 - Dal trofoblasto alla placenta matura: aspetti morfo-funzionali. Dipartimento di Anatomia Patologica Università degli Studi di Bari.

Revel, M., Châtel, A., & Mouneyrac, C. (2018). Micro (nano) plastics: A threat to human health?. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 1, 17-23.

Sandovici, I., Hoelle, K., Angiolini, E., & Constância, M. (2012). Placental adaptations to the maternal–fetal environment: implications for fetal growth and developmental programming. *Reproductive biomedicine online*, 25(1), 68-89.

Santangeli, S., Carnevali, O., Mueller, F., & Hardiman, G. Plastic and environmental safety: the effects of EDCs on metabolism, reproduction and epigenetic processes.

Scherrer, N. C., Stefan, Z., Françoise, D., Annette, F., & Renate, K. (2009). Synthetic organic pigments of the 20th and 21st century relevant to artist's paints: Raman spectra reference collection. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73(3), 505-524.

Schlesinger, R. B. (1998). Biological Disposition of Airborne Particles: Basic Principles and Application to Vehicular Emissions in Air Pollution, the Automobile, and Public Health, ed. AY Watson, RR Bates and D. Kennedy.

Sen, D. K., Kaufmann, P., & Schweikhart, G. (1979). Classification of human placental villi. *Cell and tissue research*, 200(3), 425-434.

Shahul Hamid, F., Bhatti, M. S., Anuar, N., Anuar, N., Mohan, P., & Periathamby, A. (2018). Worldwide distribution and abundance of microplastic: how dire is the situation?. *Waste Management & Research*, 36(10), 873-897.

Sheppard, B. L., & Bonnar, J. (1974). The ultrastructure of the arterial supply of the human placenta in early and late pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 81(7), 497-511.

Sklute, E. C., Kashyap, S., Dyar, M. D., Holden, J. F., Tague, T., Wang, P., & Jaret, S. J. (2018). Spectral and morphological characteristics of synthetic nanophase iron (oxyhydr) oxides. *Physics and chemistry of minerals*, 45(1), 1-26.

Soares, M. J., Varberg, K. M., & Iqbal, K. (2018). Hemochorial placentation: development, function, and adaptations. *Biology of reproduction*, 99(1), 196-211.

Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. John Wiley & Sons.

Staun-Ram, E., & Shalev, E. (2005). Human trophoblast function during the implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 1-12.

- Su, L., Xue, Y., Li, L., Yang, D., Kolandhasamy, P., Li, D., & Shi, H. (2016). Microplastics in taihu lake, China. *Environmental Pollution*, 216, 711-719.
- Sulé-Suso, J., Skingsley, D., Sockalingum, G. D., Kohler, A., Kegelaer, G., Manfait, M., & El Haj, A. J. (2005). FT-IR microspectroscopy as a tool to assess lung cancer cells response to chemotherapy. *Vibrational Spectroscopy*, 38(1-2), 179-184.
- Testa-Anta, M., Ramos-Docampo, M. A., Comesaña-Hermo, M., Rivas-Murias, B., & Salgueiriño, V. (2019). Raman spectroscopy to unravel the magnetic properties of iron oxide nanocrystals for bio-related applications. *Nanoscale Advances*, 1(6), 2086-2103.
- Thompson, R. C. (2006). Plastic debris in the marine environment: consequences and solutions. *Marine nature conservation in Europe*, 193, 107-115.
- Thompson, R. C., Swan, S. H., Moore, C. J., & Vom Saal, F. S. (2009). Our plastic age.
- Tosi, G., Conti, C., Giorgini, E., Ferraris, P., Garavaglia, M. G., Sabbatini, S., ... & Rubini, C. (2010). FTIR microspectroscopy of melanocytic skin lesions: a preliminary study. *Analyst*, 135(12), 3213-3219.

Tourinho, P. S., do Sul, J. A. I., & Fillmann, G. (2010). Is marine debris ingestion still a problem for the coastal marine biota of southern Brazil?. *Marine Pollution Bulletin*, 60(3), 396-401.

Vom Saal, F. S., & Hughes, C. (2005). An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental health perspectives*, 113(8), 926-933.

Wang, J. S., Shi, J. S., Xu, Y. Z., Duan, X. Y., Zhang, L., Wang, J., ... & Wu, J. G. (2003). FT-IR spectroscopic analysis of normal and cancerous tissues of esophagus. *World journal of gastroenterology*, 9(9), 1897.

Wang, J., Tan, Z., Peng, J., Qiu, Q., & Li, M. (2016). The behaviors of microplastics in the marine environment. *Marine Environmental Research*, 113, 7-17.

Wang, Y. (2010, August). Vascular biology of the placenta. In *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function* (Vol. 2, No. 1, pp. 1-98). Morgan & Claypool Life Sciences.