

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Dottorato di Ricerca in  
SCIENZE FISIOPATOLOGICHE, NEUROPSICOBIOLOGICHE  
e ASSISTENZIALI DEL CICLO DELLA VITA - XXIV Ciclo  
Settore scientifico-disciplinare MED/40

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE



ESPRESSIONE DI PROTEINE COINVOLTE NEL  
TRASPORTO PLACENTARE DEL FERRO IN  
GRAVIDANZE NORMALI E PATOLOGICHE

Relatore: Chiar.mo Prof. Roberto Weinstein

Tutor: Chiar.ma Prof.ssa Irene Cetin

Tesi di Dottorato di  
Dott.ssa Maria Antonella Marino  
Matricola R08453

Anno Accademico 2011-2012

ABSTRACT.....	4
<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>7</b>
LA PLACENTA.....	8
<i>Morfologia e funzione.....</i>	8
<i>Concentrazioni di ossigeno intraplacentare durante la gravidanza fisiologica precoce.....</i>	11
<i>Ruolo della placenta nel trasferimento di nutrienti al feto.....</i>	12
LA CRESCITA FETALE.....	14
PATOLOGIE DA INSUFFICIENZA PLACENTARE.....	17
<i>La Pre-eclampsia.....</i>	17
<i>Ruolo della placenta nella Pre-eclampsia.....</i>	19
<i>Pentraxina-3: biomarker endoteliale di Pre-eclampsia.....</i>	22
<i>Il Ritardo di Crescita Intrauterino.....</i>	23
<i>Ruolo della placenta nello IUGR.....</i>	26
MICRONUTRIENTI .....	27
<i>Distribuzione del ferro nell'organismo.....</i>	28
<i>Il ferro negli alimenti e il suo assorbimento.....</i>	29
<i>Ferro: omeostasi in gravidanza e outcomes fetali.....</i>	30
<i>Le fonti alimentari di alcuni micronutrienti essenziali in gravidanza.....</i>	40
<i>Relazione tra nutrizione materna e sviluppo di Pre-eclampsia.....</i>	42
TRASPORTO PLACENTARE DEL FERRO .....	43
<i>Recettore della Transferrina (Tfr1).....</i>	45
<i>Ferroportina.....</i>	47
<i>Caratteristiche funzionali.....</i>	47
<i>Regolazione Genica e Proteica.....</i>	47
<i>Struttura proteica.....</i>	48
<i>Mutazioni aminoacidiche.....</i>	49
FERRO E RITARDO DI CRESCITA INTRAUTERINO.....	50
FERRO E PRE-ECLAMPSIA .....	51
<b>SCOPO DELLO STUDIO .....</b>	<b>54</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>56</b>
STUDIO DI ESPRESSIONE DEL RECETTORE DELLA TRANSFERRINA (TFR1) E DELLA FERROPORTINA (FPN) .....	57
<i>Caratteristiche della popolazione e raccolta dei campioni.....</i>	57
ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DEL RECETTORE DELLA TRANSFERRINA (TFR1) E DELLA FERROPORTINA (FPN).....	61
<i>Espressione genica Recettore della Transferrina e Ferroportina.....</i>	61
<i>Estrazione RNA.....</i>	61
<i>Quantificazione dell'RNA con spettrofotometro.....</i>	62
<i>Trattamento dell'RNA con DNasi.....</i>	62
<i>Two-Step RT-PCR.....</i>	62
<i>Real-Time PCR.....</i>	64
ANALISI ESPRESSIONE PROTEICA DELLA FERROPORTINA (FPN).....	67
<i>Espressione proteica della Ferroportina (FPN).....</i>	67
<i>Estrazione proteine di membrana.....</i>	67
<i>Eliminazione del detergente dall'estratto proteico.....</i>	68
<i>Determinazione della concentrazione proteica con acido bicinconico (BCA).....</i>	70
<i>Quantificazione della proteina ferroportina mediante saggio ELISA.....</i>	71
<i>Western Blot.....</i>	74
<i>Analisi statistica.....</i>	75
STUDIO DELLA RELAZIONE TRA INTAKE ALIMENTARE, SUPPLEMENTAZIONE CON FERRO E OUTCOMES DELLA GRAVIDANZA.....	76
<i>Caratteristiche della popolazione.....</i>	76
<i>Questionari alimentari.....</i>	77
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>79</b>
CORRELAZIONI TRA LE CARATTERISTICHE CLINICHE DELLA POPOLAZIONE RECLUTATA PER IL CAMPIONAMENTO PLACENTARE .....	80
STUDIO DI ESPRESSIONE GENICA: RECETTORE DELLA TRANSFERRINA (TFR1) E FERROPORTINA (FPN) .....	81
<i>Analisi di espressione genica del Recettore della Transferrina (Tfr1).....</i>	81
<i>Analisi di espressione genica della Ferroportina (FPN).....</i>	84

STUDIO DELL'ESPRESSIONE PROTEICA DELLA FERROPORTINA (FPN).....	92
CORRELAZIONE TRA PESO FETALE E PESO PLACENTARE .....	96
RELAZIONE TRA INTAKE ALIMENTARE, SUPPLEMENTAZIONE CON FERRO, STATO EMATICO E OUTCOMES DELLA GRAVIDANZA.....	97
<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>101</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>108</b>

# **ABSTRACT**

## **TRANSFERRIN RECEPTOR AND FERROPORTIN EXPRESSION IN NORMAL AND PATOLOGICAL HUMAN PLACENTAS**

### Background

Intrauterine Growth Restriction (IUGR) and Pre-eclampsia (PE) are pregnancy pathologies associated with deficient placental function, leading to decreased nutrient and oxygen availability to the fetus. Iron (Fe) deficiency in pregnancy is associated with low birth weight and premature delivery. Nevertheless, Fe oversupply promotes the generation of free radicals and causes oxidative damage in the cells.

A previous study performed in the lab where this thesis has been carried out demonstrated a significant decrease of the Fe cell-importer Transferrin Receptor (TfR1), located in the trophoblast cell (TC) microvillar membrane, in human Intrauterine Growth Restricted (IUGR) vs normal (N) placentas (Mandò C. et al. 2011). Ferroportin (FPN) is a trans-membrane protein located in the TC basal membrane that exports Fe towards the fetal circulation.

### Aim

We hypothesized that TfR1 downregulation in IUGR placentas may be due to Fe intracellular accumulation. Thus, we measured FPN gene and protein expression in human IUGR vs N placentas. Then, we extended the Fe transporters investigation to PE placentas, by measuring TfR1 and FPN gene expression in human PE and PE associated with IUGR vs N placentas.

Furthermore, we evaluated the relationship between Fe supplementation, food intake, haematologic parameters and pregnancy outcome in a cohort of Italian pregnant and healthy women.

### Materials and Methods

Placentas were sampled at the time of elective cesarean section; villi were selected, washed and immediately frozen for following analysis. Umbilical venous and arterial blood was sampled for pH, oxygen measurements, Hb and lactate measurements, from a doubly clamped segment of the cord immediately after fetal extraction. All samples were collected in hepa-

rinized syringes and kept on ice until the end of analysis. All the parameters were measured on a GEM Premier 3000 (Instrumentation Laboratory).

FPN mRNA was quantified in a total of 50 N, 41 IUGR, 10 PE and 15 PE+IUGR placentas by Real Time PCR and FPN protein expression was quantified in 26 N and 14 IUGR by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. TfR1 mRNA was quantified in 28 N, 10 PE and 15 PE+IUGR placentas.

For the study of Fe supplementation, 55 healthy Italian singleton pregnant women were randomized in 4 groups in relation to different doses and types of Fe supplementation (Controls, Fe Sulphate 30 mg, Fe liposomal 14 mg and Fe liposomal 28 mg). At 28-30 gestational weeks data about eating behavior were collected by food frequency questionnaires and hematologic parameters of Fe content (hemoglobin, ferritin, transferrin, serum Fe, folate, vitamin B12, homocystein) in maternal blood by biochemical analysis.

## Results and Discussion

Fetuses from IUGR pregnancies, both with and without PE, have lower pO<sub>2</sub> in umbilical vein, while there were no significant differences in fetal emoglobin (Hb) among controls, IUGR, PE and PE+IUGR groups.

Both FPN mRNA and protein expression were not statistically different in IUGR compared to N placentas. FPN and TfR1 mRNA levels were not statistically different in PE and in PE+IUGR compared to N placentas.

Our results showed no differences in FPN mRNA and protein placental levels between IUGR and N. This suggests that the Fe reaching IUGR fetuses may be decreased compared to normal pregnancies, as a consequence of TfR1 downregulation in the microvillar membranes. This could impair many cellular processes, since Fe is a very important element for enzyme functions and for a correct oxidative status in the cell.

TfR1 and FPN mRNA levels were not statistically different in PE and in PE+IUGR vs. N placentas, suggesting that Fe transport is not affected in Preeclampsia. However, we aim at enlarging our analysis to reach definitive conclusions on the Fe transport system in PE placentas.

No significant differences were found in the maternal hematologic parameters between the 4 groups of randomized pregnant women at 28-31 weeks, with the exception of hemoglobin, which was significantly higher in women supplemented with 28 mg of Fe liposomal compared to controls ( $p < 0.01$ ). The groups were homogeneous in relation to pregnancy outcomes: no

differences were found in neonatal and placental weights, as well as in gestational age at delivery and in umbilical artery pH. The food frequency questionnaires analysis revealed that the control group assumed higher quantity of bioavailable iron (meat) compared to other groups. This may explain the absence of significant differences in the maternal iron status in the control group compared to the supplemented groups.

# INTRODUZIONE

# LA PLACENTA

## *Morfologia e funzione*

La placenta è l'interfaccia tra la madre ed il feto e gioca un ruolo cruciale nello sviluppo intrauterino, fornendo i nutrienti e l'ossigeno necessari per l'accrescimento tissutale e il metabolismo energetico del feto, e producendo e metabolizzando una serie di ormoni che hanno effetti sulla crescita e lo sviluppo fetale.

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. Al termine della gravidanza la placenta ha forma discoidale e il suo peso è compreso in media fra i 500 e i 600 g.

Le principali funzioni della placenta sono:

- creare una barriera immunologica tra il feto e la madre
- mediare il trasferimento di gas respiratori, ioni e nutrienti
- produrre e secernere ormoni, citochine e molecole segnale

L'apporto di sangue materno è determinato alla fine del 1° trimestre di gestazione e il sangue materno penetra nella placenta attraverso le arterie spirali che portano il sangue direttamente nello spazio intervallare. 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 (*fig 1*).

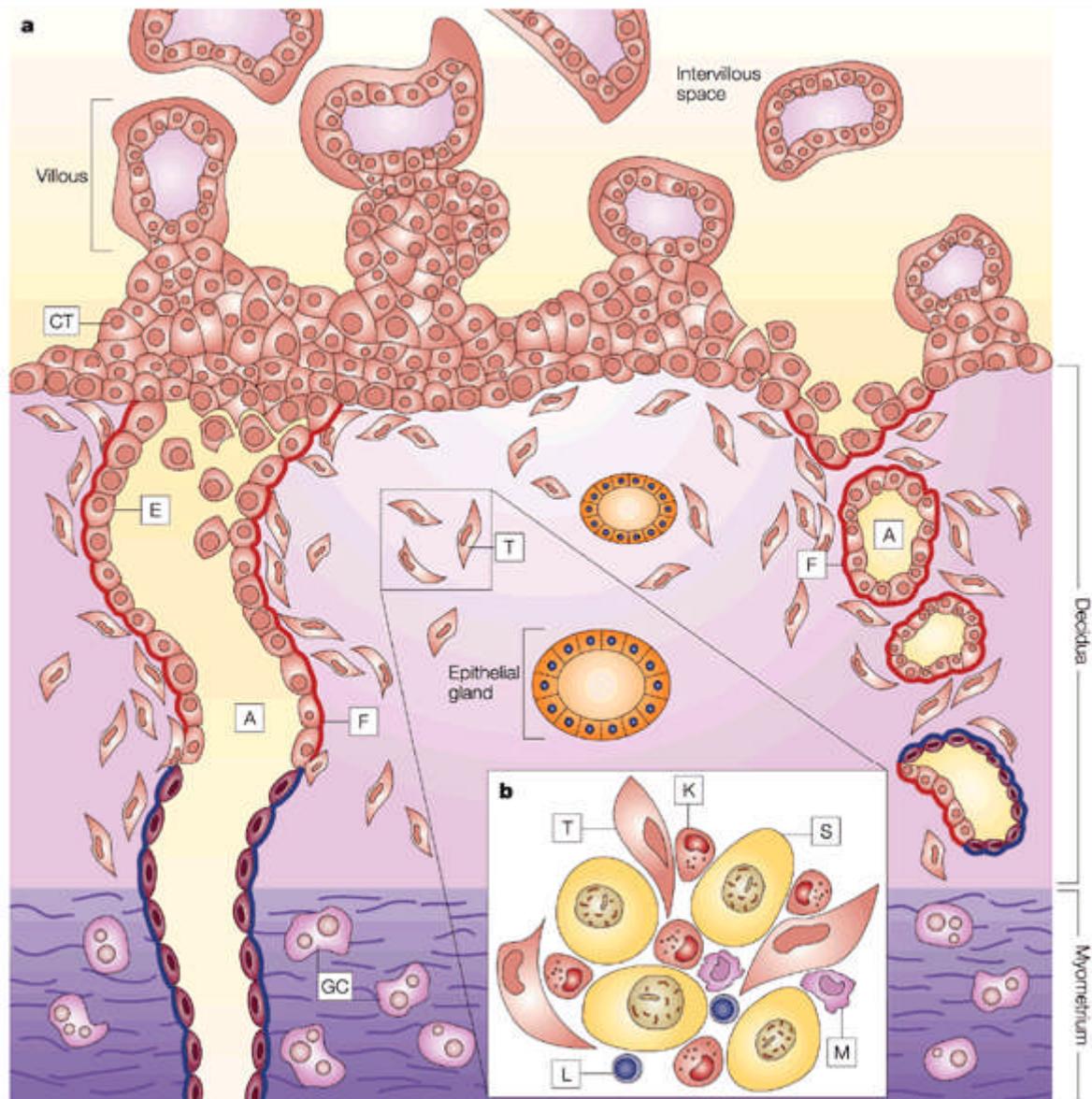
Quindi importanti modificazioni coinvolgono le arterie spirali, che vanno incontro ad un processo di progressiva "venulizzazione": le pareti delle arterie spirali, specialmente a livello endoteliale, mostrano processi necrotici accompagnati da degenerazione della parete muscolare (Sheppard et al, 1974). 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. Il processo consente un abbassamento delle resistenze che permette una circolazione a bassa pressione necessaria per il corretto funzionamento della placenta. La trasformazione dei vasi materni prosegue fino al secondo trimestre arrivando a coinvolgere anche i vasi miometrali (Pijnenborg et al, 1980). In questa fase inizia la definizione della 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.

Studi condotti in corso di gravidanze complicate da ritardo di accrescimento intrauterino (IUGR) o da pre-eclampsia (PE) hanno dimostrato come in questa situazione tale invasione sia limitata alla sola porzione deciduale delle arterie spirali: l'alterazione di tale meccanismo può spiegare l'elevata resistenza placentare ed il ridotto flusso utero-placentare tipicamente associati a tali patologie ostetriche. Se l'invasione vascolare materna da parte dell'embrione nella fase dell'impianto non avviene correttamente, si possono sviluppare lesioni placentari tali da dare origine a patologie ostetriche gravi, quali appunto la pre-eclampsia (Dekker et al., 1998) che si manifestano tardivamente nel III trimestre.

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 sangue materno circola nello spazio intervilloso, che forma 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.) (Marconi e Pardi, 1996; Petraglia et al., 1996; Ross et al., 1996). Il sangue fetale circola invece all'interno dei villi per mezzo dei quali il feto si inserisce nel metabolismo materno.

La "barriera placentare" è dunque costituita dallo strato di tessuto che separa il sangue materno da quello fetale (rivestimento sinciziale, citotrofoblasto, stroma villare, endotelio dei capillari fetali).

La barriera placentare è tale solo dal punto di vista istomorfologico; infatti consente il trasferimento nei due sensi di numerose sostanze ed in molti casi interviene attivamente con meccanismi di permeabilità selettiva, o metabolizzando e modificando lei stessa la composizione dei nutrienti. 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, 2001).



Nature Reviews | Immunology

**Figura 1:** Anatomia delle popolazioni di trofoblasto presenti all'interfaccia materno-fetale durante il primo trimestre di gravidanza.

**a)** I villi placentari sono coperti da cellule del trofoblasto villosa - uno strato interno mononucleare di citotrofoblasto coperto da sinciziotrofoblasto. Il nucleo di ogni villo contiene i vasi sanguigni del feto, fibroblasti e i macrofagi fetali (cellule di Hofbauer). Il sangue materno nello spazio intervilloso raggiunge la placenta attraverso le arterie uterine a spirale (A). Lo strato interno di citotrofoblasto villosa cresce in punti focali per formare colonne di cellule (CT). Queste sono in rilievo a livello dei villi di ancoraggio, dove si verifica l'attaccamento alla decidua materna. All'interfaccia materno-fetale, le colonne formano una struttura a "conchiglia" parzialmente continua. Da questa struttura, le cellule del trofoblasto extravilloso entrano nella decidua come trofoblasto interstiziale (T) per accerchiare e distruggere i supporti arteriosi, che sono sostituiti da materiale fibrinoide (F). Quindi, le cellule del trofoblasto endovascolare (E) muovono in modo retrogrado le arterie in modo da rimpiazzare le cellule endoteliali. Le cellule del trofoblasto si muovono fino al miometrio interno, dove si fondono per diventare "placental-bed giant cells" (GC). Le cellule del trofoblasto extravilloso includono le cellule di citotrofoblasto in colonna e "conchiglia", il trofoblasto interstiziale ed endovascolare e le placental-bed giant cells.

**b)** Rappresentazione schematica dello stroma deciduale al sito di impianto. Cellule del trofoblasto interstiziale (T) sono presenti tra le grosse cellule stromali (S). I leucociti materni sono presenti come cellule natural killer (K) così come pochi macrofagi (M) e occasionali linfociti T (L). (da Moffett-King, 2002).

## ***Concentrazioni di ossigeno intraplacentare durante la gravidanza fisiologica precoce***

L'unità feto-placentare umana è sottoposta a fluttuazioni della concentrazione di ossigeno durante la gravidanza. La tensione dell'ossigeno negli ovidotti e nell'utero di molte specie mammiferi al momento dell'impianto è compresa tra 11 e 60 mmHg, che corrispondono approssimativamente al 1-9% O<sub>2</sub> (Yedwab et al., 1976; Fischer et al., 1993; Ar et al., 1994). La pressione parziale dell'ossigeno (pO<sub>2</sub>) misurata all'interno della placenta in vivo è minore di 20 mmHg a 7-10 settimane di gestazione ed è pertanto equivalente (Rodesch et al., 1992; Jauniaux et al., 2000).

Il mantenimento di basse concentrazioni di ossigeno durante il periodo embrionale sembra favorire la blastulazione e il normale differenziamento cellulare, e potrebbe proteggere dagli effetti dannosi delle specie reattive dell'ossigeno.

Quando questo processo si completa, a 11-14 settimane, la tensione di ossigeno intraplacentare sale oltre i 50 mmHg così che la circolazione materna sia pienamente stabilita.

Nonostante questo aumento, i valori rimangono bassi nel feto in quanto la capacità diffusionale della placenta è limitata in questo periodo della gestazione (Jauniaux E et al., 1991; Jauniaux E et al., 2003).

A 13-16 settimane di gestazione, la pO<sub>2</sub> nel sangue fetale è 24 mmHg, mentre durante la seconda metà della gravidanza quella nella vena ombelicale è compresa tra i 35 ed i 55 mmHg. Tutti questi valori sono relativamente bassi se comparati con i valori di pO<sub>2</sub> riscontrati nella circolazione materna (Jauniaux et al., 2001), ciò suggerisce che c'è un significativo gradiente di ossigeno tra i tessuti materni e quelli fetali durante la gravidanza.

## ***Ruolo della placenta nel trasferimento di nutrienti al feto***

Nei mammiferi, la placenta costituisce un'interfaccia tra feto e madre e regola lo sviluppo intrauterino principalmente in due modi:

- Fornisce i nutrienti e l'ossigeno necessari per l'accrescimento tissutale ed il metabolismo energetico del feto
- Produce e metabolizza una serie di ormoni che hanno effetti sulla crescita fetale e lo sviluppo. Questi ormoni agiscono direttamente sui tessuti fetali e indirettamente vengono metabolizzati dalla madre e dalla placenta e sono in grado di modificare l'apporto di sostanze nutritive al feto.

Attraverso la barriera placentare (rivestimento sinciziale - citotrofoblasto- stroma del villo-endotelio dei capillari fetali) passano gas e sostanze, con diversi meccanismi di trasporto; non esiste molecola a cui la placenta sia impermeabile in senso assoluto, ma i parametri di diffusione possono rendere il passaggio così lento da essere trascurabile.

La barriera placentare è dunque attraversata da:

- ❖ Gas: con meccanismo di diffusione semplice
- ❖ Carboidrati: con meccanismi di diffusione facilitata
- ❖ Aminoacidi: con trasporto attivo (sistemi sia Na-dipendenti sia Na-indipendenti)
- ❖ Proteine interne materne (es. IgG, glicoproteine, albumine): per pinocitosi.

Il ruolo della placenta nella crescita fetale è dunque quello di fornire i nutrienti e i gas necessari al feto per il suo sviluppo, scambiandoli con i metaboliti che il feto produce. Inoltre l'apparato endocrino placentare gioca un ruolo fondamentale sia nell'adattamento materno alla gravidanza (es. accumulo di lipidi come fonte di energia nella prima parte della gravidanza), sia nella distribuzione dei nutrienti da parte della madre e anche direttamente nel metabolismo fetale (es. fattori di crescita).

Lo sviluppo e la funzione placentare sono fattori cruciali dello sviluppo fetale. Una corretta crescita fetale dipende da un efficiente rilascio dei nutrienti dalla madre al feto e quindi richiede un corretto scambio transplacentare di nutrienti ed una normale per fusione uterina e ombelicale.

La placenta gioca un ruolo centrale nel trasporto dei nutrienti tra i compartimenti materno e fetale. Essa processa segnali inviati da entrambi i compartimenti per regolare la domanda fetale e il trasferimento dei substrati dalla madre, ha una sua propria attività metabolica e trasferisce sostanze di scarto fetali verso la circolazione materna.

Segnali nutrizionali, endocrini e ambientali, agiscono insieme nel determinare la domanda fetale, che è la principale responsabile dell'approvvigionamento di cibo attraverso la placenta. La placenta cambia in grandezza, struttura ed efficienza in risposta alla domanda fetale di nutrienti per la crescita. L'attività di importanti trasportatori placentari di nutrienti è il risultato di una regolazione integrata dipendente da un complesso pathway di regolazione. Fattori nutrizionali e ambientali agiscono quindi attraverso meccanismi di regolazione di varia natura. La capacità della placenta di fornire sostanze nutritive al feto dipende dunque da una serie di fattori tra cui dimensione, morfologia, flusso sanguigno, presenza di molecole trasportatrici, velocità di consumo/produzione di sostanze nutritive. Questi fattori sono strettamente correlati tra loro durante lo sviluppo intrauterino e possono essere modulati da cambiamenti ambientali materni e/o fetali (Fowden et al, 2008).

# LA CRESCITA FETALE

La crescita fetale intrauterina rappresenta un'importante manifestazione dell'assetto metabolico e funzionale placentare e conseguentemente fetale.

La crescita fetale è l'espressione di un delicato equilibrio tra fattori genetici materni, paterni e fetali e fattori ambientali.

L'accrescimento durante il periodo embrionale è caratterizzato dal differenziarsi dei principali tessuti e dall'abbozzo degli organi e dei sistemi più importanti; in questa fase la velocità di crescita è in gran parte indipendente dall'ambiente intrauterino, mentre giocano un ruolo predominante i fattori genetici.

Lo sviluppo intrauterino si può suddividere in tre periodi:

- Pre-embrionale: dal concepimento fino a 2 settimane di età concezionale
- Embrionale: fino a 8-10 settimane di età concezionale
- Fetale: da 8-10 settimane fino al termine della gravidanza.

Il periodo che va dal concepimento al momento in cui si instaura il circolo placentare, ovvero 5 settimane di età gestazionale, viene definito "tempo di latenza"; il riferimento alla latenza è relativo al peso dell'embrione, che in questo periodo è nullo.

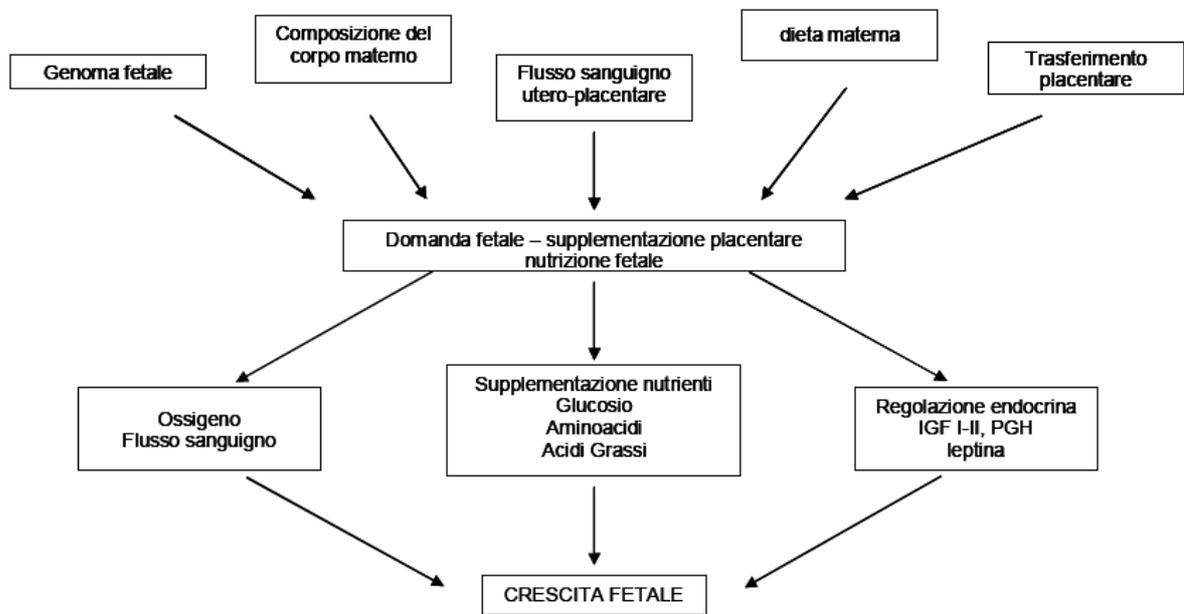
In questa fase di latenza la velocità di moltiplicazione è massima; a partire da circa 7 settimane di età gestazionale, invece, la velocità delle mitosi cellulari inizia lentamente a decrescere e, altrettanto lentamente, incomincia a verificarsi l'aumento di peso dell'embrione.

Nella prima metà della gravidanza la crescita del feto si verifica per iperplasia, cioè per moltiplicazione cellulare, mentre nella seconda metà sono prevalenti i fenomeni di ipertrofia, cioè di aumento delle dimensioni cellulari. Il momento e le modalità di passaggio dalla fase iperplastica a quella ipertrofica presentano una variabilità tra i diversi organi e tessuti, così come ci sono ampie sovrapposizioni dei due fenomeni.

La crescita fetale è un processo complesso dovuto all'interazione di molteplici fattori, genetici e ambientali, nonché alle variazioni dell'ambiente intrauterino (*fig. 4*).

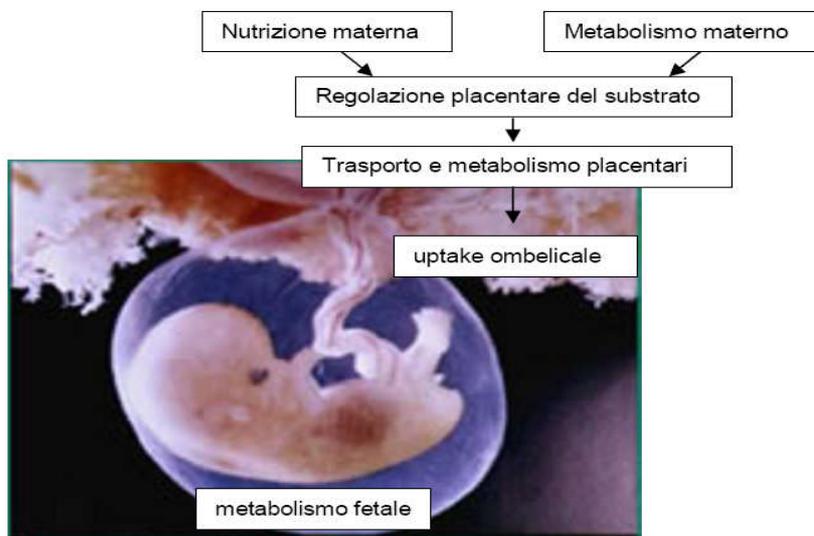
Una crescita fetale alterata è correlata ad un maggior rischio di patologia perinatale, con conseguenze anche nella vita adulta. I disturbi della crescita fetale predispongono infatti l'individuo a patologie cardiovascolari e metaboliche, sia durante l'infanzia che nella vita

adulto inducendo dei cambiamenti a lungo termine attraverso un processo che viene chiamato “fetal programming” (Barker et al., 2001): recenti studi (Cetin et al., 2004) infatti hanno evidenziato che feti macrosomi o con IUGR possano essere nell’età adulta più facilmente colpiti rispettivamente da e/o sindrome metabolica e da patologie cardiovascolari.



**Figura 2:** Principali fattori che influenzano nutrizione e crescita fetale (tratto da Cetin et al., 2005-A)

Dal punto di vista nutrizionale, il feto dipende dalla nutrizione e dal metabolismo materno (adattamento materno alla gravidanza, eventuale predisposizione a patologie placentari che ne modifichino il normale sviluppo), dal trasporto ed il metabolismo placentare, e dal suo stesso metabolismo (fig.3).



**Figura 3:** Fattori che regolano il tasso di crescita intrauterina (tratto da: Cetin et al., 2005-B)

Fattori materni e placentari interagiscono in modo complesso e i loro cambiamenti modificano il tasso di crescita fetale. Per questo si parla di un modello della gravidanza a tre compartimenti: madre-placenta-feto, ognuno con il proprio metabolismo e interagenti l'uno con l'altro.

Glucosio, aminoacidi, acidi grassi e micronutrienti (es. vitamine, minerali, zinco, ferro, acido retinico) sono i nutrienti più importanti della vita fetale, sia per la deposizione di tessuto sia per produrre energia.

Il tasso di crescita intrauterino dell'embrione (e quindi anche il peso alla nascita) è determinato da:

- Potenziale genetico di crescita
- Disponibilità di substrato (efficienza nel trasferimento di nutrienti al feto da parte del sistema materno-placentare)
- Ambiente endocrino

La crescita fetale dunque dipende dal bilanciamento tra la domanda fetale dei nutrienti e il loro rifornimento da parte della madre, che a sua volta dipende da nutrizione e metabolismo materno, flusso sanguigno utero-placentare, grandezza della placenta e capacità di trasferimento dei nutrienti da parte della placenta (Cetin et al., 2005-C).

# PATOLOGIE DA INSUFFICIENZA PLACENTARE

L'insufficienza placentare è una condizione ad eziologia multifattoriale in cui si verificano alterazioni morfologiche e funzionali della placenta; si può presentare accompagnata da complicanze materne (ad esempio la pre-eclampsia – PE) o fetali (ad esempio il ritardo di crescita intrauterino – IUGR).

## *La Pre-eclampsia*

Si definisce pre-eclampsia la patologia materna caratterizzata da ipertensione (pressione sanguigna > 140/90 mmHg misurata almeno due volte nell'arco delle 24 ore, con un aumento della pressione sanguigna diastolica > 25 mmHg) insieme a proteinuria (> 0,3 g/24 h o 30 mg/dl rilevata con test a strisce reattive su un campione collezionato in 24 ore) dopo la 20<sup>a</sup> settimana di gestazione in donne precedentemente normotese e non proteinuriche (Redman e Jefferies, 1988; Sibley et al., 2002).

Questa condizione affligge circa il 5-7% delle donne in gravidanza nel mondo, ed è tra le principali cause di aumento della morbilità e della mortalità materna.

La PE può essere suddivisa in due gruppi, con differente eziologia e diversa espressione clinica:

- PE precoce: prima delle 34 settimane di gestazione
- PE tardiva: dopo le 34 settimane di gestazione

Il tipo ad insorgenza tardiva comprende più dell'80% di tutti i casi mondiali di pre-eclampsia e molti di questi casi sono associati con:

- Normale crescita fetale, senza segni di ritardo di crescita
- Normale (o solo leggermente alterato) comportamento delle arterie spirali uterine
- Nessun cambiamento nel flusso sanguigno delle arterie ombelicali

-Aumento del rischio dell'insorgenza della patologia stessa nelle gravide che mostrano un'aumentata massa o superficie placentare (ad es. in casi di diabete, gravidanze multiple, anemia, elevata altitudine).

La PE ad insorgenza precoce invece comprende solo un piccolo gruppo di casi ma include le situazioni con più grave rilevanza clinica:

- Inadeguata e incompleta invasione delle arterie spirali materne da parte del trofoblasto
- Cambiamenti nel flusso sanguigno all'interno delle arterie placentari spirali e quindi in quelle uterine
- Incrementata resistenza periferica dei vasi placentari
- Segni di ritardo di crescita intrauterino.

Molti dei casi di PE ad insorgenza precoce sono associati ad un'altra patologia che presenta insufficienza placentare, il ritardo di crescita intrauterino (IUGR); le caratteristiche tipiche dei casi di IUGR/PE dipendono da un'inadeguata invasione da parte del trofoblasto e un'insufficiente trasformazione delle arterie spirali, seguiti rispettivamente da cambiamenti nel flusso sanguigno delle arterie uterine, alterazioni del flusso sanguigno ombelicale e restrizione della crescita fetale (Huppertz, 2008).

Inoltre la PE può essere:

- lieve
- grave

La diagnosi di PE lieve si pone in presenza di:

- Valori pressori sistolici 140-159 mmHg e/o diastolici 90-109 mmHg
- Proteinuria 0,3-5 g/24 ore (1, 2)
- Normalità degli esami ematochimici (conta piastrinica, funzionalità renale ed enzimi epatici)
- Assenza di cefalea persistente, dolore epigastrico o all'ipocondrio destro, alterazioni neurologiche (iperreflessia a clono, segni di lato, parestesie, confusione mentale e disorientamento spaziotemporale), disturbi visivi (scotomi, visione offuscata, cecità mono- o bilaterale transitoria), oliguria, edema polmonare o segni di sovraccarico polmonare
- Assenza di ritardo di crescita fetale (IUGR).

Si pone diagnosi di PE severa quando una paziente pre-eclampatica presenta almeno uno dei seguenti segni/sintomi:

- Pressione arteriosa sistolica  $\geq 160$  e/o diastolica  $\geq 110$  mmHg in due misurazioni successive ad almeno 6 ore di distanza in condizioni di riposo
- Proteinuria  $\geq 5$  g/24 ore, o a 3+ al dipstick in due campioni estemporanei di urine prelevati ad almeno 4 ore di distanza. La proteinuria eseguita con dipstick è utile come screening ma deve essere confermata con l'esame sulle urine delle 24 ore
- Oliguria (diuresi  $< 500$  ml/24 ore o  $< 80$  ml/4 ore)
- Disturbi visivi (scotomi, visione offuscata, cecità mono- o bilaterale transitoria)
- Alterazioni neurologiche (cefalea intensa e persistente, iperreflessia a clono, segni di lato, parestesie, confusione mentale e disorientamento spazio-temporale)
- Edema polmonare, cianosi
- Epigastralgia e/o dolore ipocondrio destro
- Aumento degli enzimi epatici
- Conta piastrinica  $< 100.000/mm^3$
- Pre-eclampsia accompagnata da ritardo di crescita intrauterino (IUGR)

### **Ruolo della placenta nella Pre-eclampsia**

La presenza di anomalie nella placenta, più che nel feto, è cruciale per lo sviluppo della preeclampsia; comunque, sebbene la placenta giochi un ruolo molto importante nell'insorgenza

della PE, il tipo, la gravità e la progressione della patologia sono significativamente influenzati dalla risposta materna alla placentazione.

Precocemente nello sviluppo della placenta, il citotrofoblasto extravilloso (di origine fetale) invade le arterie uterine spirali della decidua materna e il miometrio. Queste cellule invasive rimpiazzano lo strato endoteliale delle arterie spirali materne, trasformandole da vasi piccoli e ad alta resistenza in vasi ad elevato calibro capaci di provvedere ad una adeguata per fusione placentare per sostenere la crescita del feto.

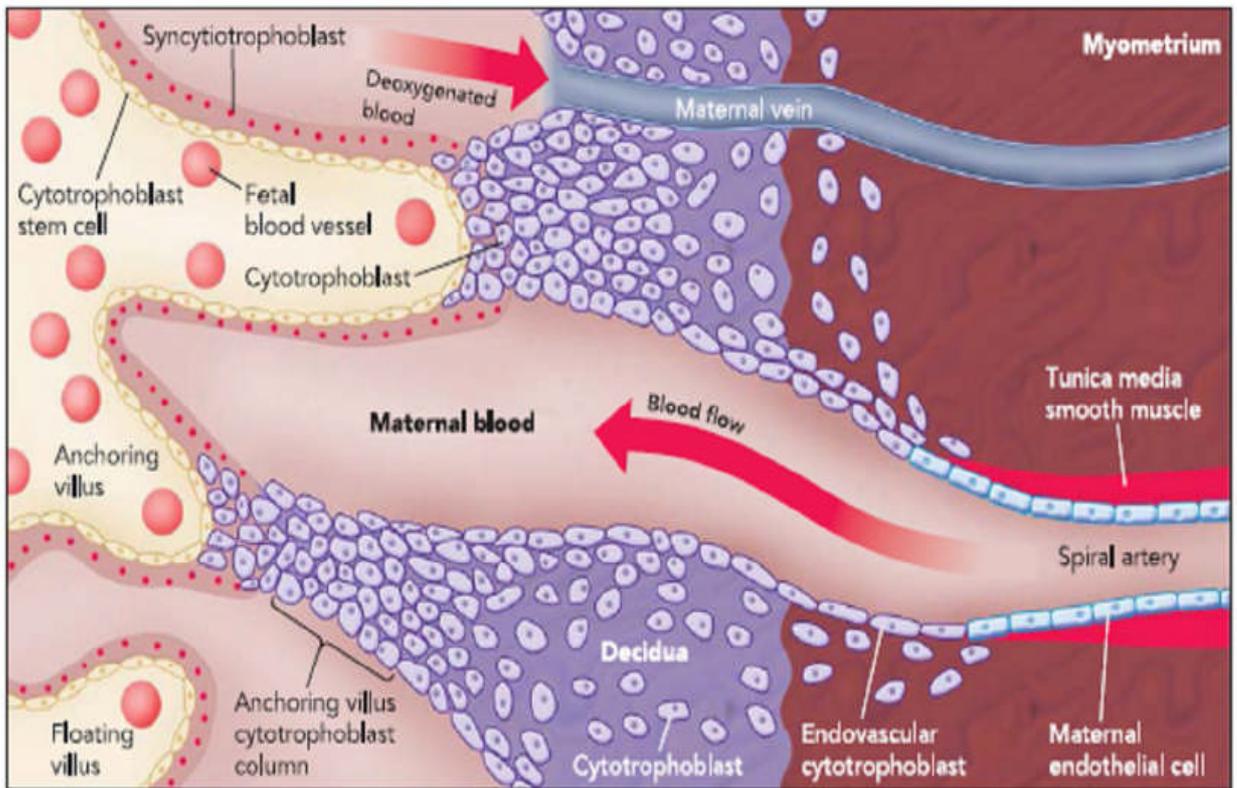
Nella PE, questa trasformazione è incompleta: l'invasione da parte del citotrofoblasto delle arterie spirali è limitata alla superficie della decidua e i segmenti del miometrio invece rimangono stretti (*fig. 4*; Wang et al., 2009).

Nel normale sviluppo placentare, il citotrofoblasto assume un fenotipo endoteliale in un processo chiamato pseudovasculogenesi, mediante la downregolazione dell'espressione di molecole d'adesione tipiche della loro origine epiteliale e l'espressione di molecole di adesione superficiali tipiche di un fenotipo endoteliale; nella PE il citotrofoblasto non mette in atto questo switch delle molecole di superficie e quindi non è in grado di invadere le arterie spirali del miometrio (Zhou et al., 1997).

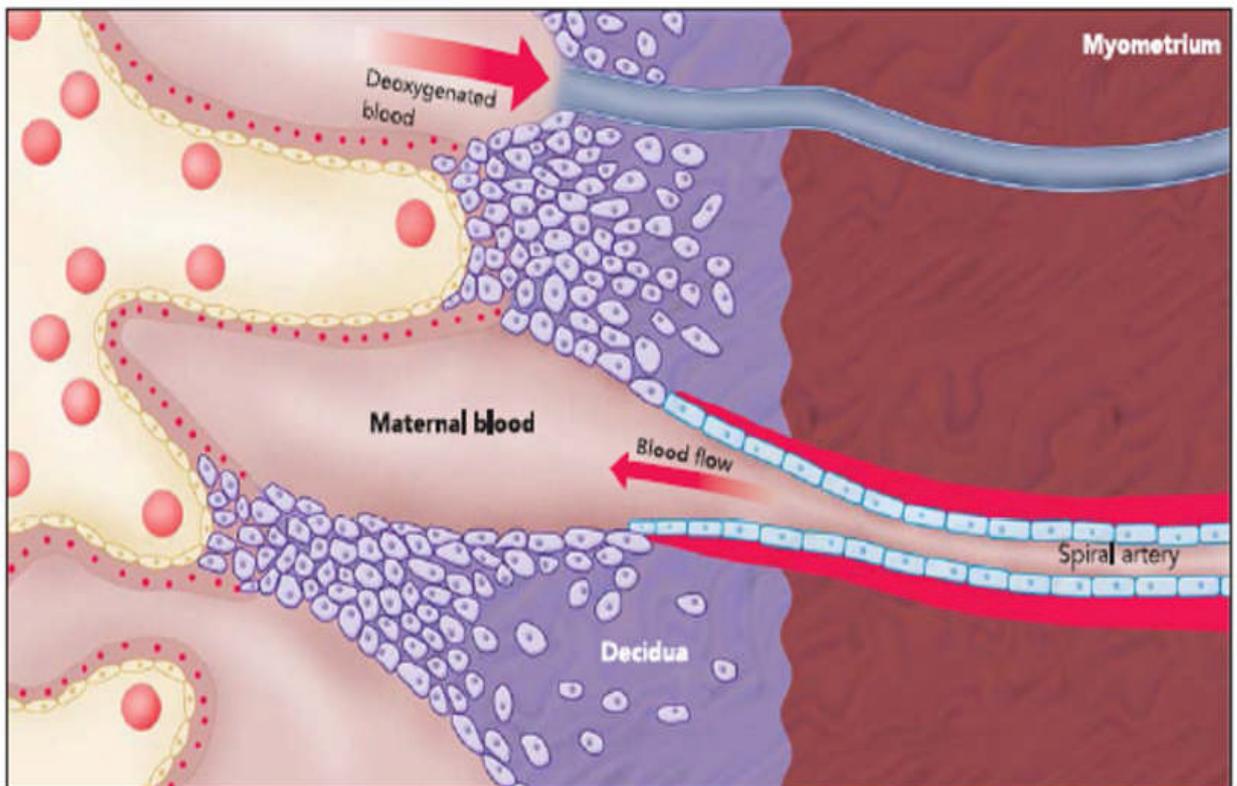
Come detto precedentemente, anche la risposta materna è cruciale nello sviluppo della patologia; nei casi di PE si riscontra un'esagerata attivazione endoteliale ed uno stato infiammatorio generalizzato. Episodi di ipossia e riperfusione placentare causano stress ossidativo che porta alla distruzione dell'architettura sinciziale tramite necrosi ed apoptosi ed il rilascio di varie componenti

dallo spazio intervillare alla circolazione materna, con conseguente stimolazione alla produzione di citochine infiammatorie. L'eccessiva infiammazione sistemica che si verifica nelle donne pre-eclamptiche porta a disfunzioni endoteliali e aumento delle resistenze vascolari che causano infine i sintomi stessi della preeclampsia (Steegers et al., 2010).

**Normal**



**Preeclampsia**



**Figura 4:** anomala placentazione nella PE (tratto da Wang et al., 2009)

### **Pentraxina-3: biomarker endoteliale di Pre-eclampsia**

La disfunzione endoteliale che caratterizza la pre-eclampsia (PE) è il risultato di un'eccessiva risposta immunologica/infiammatoria materna alla gravidanza a livello del trofoblasto in sviluppo e la decidua materna. La pentraxina-3 (PTX-3) è una molecola infiammatoria appartenente alla stessa famiglia della proteina C reattiva (CRP) ed è espressa in risposta a stimoli infiammatori da una grande varietà di cellule quali cellule endoteliali, monociti, macrofagi e fibroblasti. E' stato dimostrato che PTX-3 ha un importante ruolo nell'immunità innata, nella fertilità femminile e nei processi infiammatori ( Garlanda et al., 2005). Inoltre PTX-3 è espressa nell'endometrio e presenta un' alterata espressione in gravidanze abortive ( Thranguch et al.,2007).

E' stato dimostrato che nel terzo trimestre di gravidanza i livelli di PTX-3 nel siero materno sono significativamente più alti in gravidanze preeclamptiche (PE) rispetto a gravidanze di controllo (CT) (Cetin I. et al., 2006; Rovere Quercini P. et al.,2006). E' stato anche (Nicolaidis KH et al., 2006; Cetin I. et al., 2006) evidenziato che i livelli di PTX-3 nel siero materno sono già alterati nel primo trimestre di gravidanze di pazienti che in seguito svilupperanno preeclampsia.

E' stata studiata l'espressione di PTX-3 nel siero di donne con gravidanze PE e con gravidanze IUGR. I livelli di PTX-3 risultano significativamente maggiori in madri con gravidanze PE e/o con IUGR rispetto ai controlli (CT) e la differenza aumenta con la severità della patologia gravidica; in particolare i livelli sierici di PTX-3 sono più alti nelle gravidanze con preeclampsia grave mentre nelle gravidanze IUGR sono minori rispetto alle gravidanze PE. PTX-3 rappresenta una molecola infiammatoria il cui livello aumenta nel siero materno come risposta infiammatoria della madre ai detriti placentari rilasciati nella circolazione materna in gravidanze patologiche (PE e/o IUGR). Analisi di immunoistochimica rivelano che il sito di incremento di sintesi di PTX-3 in gravidanze PE e IUGR è l'endotelio dell'endometrio materno e non l'unità placentare. PTX-3 è una molecola i cui livelli sono correlati alla severità della patologia pre-eclamptica con proprietà anti-infiammatorie: il suo incremento potrebbe rappresentare una risposta materna protettiva all'infiammazione che limiterebbe il danno infiammatorio e alla vascolatura sistemica materna e placentare. Quindi l'elevato livello di PTX-3 nel siero materno rappresenta un marker della disfunzione endoteliale tipica della PE (Nicolaidis KH et al., 2006).

## ***Il Ritardo di Crescita Intrauterino***

Il ritardo di crescita intrauterino (*Intrauterine Growth Restriction* – IUGR) è una patologia da insufficienza placentare che, a differenza della PE, colpisce il feto.

Viene diagnosticato quando si verifica una ridotta crescita del feto in utero, evidenziabile durante i controlli ecografici, a partire dalla 20<sup>a</sup> settimana di gestazione; lo IUGR è definito da un peso alla nascita inferiore al 10° percentile, insieme ad una diminuzione longitudinale della crescita di più di 40 centili, misurata in utero con ultrasuoni (Parazzini et al., 1991; Pardi et al., 1993). Nei feti IUGR si trovano alterazioni del metabolismo fetale e/o del metabolismo e del trasporto placentare anche quando il flusso sanguigno ombelicale o la frequenza cardiaca fetale sono normali.

L'American College of Obstetricians and Gynecologists" (ACOG) definisce lo IUGR “*a fetus that fails to reach his potential growth*” (2001). La condizione di IUGR va infatti distinta da quella del feto piccolo per epoca gestazionale (*Small for Gestational Age* = SGA), che presenta un peso alla nascita inferiore al 10° percentile per sesso ed età gestazionale. Il termine IUGR dovrebbe essere impiegato solo per indicare una patologia del feto, diagnosticata in utero, mentre SGA è una definizione che riguarda il bambino alla nascita.

Il ritardo di crescita intrauterino si associa ad elevato rischio di mortalità e morbilità perinatale (Franchi et al, 2004) e allo sviluppo di sindromi metaboliche in età adulta (De Rooij et al., 2007; Painter et al., 2008). Ha una incidenza nella popolazione generale del 7-15% (Baschat et al., 2004; Alexander et al., 2003). Inoltre, è stato riscontrato nel 52% dei bambini nati morti ed è responsabile del 10% circa delle morti in epoca perinatale (Baschat 2004; Alexander 2003). E' una condizione ad eziologia eterogenea, dove diversi fattori di rischio sia genetici che ambientali possono interferire con il fisiologico sviluppo feto-placentare.

Si può classificare lo IUGR in base alla sua severità clinica, considerando due parametri: la frequenza fetale cardiaca (FHR) e la velocimetria Doppler dell'arteria ombelicale (indice di pulsatilità, PI - Pardi et al, 1993). In base ad essa si possono distinguere:

- IUGR di tipo I: FHR e PI normali;
- IUGR di tipo II: FHR normale e PI anormale;
- IUGR di tipo III: FHR e PI anormali.

Tale classificazione riflette differenti stadi di insufficienza placentare ed è associata a differenze significative nel trasferimento dei nutrienti attraverso la placenta (Pardi et al., 1993).

Esistono alcune cause note, o fattori di rischio, per l'insorgenza dello IUGR:

- 1) materni (disordini metabolici, come ipertensione cronica o diabete pre-gestazionale, patologie cardio-vascolari/renali, abuso di farmaci, fumo, malattie autoimmuni, estrema malnutrizione, trombofilia congenita o acquisita);
- 2) fetali (infezioni, malformazioni congenite, anomalie cromosomiche);
- 3) placentari (patologie della placenta, presenza di infarti, mosaicismo confinato alla placenta).

Nella maggior parte dei casi però la patologia non presenta nessuna di queste cause note predisponenti, e dunque lo IUGR non ha cause note. Queste condizioni però condividono tutte un fenotipo placentare, detto "insufficienza placentare" (Sibley et al., 2005).

Tali alterazioni a carico della placenta sono le più frequenti nell'eziologia dello IUGR. In questi casi la patologia è il risultato di un'inadeguata placentazione, con conseguente insufficiente vascolarizzazione utero-placentare, alterazione dell'interfaccia materno-fetale e dei meccanismi di scambio nutrizionale.

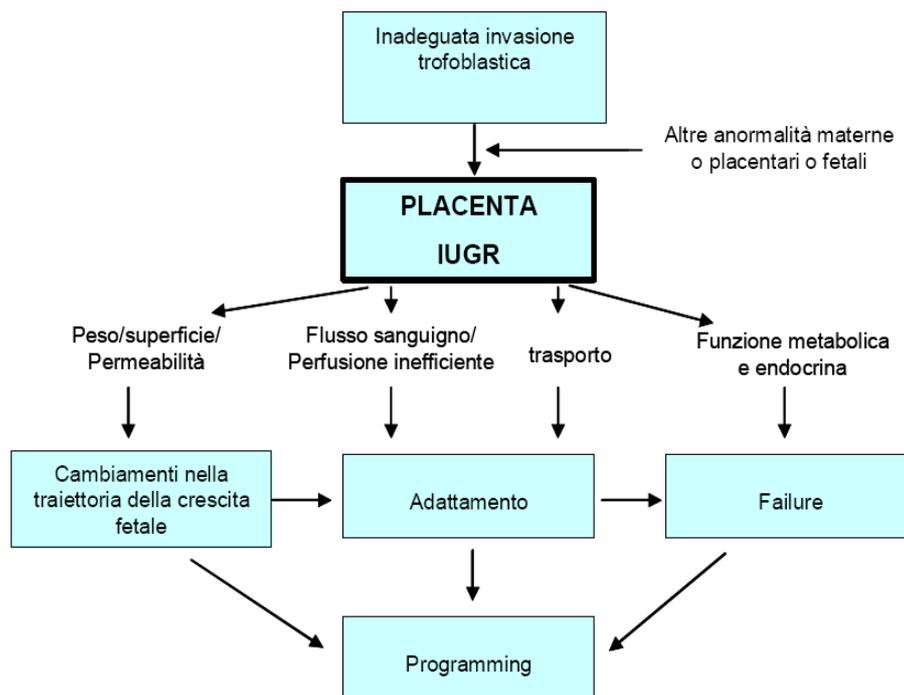
Negli IUGR è stata osservata una stretta e forte relazione tra peso fetale e placentare, tanto più marcata quanto più severa è la patologia (Pardi et al., 2002).

Nelle gravidanze IUGR, si può verificare anche un ridotto rilascio di ossigeno al feto. La placenta consuma una forte quantità di ossigeno, pari a circa il 40% dell'assorbimento utero-placentare totale di ossigeno (Carter, 2000).

In gravidanze IUGR è stato dimostrato che i valori di pressione dell'ossigeno nelle vene uterine ed i gradienti venosi uterino-ombelicali sono significativamente maggiori rispetto a gravidanze normali della stessa età gestazionale, con conseguente diminuzione del coefficiente di estrazione di ossigeno uterino (Pardi et al., 1992). Inoltre, il contenuto di DNA mitocondriale aumenta significativamente nelle placente IUGR, crescendo in modo inversamente proporzionale alla tensione di ossigeno della vena ombelicale (Lattuada et al. 2008). L'aumento del DNA mitocondriale può essere il risultato di un meccanismo compensatorio in condizioni di ipossia, o un adattamento placentare metabolico alla ridotta disponibilità di nutrienti (la biogenesi mitocondriale è promossa da restrizione calorica).

In studi di assorbimento ombelicale di ossigeno, si è dimostrato che l'assorbimento di ossigeno fetale è minore nei feti IUGR di circa il 50% rispetto a feti normali, anche considerando i valori per kg, suggerendo una riduzione significativa del metabolismo negli IUGR. I feti IUGR diventano infatti progressivamente ipossici e lattacidemici (Pardi et al., 1993).

Riassumendo, il trasporto ed il metabolismo placentare sono fortemente modificati nelle gravidanze IUGR. Nelle placente IUGR si riscontrano sempre cambiamenti di peso, superficie e permeabilità placentare, insieme a modificazioni del flusso sanguigno utero/ombelicale che portano ad una insufficiente perfusione ed un ridotto trasferimento di nutrienti (Pardi et al. 2006). Ci sono inoltre cambiamenti funzionali nei trasportatori placentari di nutrienti e nella funzione metabolico/endocrina (Fowden et al., 2008). Complessivamente, queste alterazioni placentari portano ad un cambiamento di traiettoria della crescita fetale, con iniziali tentativi di risposte adattative, spesso fallimentari. Tutti questi passaggi possono influenzare il “fetal programming”, ovvero la “programmazione fetale”: un evento che agisce in un momento critico o sensibile della vita fetale, può comportare cambiamenti a lungo termine nella struttura o nella funzione dell’organismo (Harding, 2001), conducendo ad un maggior rischio di malattie metaboliche e cardiovascolari in età adulta (fig. 5). Per queste ragioni è molto importante capire a fondo i meccanismi metabolici e di trasporto placentare che sono alterati nel ritardo di crescita intrauterino.



**Figura 5: Placenta IUGR.** Una inadeguata invasione trofoblastica, o altre anomalie materne, placentari o fetali, conducono ad una placenta IUGR, con un cambiamento nella traiettoria della crescita fetale, che può influenzare il “fetal programming”. (Tratto da: Cetin et.al, 2009)

## **Ruolo della placenta nello IUGR**

Il ritardo di crescita intrauterino (IUGR) è una patologia spesso associata ad anomalie istologiche della placenta, segno dell'anomala placentazione che avviene in queste gravidanze. Tali anomalie strutturali rappresentano possibili cause di alterata funzionalità placentare e quindi di ridotto passaggio di nutrienti ed ossigeno, indispensabili per la crescita del feto. Queste caratteristiche anomalie sono state riscontrate sia a carico della struttura villare sia della struttura vascolare di supporto (Dekker et al., 1998; Salafia et al., 1997).

Nella placenta di pazienti con IUGR e/o pre-eclampsia si riscontrano frequenti infarti placentari con deposizione di lipoproteine e trombi; queste lesioni sono associate ad una invasione superficiale delle arterie spirali con una diminuzione della profondità di invasione stimata essere fino al 30-50% rispetto a placentate di pazienti con gravidanza fisiologica (Dekker, 1998).

La placenta di feti con ritardo di crescita è caratterizzata da numerosi altri segni patologici, quali: ridotta superficie del sinciziotrofoblasto, aumentato spessore della barriera di scambio formata dal trofoblasto e dall'endotelio capillare fetale, aumentata apoptosi placentare (Hung et al., 2002; Ishihara et al., 2002).

Oltre ad anormali villi terminali, le placente IUGR mostrano un aumento dei nuclei cellulari nel sinciziotrofoblasto, una riduzione dei nuclei nel citotrofoblasto ed un aumento di deposizione stromale di collagene e laminina (Macara et al., 1996).

Altri studi hanno mostrato che le anse dei villi capillari nelle placente IUGR sono relativamente scarse in numero ma significativamente più lunghe rispetto a quelle delle placente normali (Krebs et al., 1996). Queste anomalie capillari sono state trovate in associazione con allungamento dei terminali dei villi, deposizione di placche di fibrina sulla superficie del trofoblasto e atrofia villare. Questi risultati sono coerenti con un aumento dell'impedenza vascolare feto-placentare a livello capillare, il che potrebbe spiegare il trasferimento alterato di gas e sostanze nutritive in placente IUGR.

# MICRONUTRIENTI

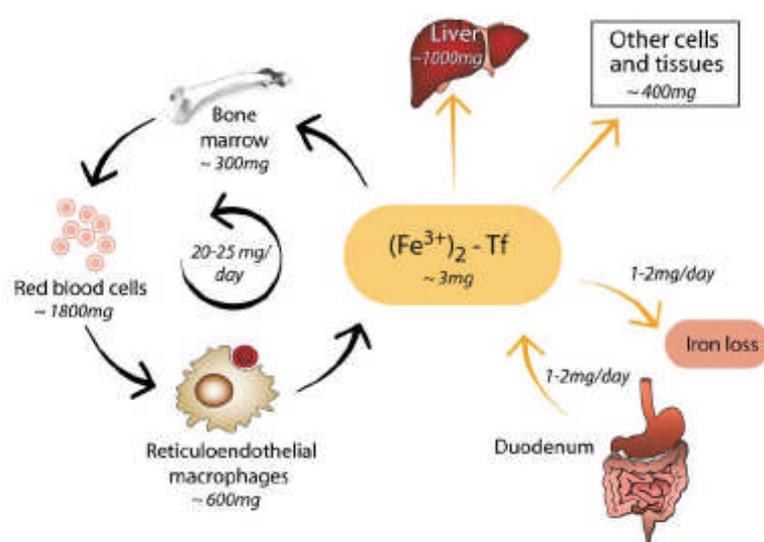
I micronutrienti sono elementi essenziali ad ogni stadio della gravidanza per lo sviluppo e la crescita fetale, e livelli alterati di alcuni di essi possono provocare malformazioni e difetti di sviluppo del sistema nervoso centrale.

Alcuni esempi di micronutrienti importanti sono:

- Ferro e rame, fondamentali nei processi catalitici degli enzimi (la carenza in ferro è stata dimostrata essere responsabile di difetti cardiovascolari in età adulta);
- Acido Retinico, implicato nella trasmissione del segnale;
- Zinco, necessario per la stabilizzazione degli enzimi e di fattori di trascrizione;
- Vitamine liposolubili, che hanno proprietà antiossidanti che proteggono la cellula dai radicali liberi; ad esempio: vitamina E;  $\beta$ -carotene; vitamina A, che è anche un fattore morfogeno a inizio gravidanza, in quanto le sue differenti concentrazioni nelle diverse parti dell'abbozzo embrionale conducono a destini variabili le cellule embrionali.

## ***Distribuzione del ferro nell'organismo***

In un uomo adulto sono contenuti 3-4 g di ferro. Il 68% del ferro, cioè più dei 2/3, è contenuto nei quattro gruppi eme dell'emoglobina, il 27% è contenuto nella ferritina, il 4% nella mioglobina, lo 0,6% in alcuni enzimi come gruppo prostetico e solo lo 0,1% nella transferrina. Il ferro è rilasciato in gran parte a livello del midollo osseo per l'incorporazione negli eritrociti; una parte è contenuta nella ferritina della mucosa intestinale e nel fegato; ed è presente anche nella milza, dove gli eritrociti vengono degradati.



***Figura 6: Traffico cellulare e tissutale del ferro nell'organismo umano. Sono mostrati le percentuali del contenuto di ferro nei diversi tessuti e organi.***

In caso di carenza di ferro, l'organismo ricorre alle proprie riserve e non compaiono particolari sintomi. Successivamente, quando le riserve si stanno esaurendo, la ferritina nel sangue diminuisce ed è sempre meno satura e diminuiscono i livelli di emoglobina; di conseguenza, si hanno alterazioni a livello degli eritrociti. In casi di grave carenza, gli enzimi che contengono ferro come gruppo prostetico diminuiscono la propria efficienza e si riscontrano gravi effetti a livello metabolico.

L'eccesso di assorbimento di ferro è caratteristico dell'emocromatosi idiopatica, frequente negli uomini, mentre nelle donne si presenta in forma più lieve a causa delle mestruazioni (ed eventualmente della gravidanza), che eliminano in parte il ferro in eccesso.

Altre patologie caratterizzate da eccesso di ferro sono le anemie emolitiche, tra cui le talassemie.

### ***Il ferro negli alimenti e il suo assorbimento***

Il ferro si trova nei cibi sotto forma di ferro eme o di ferro non eme (quest'ultimo è detto anche ferro inorganico). Nel secondo caso, può essere presente o sotto forma di ione ferroso (ione  $Fe^{2+}$ , bivalente), o sotto forma di ione ferrico (ione  $Fe^{3+}$ , trivalente), i quali sono solubili rispettivamente a pH 7 e a pH minore di 3. Il ferro eme si trova solo negli alimenti di origine animale, in particolare nella carne, in quanto presente nelle emoproteine muscolari (i latticini, al contrario, ne sono del tutto privi). Viene assorbito più facilmente rispetto al ferro non eme, ma è presente in quantità minore. Il ferro non eme si trova sia nella carne, sia negli alimenti di origine vegetale. Tra gli alimenti più ricchi di ferro ci sono il tuorlo d'uovo, i legumi, il fegato (Helman AD et al 1987), le carni rosse. Gli spinaci, seppur contengano ferro, non ne sono particolarmente ricchi (a differenza di quanto affermano le credenze popolari) e, inoltre, il ferro contenuto non viene assorbito, in quanto è legato al fitato (l'inositolo esafosfato), che ne impedisce la dissociazione ad opera delle reazioni chimiche gastrointestinali.

Gli alimenti ricchi di ferro vengono attaccati all'interno dello stomaco dai succhi gastrici, che facilitano la dissociazione degli ioni del ferro dal resto del cibo (dissociazione che è peraltro favorita dalla cottura). Con l'aiuto dell'acido ascorbico, tali ioni vengono subito ridotti a ioni ferrosi  $Fe^{2+}$ ; è per questa ragione che per assorbire meglio il ferro presente nei vegetali è consigliabile il consumo contemporaneo di alimenti ricchi di vitamina C.

Il ferro viene assorbito principalmente nell'intestino, in particolare nel duodeno. Gli enterociti sono in grado di assorbire il ferro eme direttamente, in quanto l'intera molecola che lo contiene può attraversare la membrana dell'enterocita (per poi rilasciare il ferro sotto forma di ione trivalente, in particolare dividendosi in protoporfirina IX e  $Fe^{3+}$  libero). Al contrario, il ferro non eme può essere assorbito solo dopo essere stato separato dalla molecola originaria e legato ad altre molecole, come zuccheri o acido ascorbico (Hallberg L et al.1981).

L'assorbimento del ferro non eme è influenzata dalla presenza di altre sostanze che vengono digerite assieme ad esso. Esse, invece, non hanno effetto sull'assorbimento del ferro eme (Helman AD et al., 1987).

Alcune di queste sostanze sono l'acido citrico e acido ascorbico, che favoriscono l'assorbimento. Alle persone che hanno bisogno di limitare la quantità di ferro assorbita, si consiglia talvolta di assumere queste sostanze lontano dai pasti tra le sostanze che limitano l'assorbimento, ci sono il caffè, il tè, alcune spezie (Gleerup A. et al., 1995).

### ***Ferro: omeostasi in gravidanza e outcomes fetali***

Di particolare rilevanza tra i micronutrienti è il ferro (Fe), la cui carenza durante la gravidanza altera la crescita e lo sviluppo embrionale ed influisce considerevolmente anche sulla crescita vascolare (McArdle et al., 2008; Allen, 2000). L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS, 2003) considera il deficit di ferro il principale disordine nutrizionale nella popolazione mondiale.

Il ferro è un nutriente essenziale durante lo sviluppo precoce dell'essere umano ed è indispensabile per numerosi processi biologici, tra cui la sintesi di DNA, il trasporto di ossigeno ed elettroni e la respirazione cellulare. Eccessi marziali, tuttavia, determinano la formazione di specie ioniche altamente reattive (radicali liberi) che possono determinare importanti alterazioni a carico del DNA, nonché danni cellulari morfologici e funzionali. Il range terapeutico del ferro è pertanto relativamente ristretto, per cui i meccanismi cellulari di trasporto devono essere finemente regolati allo scopo di evitare conseguenti stati di difetto o eccesso.

I test di laboratorio utilizzati nella diagnosi di anemia sideropenia, la manifestazione clinica primaria di un deficit marziale, comprendono: concentrazione emoglobinica (Hb), ematocrito (Hct), volume corpuscolare medio (MCV), sideremia, saturazione della transferrina, capacità totale legante il ferro, ferritina sierica, recettore solubile della transferrina (forma troncata del recettore, presente nel siero). In gravidanza, tuttavia, l'"adattamento materno" modifica tali parametri. La riduzione della concentrazione di Hb, della sideremia e della ferritina sierica e l'aumento della capacità totale ferro-legante rendono difficile la valutazione di condizioni di anemia ferro-privata. L'emodiluzione gravidica comporta una riduzione della concentrazione di Hb di circa 10 g/L. Sebbene concentrazioni di Hb inferiori a 11 g/dL siano state occasionalmente riportate in donne con adeguata omeostasi marziale, tale valore si è dimostrato un buon cutoff per la definizione

di anemia in gravidanza (FAO, 1988). Cambiamenti maggiori rispetto a quelli della concentrazione di Hb e della sideremia si hanno in gravidanza per la capacità totale ferro-legante, che aumenta di circa il 50%. Come risultato si assiste ad una caduta della saturazione della transferrina. La ferritina sierica, invece, dopo un lieve aumento nel I trimestre si riduce fino al 50% del normale in prossimità del termine. Convenzionalmente, valori inferiori a 12 microgrammi/L di ferritina sierica identificano importanti stati di sideropenia. Studi recenti dimostrano che la concentrazione del recettore solubile della transferrina in gravidanza mantiene valori simili al normale, essendo aumentata solo in condizioni di deplezione marziale (Carriaga, 1991).

Nella maggior parte delle specie, pertanto, in gravidanza si assiste ad un aumento del volume plasmatico con conseguente caduta della concentrazione di Hb e della massa eritrocitaria circolante. Questa condizione è definita come *anemia gravidica*. Nonostante ciò, in una percentuale sorprendentemente alta di donne la diminuzione della concentrazione di emoglobina e dell'ematocrito è maggiore di quella considerata sicura (Mc Ardle, 2003). Un'elevata percentuale di tale condizione di anemia risulta correlata alla deplezione di ferro.

Nei paesi in via di sviluppo la percentuale complessiva di donne con anemia manifesta in gravidanza raggiunge il 56%, percentuale peraltro rilevante anche nei paesi industrializzati, dove raggiunge il 18% (*tabella 1*). La sideropenia, senza condizione anemica associata, si stima invece possa raggiungere percentuali molto più elevate in entrambi i casi.

Un inadeguato apporto di ferro con la dieta si pensa giustifichi nella maggior parte dei casi il deficit di ferro sia prima sia durante la gravidanza (Bothwell, 2000). Studi recenti condotti in Francia e in Inghilterra dimostrano intakes marziali nella dieta significativamente inferiori rispettivamente nel 93% e nel 40% delle donne in età fertile (Galan et al., 1998). Un ulteriore fattore di rischio per il deficit marziale è la pluriparità, che può condurre a deficit cumulativi per una mancata replezione delle riserve (Hindsmarsh et al., 2000).

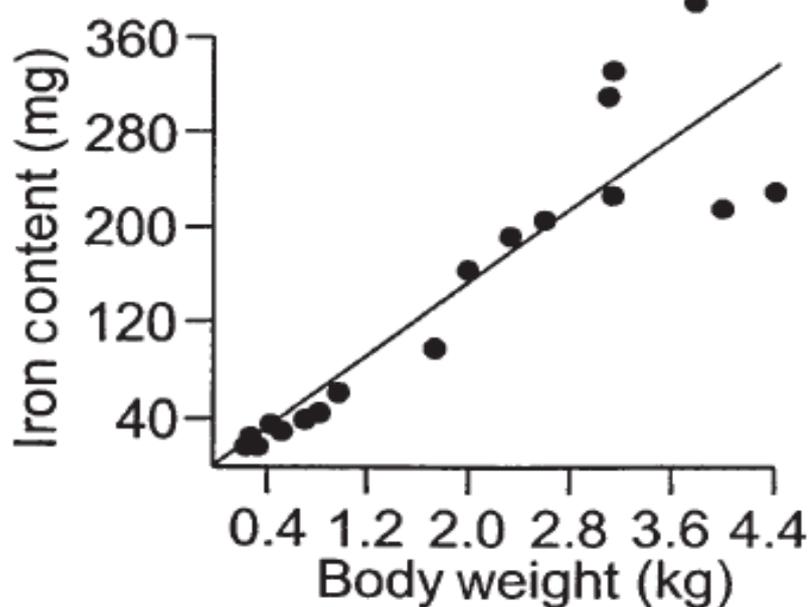
Country	Prevalence of anaemia in pregnant women %	Maternal deaths from anaemia
Afghanistan	-	-
Bangladesh	74	2600
Bhutan	68	<100
India	87	22,000
Nepal	63	760
S. Asia Region Total		25,560
World Total		50,000

**Tabella 1: Prevalenza dell'anemia in gravidanza e mortalità materna.** (Kalaivani, 2009).

Un aumento del 50% nell'intake giornaliero di ferro con la dieta è raccomandato durante la gravidanza, nonostante la temporanea assenza delle perdite ematiche mestruali. Il fabbisogno di ferro aumenta sensibilmente durante la seconda parte della gravidanza in relazione all'espansione della massa eritrocitaria e alla maggiore domanda da parte dell'unità feto-placentare in crescita. Una parte del fabbisogno deve poi coprire le perdite ematiche ed i lochi al parto. Il successo nella soddisfazione di tale aumentata richiesta dipende dall'entità delle scorte pregravidiche e dall'apporto alimentare di Fe assorbibile durante la gestazione. L'elevata incidenza di anemia durante la gravidanza indica tuttavia che gli adattamenti fisiologici siano spesso insufficienti a soddisfare le richieste. Come risultato, la supplementazione marziale durante la gravidanza è pratica comune in tutto il mondo.

Durante la gravidanza, la richiesta di ferro varia sensibilmente in ciascun trimestre. Essa si riduce nel I trimestre di gestazione per il venire meno delle perdite mestruali, fatto quest'ultimo che rappresenta un risparmio di ferro di circa 160 mg/gravidanza (Hallberg, 1991). Le sole perdite fisiologiche rilevabili in tale epoca sono costituite dalle perdite obbligate per via intestinale, urinaria e cutanea (230 mg/gravidanza). Ci sono anche evidenze che nel I trimestre l'attività eritropoietica possa essere ridotta, con una lieve diminuzione della massa eritrocitaria (Taylor, 1979) e dei reticolociti ed un aumento della ferritina sierica (Kaufer, 1990). Durante il II trimestre, il fabbisogno di ferro inizia ad aumentare con un pattern che rimarrà costante nell'epoca successiva. L'aumento del consumo di ossigeno sia nella madre sia nel feto è associato a cambiamenti ematologici maggiori. La maggior parte degli studi in donne supplementate con ferro mostra un

cambiamento nella volemia totale del 45% circa, con un aumento del 50% del volume plasmatico e del 35% della massa eritrocitaria. L'aumento della concentrazione emoglobinica è di circa il 30%. Tradotte in fabbisogno di ferro, tali modificazioni implicano un apporto di circa 450 mg Fe/gravidanza in una donna di 55 kg (de Leeuw, 1966). Anche se tale richiesta costituisce un difficile traguardo nella seconda parte della gravidanza, essa non implica effetti a lungo termine sul bilancio ferrico, in quanto il ferro torna nei depositi corporei alla fine della gravidanza, quando gradualmente la massa eritrocitaria rientra nei livelli pregravidici. Con il progredire della gravidanza il fabbisogno di ferro per la crescita fetale aumenta in proporzione al peso fetale, con il maggiore accumulo di ferro nel III trimestre. L'uptake fetale di ferro è massimo in questa parte della gravidanza, a conferma dell'aumentato rischio di deficit marziale e anemia tipico del neonato pretermine. Il contenuto medio di ferro in un feto di 3 kg è di circa 270 mg (fig. 7).



**Figura 7:** Relazione tra contenuto fetale di ferro e peso neonatale. (tratto da: Bothwell, 2000).

Come già accennato, nella determinazione del fabbisogno gravidico di ferro, bisogna prendere in considerazione anche le perdite al parto, che implicano un dispendio medio di sangue materno equivalente a circa 150 mg di Fe ed un'ulteriore perdita pari a circa 90 mg di Fe presenti nella placenta e nel cordone ombelicale. In seguito al travaglio, è da considerarsi una perdita addizionale di circa 0.3 mg/die di Fe con l'allattamento, compensata tuttavia dall'assenza della perdita mestruale.

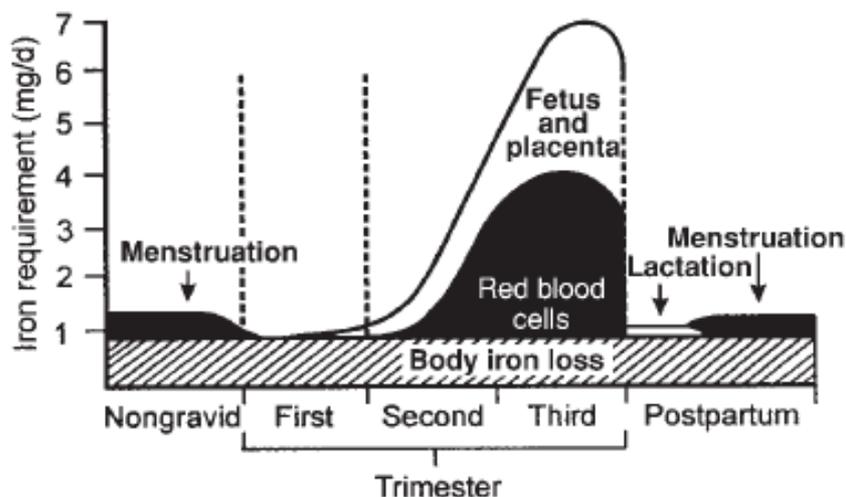
In conclusione, la richiesta totale di Fe durante la gravidanza per una donna di 55 kg è di circa 1040 mg, che sale a 1190 mg considerando le perdite al parto. Il costo netto, tuttavia, è di soli 580 mg poiché il ferro utilizzato per l'aumento della massa eritrocitaria, come già detto, viene restituito ai depositi al termine della gestazione.

La tabella 2 riassume il bilancio del ferro in gravidanza:

	Amount
	mg
Total cost of pregnancy	
Fetus	270
Placenta	90
Expansion of red blood cell mass	450
Obligatory basal losses	230
Sum	1040
Maternal blood loss at delivery	150
Total cost	1190
Net cost of pregnancy	
Contraction of maternal red blood cell mass	-450
Absence of menstruation during pregnancy	-160
Subtotal	-610
Net cost	580

**Tabella 2:** Il bilancio del ferro durante la gravidanza. (tratto da: Bothwell, 2000).

Quando la richiesta totale di Fe è tradotta in fabbisogno giornaliero, è evidente l'ineguale distribuzione che esso assume nel corso della gravidanza (figura 8).



**Figura 8:** Fabbisogno giornaliero stimato di ferro. Anche se ridotto nel I trimestre, il fabbisogno giornaliero di ferro sale a 4 e 6 mg rispettivamente nel II e III trimestre, con possibilità di picchi di 10 mg in relazione all'espansione della massa eritrocitaria (tratto da: Bothwell, 2000).

Dai dati mostrati, risulta evidente che il fabbisogno giornaliero di Fe nell'ultima parte della gravidanza non possa essere soddisfatto dal solo apporto, per quanto ottimale, con la dieta.

Il pattern di assorbimento marziale non è uniforme durante la gestazione, riducendosi probabilmente nel I trimestre e aumentando successivamente fino a raggiungere un plateau nel III trimestre (Svanberg et al., 1975). Numerosi studi indicano tuttavia che anche l'aumento dell'assorbimento di ferro che si realizza nel corso della gravidanza non sia sufficiente a supplire al fabbisogno fetale (Beard, 1994). Si stima che il fabbisogno fetale aumenti in modo esponenziale verso il termine della gravidanza, fino ad un fabbisogno quotidiano di circa 5 mg/die (Gruper et al., 2005). In diete contenenti alte quantità di ferro biodisponibile, l'assorbimento medio è di 3-4 mg/die (Hallberg, 1996), valore nettamente ridotto se si considerano apporti dietetici, come di frequente accade, non ottimali.

Da tali considerazioni deriva l'importanza delle scorte marziali pregravidiche: depositi materni pregestazionali di almeno 300 mg e un apporto nutrizionale adeguato in gravidanza sono in grado di preservare la madre ed il feto da deficit di ferro. Tuttavia, diversi studi dimostrano quanto, sia in paesi industrializzati sia, soprattutto, in paesi in via di sviluppo, i depositi pregravidici di ferro siano nettamente inferiori al valore sopra riportato (Hallberg, 1992). Non sorprende pertanto come l'anemia materna costituisca un problema tutt'oggi comune ed epidemiologicamente importante.

Alla luce di quanto detto fino ad ora, la supplementazione marziale in gravidanza al fine di *prevenirne* una deplezione assume un'importanza centrale in donne con inadeguate scorte pregravidiche e/o insufficiente intake alimentare (si pensi ai paesi in via di sviluppo). Nel 1989 l'OMS ha raccomandato la supplementazione universale di tutte le donne in gravidanza con 60 mg di ferro due volte al giorno nelle popolazioni in cui l'anemia in gravidanza è comune, e una volta al giorno nelle popolazioni con un miglior intake. Queste raccomandazioni sono state successivamente modificate, preferendo una profilassi selettiva, e non generale, in relazione al singolo caso. Il dosaggio profilattico raccomandato varia ora intuitivamente nelle diverse regioni del mondo, concretizzandosi, nei paesi industrializzati, nei 30 mg/die di ferro solfato somministrati a partire dal II trimestre, valore che raddoppia nei paesi in via di sviluppo (60mg/die) fino a raggiungere

i 120 mg/die solo laddove la supplementazione sia intrapresa dopo l'inizio del II trimestre oppure in condizioni di anemia franca.

Si è osservato come, sotto condizioni e protocolli sperimentali, la supplementazione risulti efficace nel ripristino di una buona omeostasi materna del ferro. Tale effetto positivo, tuttavia, è nettamente inferiore se si considerano piani di supplementazione nella popolazione generale, dove la scarsa compliance alla terapia riduce considerevolmente gli effetti positivi della supplementazione sugli indici di stato del ferro (Yip, 1996). A tale riguardo, un buon espediente si è dimostrato, oltre alla riduzione dei dosaggi profilattici, il protocollo di supplementazione settimanale con ferro, che, riducendo notevolmente l'incidenza di effetti collaterali gastroenterici, dose-dipendenti, frequentemente riportati con la terapia quotidiana con ferro, aumenta la compliance materna riportando risultati confrontabili sull'omeostasi del ferro (Ridwan et al., 1996; Beard, 2000; Cook, 1995; Beard, 1998).

Controverse sono state le opinioni riguardo all'influenza dello stato materno di ferro su quello fetale. In passato, si riteneva che il deficit materno avesse scarso, se non nullo, effetto sull'apporto fetale di ferro (MacPhail, 1980). Tuttavia, un consistente numero di studi ha dimostrato successivamente una correlazione positiva tra stato materno e neonatale di ferro, suggerendo che il feto sia vulnerabile al deficit marziale materno durante la vita intrauterina (Gaspar, 1993), particolarmente con gradi crescenti di severità dell'anemia materna (Singla, 1996).

Deficit ed eccesso di ferro intaccano significativamente lo sviluppo e le funzioni di eritrociti, cervello, cuore e fegato (Berant, 1992; Grantham, 2001; Lieu, 2001). Tessuti ed organi fetali e neonatali, a confronto con le controparti del bambino e dell'adulto, sono esposti ad un maggior rischio sia di deficit marziale, in quanto presentano un alto tasso di crescita e sviluppo cellulare, sia di eccesso, a causa della minore capacità ferro-legante e delle povere difese antiossidanti (Bracci 2002; Chuckalingam, 1987).

Le conseguenze della sideropenia materna possono essere distinte in conseguenze a breve e a lungo termine. Il deficit materno di ferro si ripercuote direttamente sulle scorte fetali del micronutriente (Gambling, 2002); tuttavia, l'entità del deficit fetale risulta marcatamente inferiore rispetto alla controparte materna. La sideropenia materna ha anche un impatto diretto sui depositi marziali della vita neonatale precoce; in accordo con i ritrovamenti

fetali, anche il neonato è sideropenico (Gambling et al., 2003). Anche nell'uomo, si è stabilita una relazione diretta tra la concentrazione dei depositi marziali nel fegato fetale e i livelli plasmatici materni di Fe, suggerendo che i neonati da madri con deficit di ferro avrebbero scarsi depositi del micronutriente, pur non essendo presente alla nascita una correlazione significativa tra Hb materna e Hb cordonale (Singla et al., 1985). Diversi studi hanno dimostrato che il deficit materno costituisca inoltre un fattore di rischio per sideropenia nell'infanzia (Preziosi et al., 1997; Allen, 2000; Halvorsen, 2000).

L'anemia in gravidanza può avere importanti ripercussioni sia per la madre sia per il feto. Nelle madri, la carenza di ferro aumenta l'incidenza di preeclampsia (Rayman et al., 2002). Inoltre la donna anemica è ad alto rischio di necessità di trasfusione al parto (Singh et al., 1998) e presenta un'aumentata mortalità (**tabella 2**): uno studio inglese del 1958 dimostrava una mortalità materna doppia per Hb <9 g/dL rispetto al tasso corrispondente di donne non anemiche.

Un insufficiente apporto di ferro durante la gravidanza aumenta fortemente il rischio di basso peso alla nascita e di ritardo di sviluppo nella crescita del bambino (in particolare a livello neurologico) (Beard et al., 2007; Allen et al., 2000; Malhotra et al., 2002; Gambling et al., 2003). La relazione Hb materna/peso neonatale sembra essere complessa e U-shaped: alti valori di Hb nel III trimestre indicano usualmente un'insufficiente espansione del volume plasmatico, fattore questo correlato al basso peso alla nascita (Steer, 2000; Garner, 1981); numerosi studi riportano peraltro la nascita di neonati di basso peso da donne anemiche, con una relazione con la severità della patologia (Hemminki, 1991; Singla, 1997). L'anemia sideropenica materna precoce è inoltre correlata al rischio di parto pretermine (Scholl, 2005; Lu et al., 1991). Un rischio doppio di tale evento è associato all'anemia sideropenica che si manifesti nel II trimestre, ma non del III (dove è invece un aumento dell'Hb e dell'Hct, ad indicare un'insufficiente espansione plasmatica, a implementare il rischio di prematurità); il rischio non è aumentato dalla anemia senza deficit di ferro (Scholl, 1992). Tali effetti risultano correlati all'entità del deficit marziale: sideropenie lievi nella madre non hanno marcati effetti sul peso fetale o placentare (Sherman & Moran, 1984). Diversi studi correlano inoltre l'anemia materna all'APGAR score (Rusia, 1995; Preziosi, 1997). L'aumento del peso placentare e del rapporto peso placentare/peso fetale alla nascita è uno degli indicatori correlati allo sviluppo di patologie

nell'adulto, come malattie cardiovascolari e diabete mellito (Barker et al., 1993; Phipps et al., 1993). Nei primi anni '90, l'anemia materna e il deficit di ferro sono stati correlati ad un aumento di tali parametri (Godfrey et al., 1991). Successivamente tale riscontro è stato confermato da numerosi studi (Williams et al., 1997; Lao, 1997; Hindmarsh et al., 2000). Conseguenze in età adulta del deficit prenatale di ferro sono rappresentate da problemi cardiovascolari e deficit immunitari (Lozoff et al., 1996; Zimmerman et al., 2007; Godfrey et al., 1991; Godfrey et al., 1995; Davis et al., 2005).

I meccanismi d'azione, mediante i quali il deficit di ferro comporta gli effetti di cui sopra, sembrerebbero essere sia diretti sia indiretti.

La deplezione di ferro può esercitare effetti diretti riducendo l'attività di enzimi utilizzando il ferro come cofattore. Modelli animali indicano che gli enzimi coinvolti nella sintesi di neurotrasmettitori e dell'energia neuronale possono essere perturbati in corso di deficit marziale materno. Per esempio, Taneja et al. (1990) hanno dimostrato che la sideropenia materna conduca ad una riduzione del metabolismo dell'acido gamma-amino-butirrico che non risulta reversibile dalla supplementazione postnatale di ferro. Inoltre, aree cerebrali coinvolte in funzioni cognitive superiori presentano minore attività della citocromo c ossidasi in neonati di ratti nati da madri sideropeniche (Deungria et al., 2000).

Con l'eccezione dello sviluppo cerebrale, i restanti effetti a breve e lungo termine della deplezione materna di ferro sembrerebbero essere indiretti. Probabilmente uno dei fattori implicati a questo riguardo è la modulazione della funzione placentare da parte del ferro. In uno studio del 2001, Lewis et al. hanno dimostrato che, in modelli animali, il deficit materno di ferro si traduceva in una riduzione della superficie vascolare placentare che potrebbe implicare una diminuzione del trasporto transplacentare di nutrienti e ossigeno dalla madre al feto. Gli Autori hanno rilevato, in effetti, una riduzione dei livelli fetali di aminoacidi e acidi grassi polinsaturi. Interessanti sono inoltre gli studi che indagano la correlazione tra stato placentare di ferro, concentrazione di citochine e outcomes della gravidanza. Per esempio, elevati livelli di TNF $\alpha$  nell'interfaccia materno-fetale sono associati ad aborti spontanei precoci e morti endouterine fetali in modelli animali e a parto pretermine nell'uomo (Lea & Calder, 1997). Inoltre, bassi livelli di TNF $\alpha$  sono stati riscontrati in placente e cellule immunitarie deciduali di gravidanze normali. Si è osservato che TNF $\alpha$  induce apoptosi nelle cellule placentari e può quindi rivestire un ruolo centrale nel re-modeling e nel turnover fisiologico del trofoblasto (Lea et al., 1999).

Il TNFalpha sembra anche in grado di modulare la produzione steroidea placentare ed interferire con i meccanismi di trasporto di aminoacidi. Poiché tali effetti benefici e deleteri della citochina sono concentrazione-dipendenti, la regolazione dell'espressione di TNFalpha nell'interfaccia materno-fetale risulta cruciale per il successo dello sviluppo feto-placentare. La relazione tra stato di ferro e citochine è stata oggetto di numerosi studi. La maggior parte di essi indaga gli effetti delle citochine sul trasporto placentare di ferro. Recentemente tuttavia diversi gruppi hanno indagato l'effetto dello stato marziale sulla produzione di TNFalpha. Scaccabarozzi et al. (2000) hanno mostrato che la supplementazione di ferro aumenta, mentre la desferrioxamina (un chelante del ferro) diminuisce, la produzione di TNFalpha da parte dei monociti. Gambling et al. nel 2001 hanno dimostrato un significativo aumento dell'espressione di TNFalpha e TNFalphaR1 nelle placente di ratti con deficit di ferro. Sembra quindi probabile che anche la modulazione dell'espressione citochinica placentare da parte del ferro possa spiegare gli effetti a breve e lungo termine di cui si è precedentemente discusso. Si è, infine, supposto che effetti a lungo termine, (come per esempio l'ipertensione arteriosa in adulti con ridotto uptake prenatale di ferro) possano dipendere da un inadeguato sviluppo renale in termini di numero di nefroni e superficie di filtrazione disponibile (Lisle et al., 2003).

Un'ultima considerazione riguarda gli studi che hanno indagato lo status di ferro in neonati di basso peso alla nascita (LBW, Low Birth Weight) con IUGR e in nati pretermine da madri con adeguato bilancio marziale. Uno studio recente del 2008 (K.E. Elizabeth) ha indicato una riduzione statisticamente significativa della concentrazione di ferro nel sangue funicolare al parto di neonati LBW, sia a termine sia pretermine, rispetto a neonati AGA, ad indicare una riduzione dell'uptake fetale di ferro. Georgieff et al. (1995) hanno rilevato una riduzione significativa della concentrazione epatica media di ferro in nati a termine e pretermine con IUGR e neonati da madri con ipertensione severa, accomunati quindi da un fenotipo comune di insufficienza placentare.

## ***Le fonti alimentari di alcuni micronutrienti essenziali in gravidanza***

### **Ferro**

Il fabbisogno di ferro aumenta durante la gravidanza, specialmente negli ultimi stadi. L'anemia, dovuta a carenza di ferro, è comune in gravidanza sia per chi è vegetariana e per chi non lo è. Le vegetariane dovrebbero prestare attenzione soprattutto ad includere nella propria dieta abbondanti quantità di ferro, poiché le fonti vegetali non vengono assorbite altrettanto bene rispetto alle altre. Buone fonti di ferro vegetali si trovano nei cereali integrali, legumi, ortaggi verdi e frutta secca. L'assorbimento del ferro è potenziato se unito all'assunzione di vitamina C, presente nella frutta fresca e nella verdura. Il tè contiene tannino, il quale può inibire l'assorbimento del ferro, perciò è da evitare da un'ora prima a un'ora dopo i pasti.

### **Calcio e Vitamina D**

Durante la gravidanza, il corpo richiede un maggiore apporto di calcio, specialmente negli ultimi stadi, per permettere alle ossa del bambino di svilupparsi. In gravidanza l'assorbimento di calcio da parte dell'intestino è più efficiente, e questo dovrebbe bastare a fornire il fabbisogno necessario. Buone fonti di calcio sono gli ortaggi verdi, le mandorle, i semi di sesamo o tahini, il latte vaccino, il tofu, i formaggi, lo yogurt, i cereali integrali e i legumi.

La vitamina D è essenziale per l'assorbimento del calcio ed è prodotta dai raggi solari, dalla margarina e dai latticini.

### **Folato**

Il folato è una vitamina del gruppo B necessaria in dosi maggiori nel periodo della gravidanza. Ricerche hanno dimostrato che una carenza di folato può portare a malformazioni congenite. Le migliori fonti di questa vitamina si trovano in vegetali a foglia verde, frutta, arachidi, estratto di lievito e cereali integrali.

## **Vitamina B12**

La vitamina B12 è essenziale per la crescita e lo sviluppo del feto. Se nella dieta rientrano quantità adeguate di latticini, uova e estratto di lievito vitaminizzato, il livello di vitamina B12 dovrebbe essere sufficiente.

## ***Relazione tra nutrizione materna e sviluppo di Pre-eclampsia***

La pre-eclampsia è un disordine gravidico legato ad una inadeguata angiogenesi placentare nel primo trimestre di gravidanza. Sono state identificate diverse molecole indicatrici di una inadeguata angiogenesi placentare e perfusione uteroplacentare, la cui alterata espressione si ritrova in gravidanze complicate da PE a partire dal primo trimestre. Vascular endothelial growth factor (VEGF) è un potente fattore angiogenico placentare che stimola la produzione di cellule endoteliali e incrementa la permeabilità vascolare nella placenta. Placental Growth Factor (PIGF) si trova nel sinciziotrofoblasto in diretto contatto con la circolazione materna e, come VEGF, stimola la proliferazione dell'endotelio vascolare. Solubile fms-like tyrosine kinase (sFlt-1) è prodotto dalla placenta e agisce da antagonista dei fattori angiogenici VEGF e PIGF legando i loro rispettivi recettori. Endoglin (sEng) è un potente fattore antiangiogenico che inibendo la funzione endoteliale induce ipertensione, proteinuria e restrizione di crescita intrauterina in modelli animali. È stato dimostrato che l'alterazione del rapporto PIGF/sFlt-1 x sEng è un potente marker predittore di PE (Lim J et al., 2008). Un recente studio (Eileen R. et al., 2012) ha analizzato il ruolo della nutrizione materna, nel primo trimestre di gravidanza, sullo sviluppo placentare e sullo sviluppo di PE; in particolare ha evidenziato una correlazione positiva tra apporto di nutrienti quali vitamina D, vitamina B12, vitamina B2, ferro e zinco e il rapporto PIGF/sFlt-1 x sEng. L'inizio della PE è stata connessa con una inadeguata assunzione di nutrienti ricchi in antiossidanti (acidi grassi omega-3 e vitamina D); un'insufficiente apporto di nutrienti quali acidi grassi poliinsaturi ricchi in omega 3, vitamina D, calcio, ferro e folato nel primo trimestre di gravidanza è stato osservato in donne che svilupperanno PE. In particolare vitamine e minerali hanno una rilevante influenza sul rapporto PIGF/sFlt-1 x sEng che a sua volta è un importante fattore predittore di PE.

Quindi lo stato nutrizionale materno nel primo trimestre di gravidanza ha un profondo effetto sull'esito della gravidanza. Il successo dell'impianto placentare è influenzato dalla struttura genetica materna e fetale e dal rifornimento materno di nutrienti. Una inadeguata nutrizione materna, già nel primo trimestre di gravidanza, altera l'ambiente ormonale intrauterino con conseguenti effetti avversi sullo sviluppo placentare predisponendo così allo sviluppo di PE.

## TRASPORTO PLACENTARE DEL FERRO

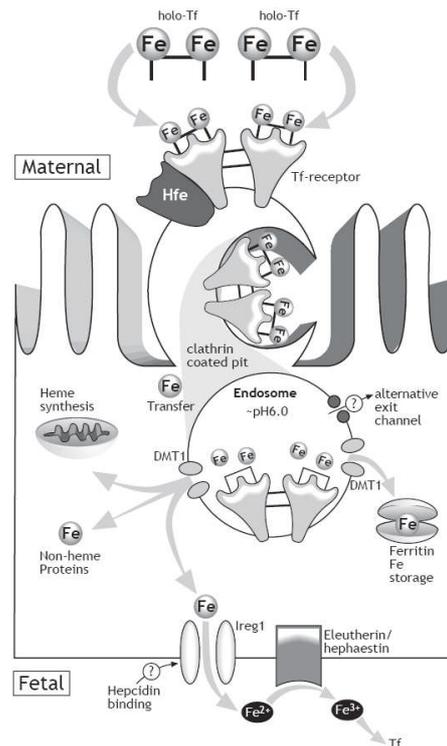
Nel corso della gravidanza c'è un progressivo aumento del trasporto del ferro placentare. Il ferro viene trasportato nel feto contro gradiente così che anche in carenza di ferro materno, la placenta può proteggere consistentemente il feto mediante meccanismi di compensazione.

Dopo essere stato assorbito dall'intestino materno, il ferro viene incorporato nel siero dove è legato alla proteina di trasporto transferrina che possiede due siti di legame ad affinità simile per esso. Il complesso ferro-transferrina raggiunge il fegato materno dove il ferro viene immagazzinato legato alla ferritina, proteina di deposito intracellulare. Durante la gravidanza l'immagazzinamento di ferro nel fegato materno diminuisce significativamente a causa presumibilmente di segnali di derivazione fetale (Gambling et al, 2003). Dopo il rilascio dalla ferritina come  $Fe^{2+}$  esso viene ossidato dalla ferrossidasi ceruloplasmina a  $Fe^{3+}$  e incorporato nella transferrina a livello della superficie degli epatociti materni. Il complesso transferrina- $Fe^{3+}$  viene trasportato dal siero alla placenta. Sulla membrana microvillare apicale della cellula placentare il complesso transferrina- $Fe^{3+}$  si lega con alta affinità al recettore per la transferrina (TfR). (fig.8)

Il nuovo complesso  $Fe^{3+}$ -transferrina-TfR viene incorporato in vescicole ricoperte da clatrina e internalizzato (fig. 9). All'interno della vescicola il pH è ridotto per effetto di una pompa protonica  $H^+$ -ATPasi. A questo basso pH(5.5) l'affinità della transferrina per il ferro diminuisce provocando la scissione tra ferro e complesso transferrina-TfR. Il complesso transferrina-TfR viene riciclato sulla superficie cellulare dove andrà incontro a dissociazione in seguito all'innalzamento del pH (7.4).

A questo punto il  $Fe^{2+}$  presente nella vescicola viene traslocato al citoplasma per mezzo del canale *divalent metal transporter 1* (DMT1) (Chong WS et al, 2005). E' possibile che all'interno della cellula siano presenti proteine, ad oggi non ancora identificate, in grado di mantenere il ferro nella forma  $Fe^{2+}$  prevenendo la sua riossidazione a  $Fe^{3+}$  in modo da impedire reazioni chimiche incontrollate che possano generare radicali liberi (Gambling L. et al,2011). Infine il ferro è rilasciato dalla cellula attraverso la proteina di trasporto ferroportina (FPN), situata nella membrana basolaterale della cellula placentare e nuovamente ossidato a  $Fe^{3+}$  dalla ferrossidasi zyklopen permettendo alla transferrina fetale di legarsi ad esso (Chen et al, 2010). Il trasporto placentare del ferro potrebbe essere mediato anche da proteine trasportatrici del gruppo heme. Feline-Leukemia, Subgroup-C, Receptor-1 (FLVCR1) e Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) sono proteine coinvolte nel trasporto cellulare del gruppo

heme in vari tessuti, ed è stato dimostrato che la loro espressione è molto alta nelle placente umane (Keel et al. 2008; Jonker et al. 2002). FLVCR1 trasporta i gruppi heme fuori dalla cellula prevenendo l'accumulo di gruppi heme liberi derivanti dal catabolismo dei globuli rossi circolanti. BCRP è situato nella membrana microvillare del sinciziotrofoblasto e precedenti studi hanno suggerito che la sua parziale o completa assenza può condurre ad alterazioni nel metabolismo del ferro (Jonker et al. 2002).



**Figura 9:** Rappresentazione schematica del trasferimento del ferro attraverso la placenta. In breve, la Transferrina complessata al Fe<sup>3+</sup>, lega il recettore per la transferrina, il complesso transferrina-Fe<sup>3+</sup>-Tfr viene internalizzato in vescicole. Il ferro viene poi rilasciato nel citoplasma in seguito all'acidificazione delle vescicole attraverso il canale DMT1 ed esce dalla cellula attraverso la proteina di trasporto ferroportina situata sulla membrana basale. Il ferro viene infine trasferito al feto dalla transferrina. (fonte: "Journal of Neuroendocrinology").

## ***Recettore della Transferrina (TfR1)***

Il Recettore della Transferrina 1 (TfR1) è un trasportatore del ferro situato sulle membrane basolaterali placentari la cui quantità è direttamente proporzionale alla quantità di ferro nel fegato fetale. TfR1 è una proteina trans membrana N- ed O- glicosilata, che media l'assorbimento del ferro legando ed internalizzando la Transferrina diferrica. Nella placenta il ferro extracellulare lega la Transferrina, che a sua volta lega il TfR1 situato sulle membrane microvillari (McArdle et al., 1984). In seguito al legame, il complesso è internalizzato tramite vescicole (McArdle et al., 1985). (vedi *fig 8*).

Nel corso della gravidanza c'è un progressivo aumento del trasporto del ferro placentare. Il ferro viene accumulato nel feto contro gradiente e, in caso di carenza di ferro materna, la placenta può proteggere consistentemente il feto mediante meccanismi di compensazione. Per esempio, Gambling ed i suoi collaboratori hanno nutrito ratti con livelli di ferro tali da ridurre le riserve nel fegato materno di circa il 73% al giorno 21,5 di gravidanza; nel fegato del feto però le riserve al medesimo giorno erano state ridotte solo del 50% rispetto ai controlli (Gambling et al., 2002; Gambling et al., 2001). Anche nella placenta i livelli di ferro erano decresciuti, ma i meccanismi per cui questo accade sono ad oggi ancora poco chiari. Dunque, l'anemia materna aumentava l'efficienza di assorbimento del ferro da parte del feto a scapito della placenta. L'espressione di TFR1 a livello di mRNA e proteina nelle placente del ratto al giorno 21 di gestazione aumentava con l'aumentare dell'anemia materna, incrementando l'efficienza del flusso di ferro al feto e quindi minimizzando la severità dell'anemia fetale.

La over-espressione di *TFR1* è una caratteristica comune nelle forme tumorali umane (O'Donnel et al., 2006; Qing et al., 2006, Tao et al., 2007). Strategie terapeutiche che interferiscono con il metabolismo tumorale del ferro, sono state disegnate *in vitro* usando TfR come target, ma l'effetto anti-tumorale trova ancora alcuni limiti *in vivo* (Qing et al., 2006). Essendo l'ipossia considerata una delle più importanti caratteristiche del microambiente tumorale, Tao ed i suoi collaboratori (2007) hanno indagato l'espressione di *TFR1* in cellule tumorali sottoposte a condizioni ipossiche, riscontrando effetti divergenti a tempi di incubazione diversi; inizialmente si ha infatti una diminuzione dell'espressione di *TFR1*, che con il passare del tempo viene invece over-espresso dalle cellule tumorali.

Negli esperimenti *in vitro* su cellule di mammifero, il TfR1 è comunque generalmente considerato un marcatore dell'ipossia; i meccanismi molecolari attraverso cui avviene la sua over-espressione sono stati parzialmente indagati *in vitro*; Lok et al. (1999) hanno dimostrato che l'Hypoxia Inducing Factor 1 (HIF1), che viene prodotto in condizioni di ipossia, lega una sequenza specifica nel promotore di *TfR1*, inducendone la trascrizione. È stato inoltre dimostrato che l'espressione di *TfR1* è anche regolata post-trascrizionalmente dalla concentrazione del ferro intracellulare (Lee et al., 2006).

*In vivo*, però, gli effetti dell'ipossia sul *TfR1* appaiono essere opposti (Zamudio et al., 2006; Robach et al., 2007). Zamudio e i suoi collaboratori nel 2006 dimostrano che in placenti di donne che vivono ad alte quote, in condizioni quindi di ipossia permanente, la quantità proteica di TfR1 è ridotta del 32% rispetto alle placenti di donne che vivono a basse altitudini. Il gruppo di Robach invece, riscontra una diminuzione dell'espressione di *TfR1* nel muscolo scheletrico umano, dopo una permanenza di 7-9 giorni ad alta quota.

I meccanismi attraverso i quali l'ipossia possa regolare l'espressione di *TfR1* sono dunque ancora poco chiari.

## ***Ferroportina***

### **Caratteristiche funzionali**

La ferroportina (FPN), anche conosciuta come Ireg1 (*iron regulated-transporter-1*) o MTP1 (*metal transporter protein-1*) è l'unico membro della famiglia di trasportatori SLC40. La proteina è espressa a livelli elevati negli enterociti maturi del duodeno, nel sinciziotrofoblasto placentare che separa il circolo materno da quello fetale e nei macrofagi responsabili del riciclo di ferro derivato dalla lisi dei globuli rossi.

La ferroportina lega il Fe(II) presente nel citoplasma e interagendo con una ferrossidasi tessuto-specifica permette l'estrusione del metallo dalla cellula nella sua forma Fe(III), così da facilitarne il legame con la transferrina circolante. Nella placenta la FPN è espressa sulla membrana basolaterale del sinciziotrofoblasto, l'espressione a questo livello suggerisce un suo ruolo nel trasferimento di ferro dalla madre al feto (Donovan et al. 2000).

### **Regolazione Genica e Proteica**

Il ferro è un elemento altamente reattivo che ha la capacità di accettare e donare elettroni; questa sua capacità è essenziale per la sua funzione di cofattore enzimatico ma può generare reazioni cellulari incontrollate con generazioni di radicali liberi e conseguente ossidazione lipidica e danni alle membrane cellulari. Si rendono quindi necessari per la cellula una serie di meccanismi regolatori che impediscono che ciò accada. Inoltre la regolazione del trasporto del ferro placentare è essenziale perché venga assicurato un rifornimento adeguato di questo elemento essenziale al feto.

La regolazione della ferroportina è tessuto specifica. Nel RNA messaggero della ferroportina è presente al 5' UTR un Iron Regulatory Element (IRE) conservato al 100% tra topo, ratto e uomo, ciò indica un suo importante ruolo regolatorio. Questo elemento IRE è attivo e lega sia Iron Regulatory Protein 1 (IRP1) che Iron Regulatory Protein 2 (IRP2) (Mckie et al. 2002) anche se non si conoscono ancora gli effetti regolatori sulla ferroportina di questa interazione IRE/IRP.

Quando il ferro è presente in eccesso, esso lega le IRPs (Iron Reggulatory protein) causando il loro rilascio dalle IRE (Iron Regulatory Element). Quindi in presenza di un eccesso di ferro il rilascio delle IRPs dalle IRE destabilizza l' RNA messaggero del recettore della transferrina (TfR 1) così che esso verrà degradato impedendo un ulteriore ingresso di ferro nella cellula.

Inoltre in presenza di un eccesso di ferro, il rilascio delle IRPs dalle IRE rimuove il blocco della traduzione della ferritina così che venga favorita una sua maggiore produzione (Gambling L. et al. 2011).

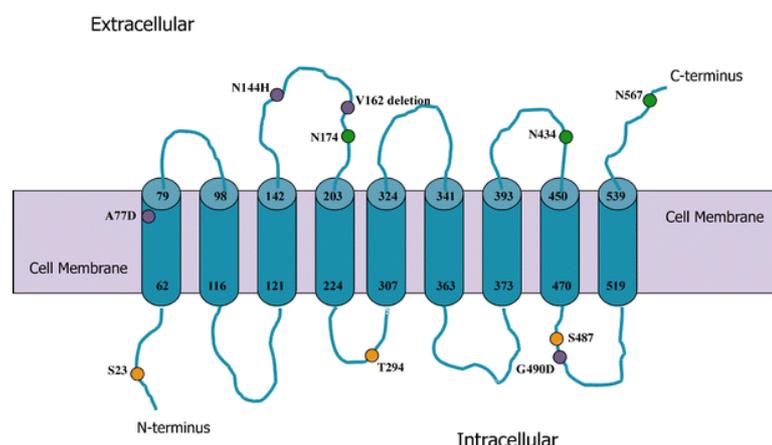
La ferroportina è inoltre modulata negativamente da un peptide prodotto dal fegato sia materno che fetale chiamato hepcidina, essa si lega alla ferroportina internalizzandola e indirizzandola verso la degradazione. L'hepcidina è indotta da accumulo di ferro e da stati infiammatori (IL-6), mentre è inibita da stati di anemia e ipossia (Park CH et al. 2001).

### Struttura proteica

La ferroportina è codificata dal gene SLC40 situato sul cromosoma 2 in posizione q32 e lungo 3442bp.

Il prodotto proteico ha una lunghezza di 571aa ed ha un peso molecolare di 62542 Dalton.

È altamente conservata tra i mammiferi, infatti la sequenza della ferroportina umana ha un'omologia del 90%-95% con quella del ratto e del topo. La struttura primaria suggerisce che la ferroportina abbia almeno nove domini alfa-eliche transmembrana con l'N-terminale situato nello spazio intracellulare e il C-terminale in quello extracellulare (*fig. 10*). Si presuppone che la ferroportina sia uno scambiatore oppure un trasportatore facilitato; lo studio di questa proteina è difficile da attuare poiché la sua espressione risulta tossica in colture cellulari, rendendo difficile generare linee cellulari stabili che esprimano la proteina.



**Figura 10:** Modello di struttura e topologia di membrana della proteina ferroportina umana. Sono mostrate le posizioni delle mutazioni che causano difetto nel riciclo del ferro (McKie AT et al 2003).

### *Mutazioni aminoacidiche*

La patologia più rilevante caratterizzata da accumulo di ferro è l'emocromatosi genetica. La maggior parte dei casi di emocromatosi è attribuibile a mutazioni del gene HFE (Feder et al. 1996), codificante per una proteina che lega il recettore per la transferrina regolando l'assorbimento cellulare di ferro. In una ristretta percentuale di casi l'emocromatosi è dovuta a mutazioni di altri geni coinvolti nel metabolismo e nel trasporto del ferro come il recettore per la transferrina, la ferroportina e l'epcidina. Sono state descritte quattro mutazioni nel gene della ferroportina che in eterozigosi causano una rara emocromatosi autosomica dominante chiamata di tipo IV, che presenta importanti differenze cliniche rispetto a quella classica causata da mutazione del gene HFE (Devalia V et al. 2002). In questi pazienti il malfunzionamento della ferroportina non permette il riciclo, da parte dei macrofagi, del ferro derivato dalla demolizione dei gruppi eme. Quindi la disfunzionalità della ferroportina intrappola il ferro all'interno dei macrofagi, impedendone il riciclo e la sua disponibilità per la sintesi di nuova emoglobina.

La ferroportina potrebbe rappresentare un target farmacologico in pazienti colpiti da patologie da sovraccarico di ferro come la talassemia in cui l'eritropoiesi aumenta ma è inefficace e si assiste ad un continuo incremento nell'assorbimento di ferro. Bloccando la ferroportina si potrebbe fermare l'esportazione cellulare del ferro provocando una riduzione dell'assorbimento del ferro stesso.

Questa terapia risulta di difficile attuazione poiché sarebbe necessario bloccare la ferroportina solo in alcuni tessuti come l'intestino, inoltre bloccando il rilascio di ferro si corre il rischio di avere come risultato un fenotipo simile all'emocromatosi di tipo IV.

# **FERRO E RITARDO DI CRESCITA INTRAUTERINO**

Nella restrizione di crescita intrauterina (IUGR) il feto non riesce a raggiungere il suo pieno potenziale di crescita a causa di un ridotto apporto di nutrienti, quindi alterazioni nel trasporto placentare di nutrienti sono chiaramente coinvolti nel fenotipo IUGR (Sibley et al. 2005). La carenza di ferro in gravidanza è associata a basso peso alla nascita e parto prematuro poiché il ferro è un micronutriente essenziale per la crescita e lo sviluppo embrionale, inoltre è associata a malattie cardiovascolari nella vita adulta (Allen et al. 2000).

Studi sul ratto hanno ulteriormente sottolineato l'importanza di questo micronutriente in gravidanza. In questi esperimenti si è visto che quando i livelli di ferro nella madre sono ridotti del 30% rispetto ai controlli, i livelli di ferro nel rispettivo feto rimangono comunque al di sopra del 70% (Gambling et al. 2003). Quindi in condizioni fisiologiche la placenta è in grado di minimizzare gli effetti di una deficienza di ferro up-regolando le proteine placentali coinvolte nel suo trasferimento dalla madre al feto (Gambling et al. 2001).

Il trasporto del ferro, potrebbe essere limitato nella placente di gravidanze con IUGR. Un recentissimo studio ha misurato l'espressione genica e proteica del Recettore della Transferrina (TFRC), proteina coinvolta nel trasferimento di ferro attraverso la placenta, in 50 placente IUGR e in 56 placente fisiologiche. Questo esperimento ha messo in luce una espressione del TFRC significativamente più bassa nelle placente IUGR rispetto alle placente fisiologiche di controllo. (C. Mandò et al. 2011). Inoltre diversi studi hanno descritto una carenza di ferro nel sangue del cordone ombelicale in bambini nati con basso peso alla nascita, in bambini nati da parti prematuri e da gravidanze IUGR (Georgieff et al. 1995, Chockalingam et al. 1987). Un'altra condizione che caratterizza il fenotipo IUGR è l'ipossia ovvero una diminuzione dei livelli di ossigeno fetale. L'ipossia è in grado di regolare l'espressione di alcune proteine coinvolte nel trasporto del ferro: per esempio nello studio citato sopra è stata evidenziata una relazione positiva tra i livelli di espressione del TFRC e la pO<sub>2</sub> nella vena ombelicale sia in placente fisiologiche che in placente IUGR. In conclusione molte evidenze sperimentali consentono di dedurre che nelle gravidanze IUGR ci possa essere una alterazione nell'espressione e/o nell'attività di alcuni componenti coinvolti nel trasporto di ferro placentare.

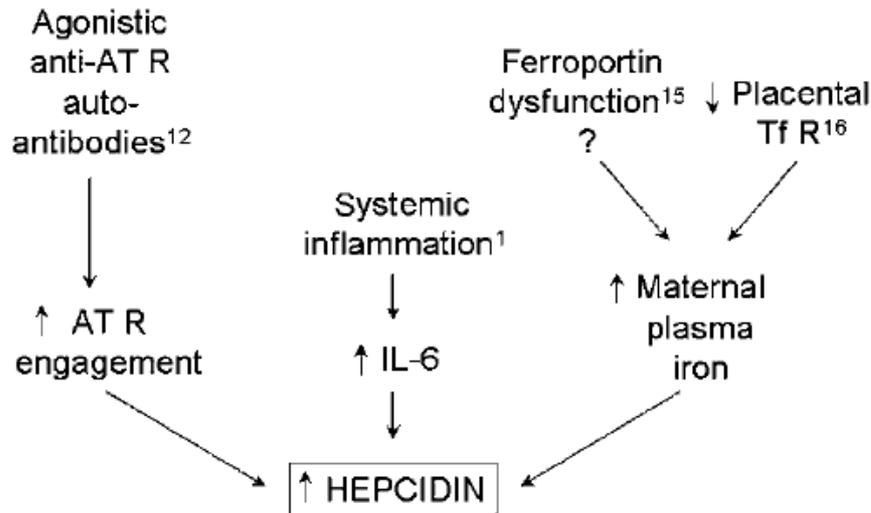
## **FERRO E PRE-ECLAMPSIA**

La vasocostrizione, il danno alle cellule endoteliali e l'infiammazione sistemica hanno un importante ruolo nella patogenesi della pre-eclampsia (PE). Infatti, in seguito al danno da ischemia/reperfusion, che si verifica nelle placente di gravidanze pre-eclampiche, si ha il rilascio nella circolazione materna di fattori antiangiogenici e infiammatori quali microparticelle del sinciziotrofoblasto (SCT), solubile fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1), Endoglin (sEng), citochine proinfiammatorie (IL6) e plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) che contribuiscono al danno placentare e alle disfunzioni dell'endotelio materno. Inoltre la presenza di ischemia/reperfusion nelle placente PE, aumenta la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) le quali provocano ossidazione lipidica e danno alle proteine cellulari placentali. (Many A, et al., 2000). In particolare, l'aumento dell'età gestazionale e lo shift da una condizione placentare ipossica ad una più ricca in concentrazione di ossigeno portano ad una maggiore produzione di ROS che, in presenza di metalli di transizione quali il ferro, danneggiano l'architettura dei villi placentari (Entman SS, et al., 1987).

Poiché è noto che in seguito ad uno stato infiammatorio si verificano alterazioni nell'espressione di proteine coinvolte nel metabolismo del ferro (Cairo G et al. 2011) si può supporre che l'espressione di proteine di trasporto del ferro nelle placente di gravidanze PE possano essere alterate. Un'alterazione nell'uptake e nel trasporto del ferro placentare può alterare l'ossigenazione della placenta.

Solo pochi studi hanno investigato la relazione tra ferro e pre-eclampsia; è stato dimostrato che la concentrazione di ferro e di ferritina nel plasma materno risultano maggiori nel siero di donne gravide PE rispetto ai controlli (CT). Poiché il ferro può indurre la generazione di ROS, è stato suggerito che una più alta concentrazione di ferro possa contribuire alla patogenesi della PE esacerbando la perossidazione lipidica e il danno alle cellule endoteliali (Basher K et al., 2006; Rayman MP et al., 2002).

L'incremento della concentrazione di ferro nel siero di donne con gravidanze PE è però in contraddizione con lo stato di infiammazione sistemica che caratterizza la preeclampsia. Infatti è stato dimostrato che l'infiammazione cronica diminuisce la quantità di ferro biodisponibile risultando in anemia indotta da infiammazione (Balla J et al., 2007). Un recente studio ha dimostrato che l'epcidina rappresenta il link tra omeostasi del ferro, infiammazione e preeclampsia. In particolare è stato dimostrato un aumento dei livelli di epcidina, di ferro, di ferritina e di interleuchina 6 (IL-6) nel siero di gravide pre-eclampiche rispetto ai controlli (Toldi G et al., 2010).



**Figura 11:** *Fattori che potrebbero contribuire alla regolazione dell'espressione epcidina in gravidanze pre-eclamptiche (tratto da: Toldi G et al., 2010).*

Poiché l'epcidina agisce down regolando l'assorbimento e il rilascio di ferro cellulare ed è up regolata da IL-6 ci si aspetterebbe di trovare una diminuzione della concentrazione ferrica nel siero di donne con gravidanze PE rispetto ai controlli. Più studi hanno invece dimostrato un aumento della concentrazione sierica di ferro in donne con gravidanze PE rispetto ai controlli (Basher K et al., 2006; Rayman MP et al., 2002). L'incremento sia della concentrazione sierica di ferro che di epcidina potrebbe indicare che nelle gravidanze PE sia presente una resistenza all'azione dell'epcidina probabilmente dovuta a mutazioni nella ferroportina (FPN) responsabili della perdita della capacità della FPN di essere downregolata dall'epcidina, così che la FPN continui ad esportare il ferro dalle cellule.

Un altro fattore che potrebbe essere causa dell'aumento di concentrazione di ferro nel siero di donne gravide con PE rispetto ai CT è la diminuzione di espressione del Recettore della Transferrina (TfR1) in placenti PE. Tale recettore è il maggior responsabile del trasferimento di ferro dalla circolazione materna a quella fetale e la sua diminuita espressione nelle placenti PE potrebbe condurre ad un ridotto trasferimento di ferro al feto e ad un aumento di concentrazione di ferro nel siero materno (Khatun R et al., 2003; Chockalingam UM et al., 1987).

Un recente studio di analisi di espressione genica tramite DNA microarray (Seth Guller et al. 2008) ha dimostrato una up-regolazione del messaggero della Ceruloplasmina in placenti con severa PE rispetto a placenti a termine di controllo (CT) e rispetto a placenti pre-termine di

controllo (CP) di comparabile età gestazionale. Lo stesso studio ha dimostrato, tramite Western blot, anche un aumento di espressione proteica della Ceruloplasmina. La Ceruloplasmina è una proteina di trasporto del ferro, contenente rame, con attività ferroossidasi ovvero ossida lo ione ferroso  $Fe^{2+}$  in ione ferrico  $Fe^{3+}$  quest'ultimo capace di legare la transferrina. Poiché la preeclampsia è un disordine caratterizzato da un incremento placentare di ROS è stato suggerito che l'aumento di espressione di enzimi antiossidanti come la Ceruloplasmina possa, nella placente PE, costituire un importante programma cellulare endogeno in grado di mitigare gli effetti dannosi indotti da reperfusion e ischemia placentare. Infatti la Ceruloplasmina ossida lo ione ferroso ( $Fe^{2+}$ ) a ione ferrico ( $Fe^{3+}$ ) che rappresenta la forma ionica meno tossica e in questo modo limiterebbe il danno ossidativo nella placente PE.

# SCOPO DELLO STUDIO

Il ferro è un importante elemento nella crescita fetale, e la sua carenza nel sangue materno è stata correlata con basso peso alla nascita e parto prematuro (Beard et al., 2007; Allen et al., 2000; Malhotra et al., 2002; Gambling et al., 2003).

In uno studio precedente, condotto nel laboratorio in cui ho svolto il Dottorato di Ricerca, è stato dimostrato che il Recettore della Transferrina (TfR1), deputato all'ingresso del ferro nelle cellule placentari di trofoblasto, presenta una minore espressione genica e proteica in placentate di gravidanze complicate da IUGR rispetto a placentate di gravidanze fisiologiche di controllo (CT) (Mandò et al., 2011).

Lo scopo di questo studio è:

- valutare se una possibile carenza della Ferroportina (FPN), proteina deputata all'esporto del ferro dalle cellule placentari di trofoblasto, possa essere una delle cause della minore espressione genica e proteica del TfR1 osservata nelle placentate IUGR, determinando all'interno della cellula un accumulo di ferro, che è noto regolatore dell'espressione del TfR1. Per verificare questa ipotesi ho analizzato i livelli di espressione genica (mRNA) e proteica della FPN in placentate di gravidanze normali (CT) e complicate da IUGR e valutato una possibile correlazione tra l'espressione della FPN e la severità della patologia ostetrica.
- valutare la presenza di una alterazione nel trasporto placentare del ferro in gravidanze complicate da pre-eclampsia (PE) e da pre-eclampsia (PE) accompagnata da ritardo di crescita intrauterino (IUGR). A tal fine è stata analizzata l'espressione genica del Recettore della Transferrina (TfR1) e della Ferroportina (FPN) in tessuto placentare di gravidanze CT, PE e PE + IUGR.

Ulteriore scopo di questa mia ricerca è esaminare le eventuali correlazioni statistiche che intercorrono tra i parametri clinici della popolazione in esame e l'espressione delle proteine TfR1 e della FPN coinvolte nel trasporto del ferro placentare.

Poiché la dieta materna e la supplementazione con ferro in gravidanza incidono sulla biodisponibilità materna di ferro, e sono dunque fattori che influenzano lo sviluppo embrionale e fetale, altro scopo di questo studio è:

- Determinare la relazione tra intake di ferro attraverso la dieta (valutato tramite questionari alimentari semiquantitativi) e valori ematochimici materni
- Supplementazione ferro: definire le quantità minime e le formulazioni di ferro (ferro solfato-ferro liposomiale) più efficaci
- Valutare la relazione tra intake di ferro (dieta/supplementazione), parametri ematochimici materni ed esiti della gravidanza.

# MATERIALI E METODI

# **STUDIO DI ESPRESSIONE DEL RECETTORE DELLA TRANSFERRINA (TFR1) E DELLA FERROPORTINA (FPN)**

## *Caratteristiche della popolazione e raccolta dei campioni*

Campioni di placenta di gravidanze fisiologiche di controllo (CT), di gravidanze IUGR, PE e PE+IUGR sono stati raccolti al momento del taglio cesareo. Complessivamente, sono stati reclutati 33 casi di gravidanze IUGR, 10 casi di gravidanze PE, 15 casi di gravidanze PE+IUGR e 50 casi di gravidanze CT selezionati presso la Clinica Ostetrica e Ginecologica dell'Ospedale San Paolo, la Clinica Ostetrica e Ginecologica dell'Ospedale Mangiagalli, Fondazione Policlinico, la Clinica Ostetrica e Ginecologia dell'Ospedale Buzzi e la Clinica Ostetrica e Ginecologica dell'Ospedale Luigi Sacco di Milano.

Tutti i pazienti hanno dato il loro consenso informato.

Per i casi IUGR, la diagnosi di ritardo di crescita è stata effettuata durante la gravidanza mediante valutazione di parametri ecografici e velocimetria doppler delle arterie uterine.

Criteri di inclusione sono stati: peso alla nascita inferiore al 10° percentile, insieme a una diminuzione della crescita della circonferenza addominale al di sotto del 10° percentile, o una diminuzione longitudinale della crescita di più di 40 centili (Parazzini et al, 1991; Pardi et al., 1993).

La diagnosi di PE è stata effettuata durante la gravidanza mediante valutazione dei parametri materni di pressione sanguigna e proteinuria; si è definita pre-eclamptica una donna che presentasse valori di pressione sanguigna  $> 140/90$  mmHg almeno 2 volte in 24 ore e proteinuria  $> 300$  mg/24 ore dopo la 20<sup>a</sup> settimana di gestazione e che fosse precedentemente normotesa e non proteinurica (Redman e Jefferies, 1988; Sibley et al., 2002).

I casi di IUGR sono stati suddivisi in base alla loro severità clinica, considerando la frequenza fetale cardiaca (FHR) e la velocimetria Doppler dell'arteria ombelicale (indice di pulsatilità, PI; Pardi et al, 1993).

IUGR di tipo I: FHR e PI normali;

IUGR di tipo II: FHR normale e PI anormale;

IUGR di tipo III: FHR e PI anormali.

Anche i casi PE sono stati suddivisi in base alla loro severità clinica valutata considerando l'epoca gestazionale di insorgenza della pre-eclampsia (misurata in settimane) e i valori pressori e di proteinuria (lieve: pressione arteriosa sistolica  $\geq 140$  mmHg e/o diastolica  $\geq 90-109$  mmHg e proteinuria 0,3-5 g/24 ore; grave: pressione arteriosa sistolica  $\geq 160$  e/o diastolica  $\geq 110$  mmHg e proteinuria  $\geq 5$  g/24 ore in due misurazioni successive).

Criteri di esclusione usati per tutti i gruppi analizzati sono stati: presenza di malformazioni fetali e/o di fattori materni predisponenti allo IUGR (infezioni, diabete, malattie autoimmuni, portatrici di difetti dei fattori della coagulazione), ipertensione materna pregestazionale. Non sono stati presi in considerazione casi di iposviluppo fetali determinati da anomalie cromosomiche presenti nel feto (trisomia 21, trisomia 13 e trisomia 18).

I campionamenti sono stati effettuati subito dopo il parto cesareo a seguito dell'approvazione di un consenso informato da parte dei genitori. Il parto è avvenuto con taglio cesareo elettivo, in assenza cioè di travaglio di parto e rottura delle membrane. Dopo il parto, è stato raccolto, in siringhe eparinate, il sangue ombelicale venoso e arterioso ed è stato effettuato l'emogas analisi per la raccolta dei dati ematochimici (GEM Premier 3000, Instrumentation Laboratory). Le caratteristiche cliniche della popolazione sono presentate in *tabella 3*: la parte *a* della *tabella 3* mostra le principali caratteristiche cliniche materne, la parte *b* della *tabella 3* mostra alcune caratteristiche fetali ottenute dall'emogas analisi del sangue ombelicale e la parte *c* della *tabella 3* mostra i valori di pO<sub>2</sub> nei campioni IUGR divisi per severità della patologia.

a)

<b>CARATTERISTICHE CLINICHE MATERNE</b>	<b>CONTROLLI</b>	<b>IUGR</b>	<b>PE+IUGR</b>	<b>PE</b>
<b>N°</b>	50	33	15	10
<b>Età materna (anni)</b>	33±5	34±6	36±2	35,7±5
<b>Indice di Massa Corporea (BMI)</b>	22,7±3*	21±2	21,7±3	28±6*
<b>Età gestazionale (settimane)</b>	39±1**	34±3**	31±3**	36,3±3*
<b>Peso fetale (g)</b>	3285±365**	1548±571**	1142±340**	2532±550*
<b>Peso placentare (g)</b>	509±112**	234±77**	212±80**	390±78*
<b>Emoglobina (Hb) materna (g/dl)</b>	9,7±1*	12±1*	10,9±1	10,7±2
<b>Pressione sistolica (mmHg)</b>	111±9*	-	175±7**	153±11**
<b>Pressione diastolica (mmHg)</b>	71±10*	-	95±7*	103±6**

b)

CARATTERISTICHE CLINICHE FETALI (EMOGAS ANALISI)	CONTROLLI N=50	IUGR N=33	PE+IUGR N=15	PE N=10
Emoglobina(Hb) fetale v.o. (g/dl)	14,5±2	15±2	14,9±2	14,3±0,4
Emoglobina (Hb) fetale a.o. (g/dl)	14,5±2	15,1±2	15,4±3	16,1±2
pO2 vena ombelicale (mmHg)	22,5±5,9	19,2±5,1	16,9±4*	20,3±8,5
pO2 arteria ombelicale (mmHg)	13,8±6,7	8,7±3,1	9,8±5	12,2±4,2
pH arteria ombelicale	7,3±0,5	7,2±0,03*	7,25±0,07*	7,3±0,04

c)

	MEDIA ± DEVIAZIONE STD
pO2 vena ombelicale CONTROLLI	22,5±5,9*
pO2 vena ombelicale IUGR GRAVITÀ 1	19,2±4,9
pO2 vena ombelicale IUGR GRAVITÀ 2	17±4,6
pO2 vena ombelicale IUGR GRAVITÀ 3	16,8±5,2*

**Tabella 3:** Caratteristiche cliniche materne (a) e fetali (b-c) della popolazione controllo CT, IUGR, PE+IUGR e PE. *Test t.* L'età media materna è simile nei 4 gruppi; come atteso i campioni controllo, IUGR e PE+IUGR differiscono in modo statisticamente significativo (\*\*  $p < 0,01$ ) per epoca gestazionale, peso fetale medio alla nascita, peso della placenta. I campioni PE e PE+IUGR differiscono significativamente nelle caratteristiche materne (\* $p < 0,05$ ) per BMI, età gestazionale, peso fetale e peso placentare medio e come atteso per i livelli pressori dai campioni CT.

Come mostrato in *tabella 3* parte a, l'età materna e il BMI (peso Kg/altezza metri<sup>2</sup>) non sono significativamente differenti nei gruppi CT, IUGR e PE+IUGR, mentre i gruppi CT e PE presentano un valore di BMI statisticamente differente tra loro ( $p < 0,05$ ). Come atteso, l'età gestazionale e i pesi placentare e fetale sono significativamente inferiori nei 3 gruppi con gravidanze patologiche rispetto al gruppo CT. L'emoglobina materna è statisticamente inferiore nel gruppo CT rispetto al gruppo IUGR probabilmente a causa di una più alta emodiluizione dovuta alla maggiore età gestazionale del gruppo CT. Come atteso, i valori di

pressione arteriosa sistolica e diastolica sono significativamente maggiori nei gruppi PE e PE+IUGR rispetto al gruppo CT.

Come mostrato in *tabella 3b*, la pO<sub>2</sub> della vena ombelicale è significativamente inferiore nei PE+IUGR rispetto ai CT e ciò riflette la condizione ipossica e la gravità della restrizione di crescita fetale nelle gravidanze affette da pre-eclampsia; non differisce invece in modo significativo tra campioni IUGR e CT. Il pH fetale dell'arteria ombelicale, indice del benessere fetale è risultata significativamente inferiore nel gruppo IUGR e PE+IUGR rispetto al gruppo CT. In *tabella 3* parte *c* è invece evidente la condizione ipossica dei feti con IUGR severa (gravità 3): infatti, la pO<sub>2</sub> della vena ombelicale è significativamente inferiore nei casi IUGR con gravità 3 ( $p < 0,05$ ) rispetto ai controlli e il suo valore diminuisce progressivamente con la gravità della restrizione di crescita.

Per ciascun caso è stato prelevato:

Tre/quattro frammenti di placenta provenienti da cotiledoni diversi. Nessuno dei cotiledoni era marginale e i campioni delle dimensione di circa 1 cm<sup>3</sup> e dello spessore massimo di 0,5 cm, sono stati prelevati dalla porzione centrale del cotiledone dopo aver eliminato la decidua materna per evitare contaminazione materna nelle analisi successive.

Inoltre è stato effettuato uno “*scrape*” cercando di eliminare l'eventuale endotelio capillare rimanente.

Dopo il lavaggio in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Solution, Euroclone) per eliminare il sangue materno, i villi coriali selezionati sono stati posti in una soluzione stabilizzante per l'RNA (*RNA later*, Ambion). Seguendo le indicazioni fornite dalla ditta, i campioni in RNA later vengono conservati a temperatura ambiente per 24 ore e poi posti a -20°C fino al momento del processamento.

# **ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DEL RECETTORE DELLA TRANSFERRINA (TFR1) E DELLA FERROPORTINA (FPN)**

## ***Espressione genica Recettore della Transferrina e Ferroportina***

Lo studio dell'espressione genica, con Real Time PCR, del Tfr1 è stato condotto su campioni di RNA estratti da 28 placenti CT, da 15 placenti PE + IUGR e da 10 placenti PE.

Lo studio dell'espressione genica, con Real Time PCR, della FPN è stato condotto su campioni di RNA estratti da 50 placenti CT vs. 33 placenti IUGR, e da 28 placenti CT vs. 16 placenti PE + IUGR e 10 PE.

## **Estrazione RNA**

L' RNA è stato estratto da frammenti di placenta utilizzando il reagente TRIZOL (*Invitrogen, Life Technologies*) secondo i protocolli forniti dalla ditta.

Il Trizol combina fenolo e guanidina isotiocianato in una soluzione monofasica al fine di facilitare l'immediata e più efficiente inibizione dell'attività delle RNasi.

L'estrazione viene eseguita in ghiaccio in modo da ridurre l'attività di enzimi in grado di danneggiare gli acidi nucleici. I campioni biologici, prima di procedere allo svolgimento del protocollo di estrazione, sono omogeneizzati in TRIZOL (1 ml/50mg di tessuto). L'omogenato viene incubato a temperatura ambiente per 5 minuti per permettere la completa dissociazione dei complessi di nucleoproteine. All'omogenato si aggiunge cloroformio (0,2 ml/1 ml di TRIZOL) e, dopo mescolamento dei reagenti, si incuba a temperatura ambiente per 5 minuti. Si centrifuga per 15 minuti a 12000 g a 4°C.

Si ottiene così la separazione di tre fasi: quella acquosa in cui c'è l'RNA, quella intermedia in cui c'è il DNA e quella inferiore fenolica che è la fase organica in cui si trovano le proteine.

La fase acquosa, recuperata ed utilizzata per l'estrazione di RNA, viene trasferita in nuove provette, nelle quali sono stati aggiunti 0.5 ml di isopropanolo, necessario per la precipitazione dell'RNA. I campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente per 5-10 minuti e in seguito centrifugati a 14000 rpm per 10 minuti a 4°C. Rimosso il surnatante, il pellet è stato lavato con 1 ml di etanolo 75%. Le provette sono state vortexate per risospesione del pellet e centrifugate a 9000 rpm per 5 minuti a 4°C per rimuovere ogni residuo di etanolo.

Dopo completa essiccazione del pellet, i campioni di RNA sono stati risospesi in 20-30µl di acqua sterile, a seconda delle dimensioni del pellet.

### **Quantificazione dell'RNA con spettrofotometro**

La concentrazione dell'RNA estratto e la sua purezza sono state determinate utilizzando lo spettrofotometro "NanoDrop ND1000" (*NanoDrop Technologies*).

Con un microlitro di campione lo strumento è in grado di fornire sia la concentrazione dell'RNA, in base alla sua assorbanza a 260 nm, espressa in ng/µl, sia i rapporti di assorbanza 260/280 e 260/230 che indicano quanto l'RNA estratto sia puro, ovvero non contaminato rispettivamente da proteine e da residui dei reagenti utilizzati per l'estrazione; un buon RNA deve possedere un rapporto 260/280 di circa 2 e un rapporto 260/230 compreso tra 1,8 e 2,2.

### **Trattamento dell'RNA con DNasi**

Per eliminare completamente il DNA residuo dai campioni di RNA si utilizza il "DNA-free kit" (*Ambion*).

Ai campioni di RNA vengono aggiunti 0,1 volumi di DNase I free Buffer e 1µL di DNase I (2 unità) per µg di RNA. Dopo incubazione a 37°C per circa 20-30 minuti, ad ogni campione sono addizionati 0,1 volumi di Inactivation Reagent per inattivare la DNase. Infine per rimuovere l' Inactivation Reagent si effettua una centrifuga per 1,5 minuti a 10000 g e si trasferisce la fase acquosa contenente l'RNA trattato in un nuovo tubo.

### **Two-Step RT-PCR**

L'RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) permette di retrotrascrivere l'RNA in cDNA e successivamente amplificare la sequenza di interesse.

Un µg di RNA per ogni campione è stato retrotrascritto in cDNA mediante l'High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (*Applied Biosystems*), secondo le condizioni indicate dalla ditta.

La reazione di retrotrascrizione è stata condotta in un volume finale di 20 µl.

La miscela di reazione è la seguente:

	<b>Volumi</b>	<b>Concentraz. iniziale</b>	<b>Concentraz. finale</b>
<b>10X RT BUFFER</b>	2µl	10X	1X
<b>25X dNTPs</b>	0,8 µl	100mM	4mM
<b>10X RT Random Primers</b>	2 µl	10X	1X
<b>Reverse Multiscribe Transcriptase</b>	1 µl	50U/µl	2,5U/µl
<b>RNase Inibitor</b>	1 µl	20U/µl	2,5U/µl

**Tabella 4:** volumi e concentrazione dei reagenti utilizzati per la mix di retrotrascrizione di ogni singolo campione forniti con l'High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

I campioni sono stati incubati in termociclatore a 25°C per 10 minuti, a 37°C per 120 minuti ed infine a 85°C per 5 minuti.

L'avvenuta reazione di retrotrascrizione è stata verificata amplificando il gene umano di β2-microglobulina con i seguenti primers:

β2-microglobulina Forward (*Primm*): 5'-GTGCTCGCGCTACTCTCTCT-3';

β2-microglobulina Reverse (*Primm*): 5'-TCAATGTCGGATGGATGAAA-3'

I due primers della β2-microglobulina sono stati disegnati su due esoni diversi separati da un lungo introne. In questo modo viene esclusa l'amplificazione di un campione in cui l'RNA non è stato estratto e/o retrotrascritto adeguatamente in cDNA o di un campione in cui è presente solo DNA.

Per l'amplificazione i campioni sono sottoposti a 35 cicli identici nel termociclatore:

in sequenza 95°C per 5 secondi, 54°C per 30 secondi e 72° per 30 secondi.

A conferma dell'avvenuta retrotrascrizione e amplificazione del gene B2-microglobulina è stata eseguita un'elettroforesi su gel di agarosio visualizzando la banda del gene amplificato con luce UV.



**Figura 12:** Visualizzazione della banda corrispondente alla  $\beta$ 2-microglobulina (149bp) su gel di agarosio, come intercalante è stato utilizzato il bromuro di etidio

### **Real-Time PCR**

Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione è stato utilizzato per l'analisi quantitativa dell'espressione del gene TfR1 e del gene SLC40 (FPN). Ciascun campione è stato amplificato in PCR Real-Time, utilizzando lo strumento 7500 Fast Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*), secondo il protocollo di amplificazione standard (20 secondi a 95°C, seguiti da 40 cicli di denaturazione per 3 secondi a 95°C e di annealing + extension per 30 secondi a 60°C). La Real-time PCR permette di determinare la quantità iniziale di template (DNA o cDNA) presente in un campione in modo altamente specifico, sensibile e riproducibile. Consente di monitorare in tempo reale, durante la reazione di amplificazione, la quantità di prodotto amplificato. I dati vengono analizzati durante la fase esponenziale della reazione, in cui vi è una diretta proporzionalità tra quantità iniziale di template e quantità di prodotto amplificato ad ogni ciclo. Il sistema di quantificazione è basato sulla rilevazione di un segnale di fluorescenza emesso da una sonda TaqMan, che riconosce una regione interna al prodotto di PCR. Tale sonda è marcata all'estremità 5' con un reporter dye (ad esempio 6-FAM, 6-carboxyfluorescein) e all'estremità 3' con un quencer dye, che può essere fluoresceinato (es. TAMRA, 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) o non fluoresceinato (NFQ = Non Fluorescent Quencer.). Finché la sonda è intatta, la vicinanza del quencer al reporter sopprime la fluorescenza di quest'ultima. Durante la fase di estensione della PCR, l'attività 5'-3' esonucleasica della DNA polimerasi idrolizza la sonda, causando l'allontanamento del reporter dal quencer e consentendo quindi l'emissione di fluorescenza, che aumenta proporzionalmente all'incrementare del numero di ampliconi prodotti.

Dal momento che l'idrolisi avviene solo se la sonda è complementare e perciò ibridizza in modo specifico a livello del gene target, la fluorescenza emessa è specifica per l'amplificazione del target. Il segnale fluorescente è normalizzato ad un reference interno (ROX, 6-carboxy-X-rhodamine), presente nel buffer di PCR e che non partecipa al processo di amplificazione. All'inizio il segnale fluorescente è al di sotto del limite di sensibilità dello strumento. Quando l'aumento del segnale è associato ad una crescita esponenziale del prodotto di PCR e diventa uguale a 10 deviazioni standard della linea di base il software fissa un ciclo soglia (Ct, Threshold Cycle). Il Ct rappresenta il ciclo in corrispondenza del quale la fluorescenza emessa è statisticamente significativa.

E' stata fatta una mix random di cDNA di campioni CT, IUGR, IUGR+PE e PE. A partire da questa mix di cDNA sono state fatte una serie di diluizioni ( 1:1, 1:25, 1:100, 1:400, 1:1600) su cui è stata eseguita la reazione di Real Time PCR con l'assay del Recettore della Transferrina e con della ferroportina SLC40. Ciò ci consente di verificare la specificità e la sensibilità dei primers e dell'assay utilizzati e di calcolare l'efficienza della reazione di PCR.

Nel presente studio, è stata eseguita una quantificazione relativa del gene target TfR e del gene target FPN rispetto a 2 geni Housekeeping (HK), HPRT e SDHA, scelti all'interno di un pannello di geni HK testati, sulla base della loro stabilità di espressione placentare e in quanto mostrano efficienze di amplificazione vicina al 100% e paragonabili a quelle dei geni target sia nelle placente provenienti da gravidanze normali (CT) che in quelle IUGR e PE. Di seguito sono riportati i riferimenti degli assays (*Applied Biosystems*) impiegati nello studio:

- TfR (Hs00174609\_m1)
- HPRT (Hs99999909\_m1)
- SDHA (Hs00417200\_m1)
- SLC40 (Hs00205888\_m1)

Ogni pozzetto della piastra viene riempito con 6,6µl di mix composta da 6µl di TaqMan Fast Universe PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) e 0,6µl dell' assay specifico in aggiunta a 5,4µl di cDNA diluito così da raggiungere un volume finale di reazione di 12 µl.

Le threshold utilizzate per la comparazione dei Ct sono state calcolate in precedenza per ogni gene mediante l'analisi della curva standard.

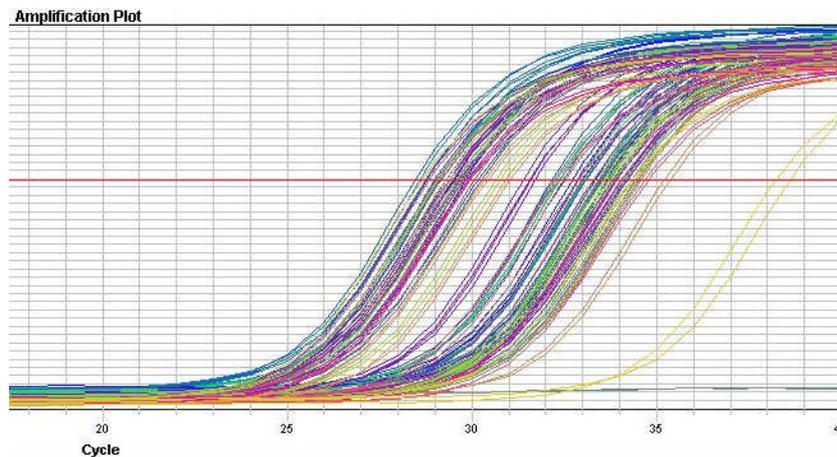
Threshold Tfr1=0,471052

· Threshold HPRT=0,189535

· Threshold SDHA=0,206425

· Threshold SLC40=0,483165

Per convertire i valori grezzi di Ct in valori di quantità relativa di un gene, sono state applicate le formule descritte in “Vandesompele J, et al. 2002”, e avvalendosi del Software *GeNorm* per l'analisi dei dati.



**Figura 13:** Rappresentazione grafica di un'analisi in Real-Time PCR: la linea rossa orizzontale è la threshold, ossia il valore in cui tutte le curve sono parallele tra loro e quindi confrontabili. L'intersezione tra la threshold e le curve sono i Ct di ogni campione.

# ANALISI ESPRESSIONE PROTEICA DELLA FERROPORTINA (FPN)

## *Espressione proteica della Ferroportina (FPN)*

Per l'analisi dell'espressione proteica della FPN, con saggio Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), sono state estratte le proteine da tessuto di 14 placentate IUGR e 26 placentate CT. In particolare, l'espressione proteica della FPN è stata analizzata in 26 placentate CT vs. 14 placentate IUGR.

## *Estrazione proteine di membrana*

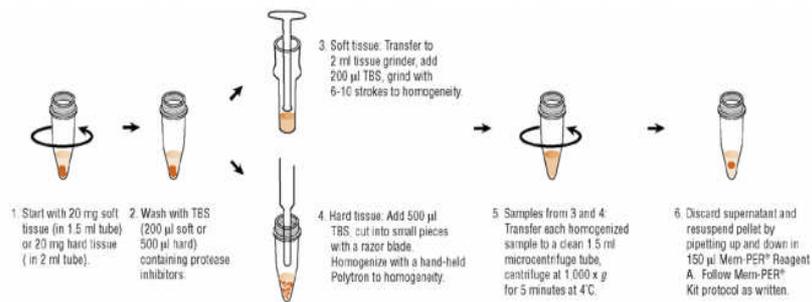
Le proteine sono state estratte da frammenti di circa 20 mg di tessuto placentare con il Kit Mem-PER Eukaryotic Membrane (*Thermo Scientific, Protein Extraction Reagent Kit*), specifico per l'estrazione di proteine di membrana seguendo il protocollo fornito dalla ditta.

Il kit è formato da tre detergenti che vanno aggiunti in fasi diverse per ottenere in primo luogo la lisi cellulare e infine separare le proteine idrofobiche di membrana da quelle idrofiliche presenti nel citosol.

L'estrazione viene eseguita in ghiaccio in modo da ridurre l'attività delle proteasi.

Si prelevano 20 mg di tessuto per ogni campione placentare. Il tessuto pesato viene sciacquato, per eliminare possibili rimasugli di sangue, con 200µl di TBS1X, un buffer salino composto da acqua bidistillata, Tris-Cl, NaCl e inibitori delle proteasi. Per facilitare il lavaggio si vortexa brevemente e si butta il liquido di scarto.

I campioni sono omogeneizzati in TBS 1X (200µl TBS/20mg di tessuto) in presenza di inibitori della proteasi (SIGMA). L'omogenato viene centrifugato per 5 minuti a 1000 g a 4°C: si butta il surnatante e si risospende il pellet di tessuto in 150µl di Reagent A; quindi si incuba per 10 minuti a temperatura ambiente.



**Figura 14:** Estrazione di proteine da tessuto molle: primo lavaggio e omogeneizzazione del tessuto in TBSIX

Dopo aver riportato i campioni in ghiaccio, si aggiunge ad ognuno 450µl di miscela ottenuta da 2 parti di Reagent C e una parte di Reagent B. Si incuba in ghiaccio per 30 minuti vortexando ogni 5 minuti.

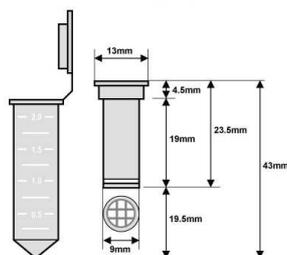
Si centrifuga per 3 minuti a 10000 g a 4°C. Si recupera il surnatante in una nuova provetta e si incuba per 20 minuti a 37°C per facilitare la separazione della frazione idrofobica di proteine di membrana dalla frazione proteica idrofilica.

Si effettua un'ultima centrifuga per 2 minuti a 10000 g a temperatura ambiente. In seguito alla centrifugazione si formano due fasi ben visibili, quella più in alto è la frazione di proteine idrofiliche e la fase sottostante contiene le proteine idrofobiche di membrana di nostro interesse.

### Eliminazione del detergente dall'estratto proteico

L'alta concentrazione di detergente presente nelle frazioni di proteine idrofobiche estratte potrebbe interferire con le analisi successive, perciò si procede alla eliminazione del detergente mediante trattamento dei campioni con i reagenti contenuti nel Pierce SDS-PAGE Sample Prep Kit (*Thermo Scientific*). Questo kit permette di recuperare le proteine in soluzione senza danneggiarle. Le proteine si legano ad una resina fornita dal Kit e vengono lavate dal detergente presente in presenza di dimetil-solfossido (DMSO).

Il Kit fornisce delle "spin cup" ovvero una colonnina con filtro posta all'interno di una provetta da 2ml.



**Figura 15:** Rappresentazione schematica di una “spin cup” inseribile in un tubo da 2ml. Materiali forniti con il kit SDS-PAGE Sample Prep Kit (Thermo Scientific).

Si trasferiscono 20 $\mu$ l di resina liquida al centro del filtro della “spin cup”. Si aggiungono, sopra al filtro contenente la resina della provetta “spin cup”, 200 $\mu$ l della soluzione contenente le proteine estratte e si vortexa brevemente, quindi si aggiungono 200 $\mu$ l di DMSO 100% e si vortexa nuovamente. Si incuba per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere l’ancoraggio completo delle proteine alla resina. Quindi, si centrifuga per 2 minuti a 2000 g, si butta l’eluato e si conserva la provetta “spin cup” contenente le proteine legate alla resina.

Si prepara una soluzione di lavaggio con DMSO e acqua in rapporto 1 a 1. Si aggiungono 300 $\mu$ l di soluzione di lavaggio per ogni campione. Si centrifuga per 2 minuti a 2000 g e si butta l’eluato. Si ripete il lavaggio per una seconda volta. In seguito ai lavaggi, le proteine rimangono legate alla resina del filtro della “spin cup”.

Per ogni provetta contenente la resina si aggiungono 50 $\mu$ l di “Elution Buffer” e si incuba per 5 minuti a 60°C vortexando brevemente al termine dell’incubazione. Si centrifuga per 2 minuti a 2000 g. In questo passaggio le proteine, ormai libere dal detergente, si staccano dalla resina e le si ritrovano nell’eluato. A questo punto la rimozione del detergente è completata e le proteine saranno concentrate nei 50 $\mu$ l di “Elution Buffer”. Quindi le analisi successive verranno fatte sull’eluato contenente la frazione proteica. In seguito a questo trattamento si può determinare la concentrazione proteica totale di ogni campione senza avere alcuna interferenze chimiche.

## **Determinazione della concentrazione proteica con acido bicinconinico (BCA)**

Questa metodica, utilizzata per determinare la concentrazione proteica in una soluzione, è estremamente precisa e sensibile; può infatti rivelare quantità di proteina inferiori a 0,5 µg/mL. Per la determinazione della concentrazione delle proteine idrofobiche estratte è stato utilizzato il Micro BCA Protein Assay Kit (*Thermo Scientific*).

### Principio della metodica del BCA.

In condizioni alcaline gli ioni rame  $\text{Cu}^{2+}$  formano un complesso con i legami peptidici delle proteine e vengono ridotti a  $\text{Cu}^+$ . L'acido bicinconinico è un reagente altamente sensibile, stabile e specifico per il  $\text{Cu}^+$ , e forma con esso un complesso che sviluppa color porpora. La quantità del complesso acido bicinconinico- $\text{Cu}^+$  e l'intensità della colorazione è proporzionale alla quantità di proteina presente. La variazione di intensità di colorazione e quindi la concentrazione proteica è determinata mediante misure di assorbanza allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 562 nm.

Il valore della concentrazione proteica viene estrapolato da una retta di taratura precedentemente costruita utilizzando campioni di albumina di siero bovino (BSA) a concentrazione nota.

Per questo si prepara un *set* di proteine standard a concentrazione nota di Albumina (BSA): 200µg/ml, 40µg/ml, 20µg/ml, 10µg/ml, 5µg/ml, 2,5µg/ml, 1µg/ml, 0,5µg/ml, 0µg/ml (bianco). Si calcola la quantità necessaria di “*Working Reagent*” (WR), ovvero la soluzione contenente acido bicinconinico e  $\text{Cu}^{2+}$ . Si prepara il WR miscelando 25 parti del “*reagent MA*” e 24 parti del “*reagent MB*” con 1 parte del “*reagent MC* come descritto dal Kit”. Quindi, per ogni campione o standard da misurare, si miscelano 10µl di campione o standard e 10µl di WR (rapporto campione : WR = 1:1).

La soluzione WR-campione da quantificare e la soluzione WR-standard vengono incubate per 2 ore a 37°C nel termociclatore. Quindi dopo l'incubazione, che favorisce la reazione acido bicinconinico col  $\text{Cu}^+$ , si misura l'assorbanza di ogni campione e di ogni standard a 562nm allo spettrofotometro “NanoDrop ND1000” (*NanoDrop Technologies*). Con i valori ottenuti dall'analisi spettrofotometrica degli standard di albumina a concentrazione nota, si prepara una curva standard e infine si procede con la determinazione della concentrazione proteica dei campioni incogniti in studio riportando i loro valori di assorbanza sulla curva standard.

## **Quantificazione della proteina ferroportina mediante saggio ELISA**

Il saggio ELISA, acronimo dell'espressione Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, consente una rapida quantificazione di un antigene in un campione biologico. Per il presente studio si è deciso di utilizzare il metodo diretto o sandwich, ritenuto il più sensibile e specifico.

Esso prevede la copertura della base solida della piastra con un anticorpo di cattura specifico per l'antigene che si vuole misurare. Inizialmente si aggiunge al pozzetto della piastra la soluzione con l'antigene, il quale si legherà all'anticorpo di cattura. In seguito si introduce un anticorpo di rilevamento specifico per l'antigene che legherà il complesso anticorpo di cattura-antigene, formando un triplo strato da cui prende il nome il test. Questo secondo anticorpo si lega ad un enzima che in presenza di substrato catalizza una reazione che porta alla formazione di un prodotto colorato. La formazione del prodotto, valutata in base allo sviluppo di colore, è proporzionale alla concentrazione della proteina di interesse nel campione biologico, la quale è, a sua volta, proporzionale all'intensità della colorazione. L'intensità della colorazione, misurabile grazie allo spettrofotometro, è semi-quantitativa secondo una scala arbitraria di intensità. Nel presente studio è stato utilizzato l'ELISA *assay kit* per ferroportina (FPN) umana (*Aurogene*), fornito con i pozzetti pre-rivestiti con un anticorpo monoclonale specifico per la FPN.

I campioni di proteine estratte vengono aggiunti ai pozzetti della piastra ELISA insieme ad una preparazione di anticorpo policlonale, specifico per FPN, coniugato a Biotina. In seguito si aggiunge ad ogni pozzetto Avidina coniugata con Horseradish Peroxidase (HRP) che si lega alla Biotina. Infine si aggiunge ad ogni pozzetto la soluzione contenente il substrato della perossidasi (HRP). Solo quei pozzetti che conterranno FPN legata all' anticorpo coniugato a Biotina a sua volta legata alla Avidina coniugata all'enzima HRP, mostreranno un sviluppo di colore dovuto alla reazione catalizzata dall'enzima HRP.

La reazione enzima HRP-substrato viene stoppata con l'aggiunta di una soluzione di acido solforico e lo sviluppo e l'intensità di colore è misurato spettrofotometricamente a una lunghezza d'onda di  $450\text{nm} \pm 10\text{nm}$ . La concentrazione di ferroportina nei campioni è in seguito determinata comparando l'assorbanza (O.D). dei campioni sulla curva standard.

## PROCEDIMENTO

Per prima cosa si procede alla costruzione di una curva standard. Si preparano 7 campioni standards più un bianco con la soluzione stock di FPN a concentrazione nota (20ng/ml) e il diluente standard forniti nel kit. Le concentrazioni dei campioni standard ottenuti attraverso diluizioni seriali sono le seguenti:

20ng/ml, 10ng/ml, 5ng/ml, 2,5ng/ml, 1,25ng/ml, 0,625ng/ml, 0,312ng/ml, 0ng/ml (bianco).

Si procede quindi con l'aggiunta di 100µl di ogni standard e di ogni campione per pozzetto. Si copre la piastra con l'adesivo apposito e si incuba per 2 ore a 37°C.

Si rimuove il liquido da ogni pozzetto senza lavaggio. Si aggiungono per ogni pozzetto 100µl di "*Detection Reagent A working solution*" contenente l'anticorpo policlonale coniugato a Biotina specifico per la FPN. Si incuba per 1 ora a 37°C dopo aver ricoperto la piastra con l'adesivo. Si aspira la soluzione presente in ogni pozzetto e si procede al lavaggio con 350µl di "*Wash Solution 1X*" per pozzetto. Si ripete il lavaggio per tre volte aspirando completamente il buffer di lavaggio. Si aggiungono, per ogni pozzetto, 100µl di "*Detection Reagent B working solution*" contenente Avidina coniugata con l'enzima Horseradish Peroxidase (HRP). Dopo aver coperto la piastra con l'adesivo, si incuba per 30 minuti a 37°C. Si ripete il processo di lavaggio/aspirazione per cinque volte come descritto precedentemente. Si aggiungono 90µl per ogni pozzetto di "*Substrate Solution*" contenente tetrametilbenzidina (TMB), ovvero il substrato per l'enzima HRP legato all'anticorpo secondario.

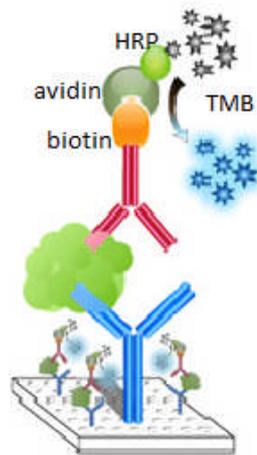
La reazione catalizzata dalla Horseradish Peroxidase (HRP) avviene secondo la seguente cinetica:



Si incuba per 20 minuti a 37°C dopo aver coperto la piastra con l'adesivo e averla posizionata al riparo dalla luce. La soluzione all'interno dei pozzetti cambia colore con l'aggiunta del substrato e vira verso il blu. Si aggiungono 50µl di "*Stop Solution*" contenente acido solforico per ogni pozzetto così che, dopo aver mixato le soluzioni all'interno dei pozzetti, la reazione terminerà e il liquido diventerà giallo.

Infine si procede con la lettura della piastra allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 450nm.

Si crea una curva standard mettendo sull'asse-y la concentrazione dei campioni standard della FPN e sull'asse-x la relativa assorbanza. Grazie a questi valori si può estrapolare facilmente una retta con un'analisi di regressione lineare e di conseguenza determinare la concentrazione di FPN per ogni campione in esame.



***Figura 16:*** Visualizzazione molecolare dei componenti coinvolti in un saggio ELISA diretto; dal basso verso l'alto sono mostrati: 1) l'anticorpo di cattura adesivo sul fondo della piastra, 2) la proteina in studio, 3) l'anticorpo biotinitato di rilevamento, 4) l'avidina coniugata all'enzima Horseradish Peroxidase (HRP). A lato è mostrato il cambiamento di colore della soluzione in seguito all'aggiunta del substrato TMB per l'enzima HRP.

## Western Blot

Dieci  $\mu\text{g}$  di estratto proteico, eventualmente diluita in PBS, in presenza di 5  $\mu\text{l}$  di sample buffer 5X (blu di bromofenolo 0.5%, glicerolo 10%, Tris 0.5 M pH8 12.5%, SDS 2% ed, eventualmente,  $\beta$ -mercaptoetanololo 5%) sono stati fatti correre su un gel di poliacrilammide al 8%.

La corsa elettroforetica è stata condotta applicando una corrente di 10 mA per gel per circa 15 minuti fino all'impaccamento delle proteine, e poi 20 mA per gel per circa 1 ora.

Una volta terminata la corsa elettroforetica, le proteine risolte nel gel sono state trasferite su un filtro di nitrocellulosa (immobilon-P transfer membrane, Millipore).

In presenza del tampone di trasferimento TG 1X (0.3% Tris, 1.12% glicina, 20% etanolo) è stata applicata una tensione pari a 100 V per la durata di 1 ora. Al fine di verificare che il trasferimento fosse avvenuto correttamente, le proteine adese al filtro sono state visualizzate attraverso la colorazione reversibile Ponceau (SIGMA, St. Louise MO USA).

Il filtro è stato incubato overnight a 4°C con la soluzione di overcoating (BSA 3%, TBS 10X 10%, Tween-20 0,5 %) e successivamente esposto per un'ora e 30 minuti all'anticorpo primario policlonale (*Ferroportin 1 Antibody NBPI-21502* di NOVIS BIOLOGICALS) per la FPN (proteina di 62 KDa), diluito 1:2000. L'anticorpo primario utilizzato riconosce una porzione interna della ferroportina umana (e di topo) in particolare la porzione compresa tra i residui amminoacidici 250 e 300. Il filtro è stato, infine, incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l' anticorpo secondario (diluito 1:10000) goat anti mouse (Chemicon International, Inc., Temecula CA) coniugato con l'enzima HRP; dopo ogni passaggio il filtro è stato lavato 3 volte per 10 minuti con la soluzione di lavaggio TBS 1X (TBS 10X 0.1%, Tween 20 0.001%). Al termine dell'ultimo lavaggio, il substrato dell'enzima HRP (Supersignal west pico chemiluminescent substrate, Pierce), è stato incubato con il filtro a temperatura ambiente per 5 minuti e, quindi, sviluppato in camera oscura con lastre fotografiche Biomax light-2 (Kodak, distribuzione SIGMA, St. Louise MO USA).

Per ogni campione, inoltre, è stata valutata anche la  $\beta$ -actina (42 KDa), un gene housekeeping utilizzato come controllo positivo. L'anticorpo utilizzato, in questo caso, è l'anti- $\beta$ -actina monoclonale (SIGMA, St. Louise MO USA).

## *Analisi statistica*

Le caratteristiche cliniche della popolazione sono presentate come media  $\pm$  standard deviation (SD) e sono state analizzate con test t di Student.

I dati della Ferroportina e della Tranferrina in gravidanze CT, IUGR, PE e PE+IUGR sono presentati come mediana.

Per l'analisi dei dati della Real-Time si è applicato il test statistico U di Mann-Whitney. Si tratta di un metodo non parametrico per il confronto di due o più campioni indipendenti. La scelta di utilizzare un test non parametrico è dovuta al fatto che lo IUGR e la PE sono patologie eterogenee, con una indubbia componente genetica. Per tale ragione, non ci si aspetta un comportamento omogeneo dei campioni e pertanto si può supporre che i dati non siano distribuiti normalmente.

Per l'analisi dei dati del saggio ELISA è stato applicato il test statistico U di Mann-Whitney, metodo non parametrico per il confronto di due campioni indipendenti.

Differenze tra casi e controlli sono state considerate statisticamente significative quando  $p < 0,05$ .

Per correlare i dati di espressione genica di TfR1 e genica e proteica di FPN con i parametri clinici a disposizione, è stata eseguita una analisi di regressione lineare. La correlazione tra i valori è stata condotta usando la correlazione di Pearson. Le correlazioni sono state considerate significative quando  $p < 0,05$ .

Tutti i test sono stati eseguiti usando il pacchetto statistico SPSS 17.00.

# STUDIO DELLA RELAZIONE TRA INTAKE ALIMENTARE, SUPPLEMENTAZIONE CON FERRO E OUTCOMES DELLA GRAVIDANZA

## *Caratteristiche della popolazione*

Presso gli Ambulatori di Ostetricia dell'Ospedale L. Sacco di Milano, sono state selezionate al primo trimestre di gravidanza 55 donne italiane con buon stato di salute e con gravidanze singole e fisiologiche. La popolazione è stata suddivisa in modo random in quattro gruppi con differenti formulazioni e dosaggi di supplementazione marziale: ferro solfato 30 mg, ferro pirofosfato liposomiale 14mg e 28 mg, e gruppo di controllo senza supplementazione. Per i tre gruppi supplementari, la supplementazione con ferro è iniziata al momento dell'arruolamento (11-14 settimane di gestazione) fino a 6 settimane dopo il parto.

I criteri di esclusione sono stati: patologie materne o fetali note, assunzione di farmaci o droghe ed anemia materna ovvero con livello di emoglobina (Hb) inferiore a 10,5 g/dl.

In tabella 5 sono mostrate le principali caratteristiche della popolazione partecipante allo studio: i dati riportati sono stati raccolti a 28-31 settimane di gestazione mediante questionari demografici e misure antropometriche.

Gruppi	Età	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Incremento ponderale	Nulliparità %	Fumatrici %	Età gestazionale al parto
Controlli (n=19)	30.5±4.8	22.4±1.3	8.4±3.0	42.0	21.0	39.8±0.8
Fe Solfato 30 mg (n=11)	29.4±4.9	21.6±2.7	7.4±2.0	63.6	27.2	39.2±1.1
Fe liposomiale 14 mg (n=11)	31.0±5.2	25.4±4.3	9.4±2.5	45.5	18.2	39.4±1.0
Fe liposomiale 28 mg (n=11)	30.1±3.9	21.9±2.9	8.5±2.2	45.5	18.1	38.9±1.4

**Tabella 5:** *Caratteristiche materne della popolazione di studio a 28-31 settimane di gestazione. I risultati sono espressi come media ±SD.*

## *Questionari alimentari*

Al momento dell'arruolamento (11-14 settimane di gestazione), durante la gravidanza (28 settimane di gestazione) e il puerperio (6 settimane dopo il parto), l'intera popolazione è stata intervistata tramite questionari alimentari semiquantitativi (Food Frequency Questionnaire, FFQ) per ottenere informazioni relative all'intake dei principali alimenti (suddivisi in categorie di appartenenza) e alla frequenza di assunzione. In particolare, per poter avere una visione più completa sul tipo di dieta, sono state raccolte informazioni relative al consumo di:

- bevande: tipi di bevande assunte (es. the, caffè, cappuccino, latte, yogurt, bibite analcoliche, alcoliche, gassate, succhi di frutta, centrifugati) e rispettiva frequenza di assunzione nell'arco di una settimana o mese
- primi piatti: tipo (pasta di semola o all'uovo o integrale, riso, minestrone, brodo, polenta, gnocchi ecc), tipo di condimento usato (olio, burro, ragù, pomodoro, formaggio, panna), numero di porzioni, rispettiva frequenza di assunzione nell'arco di una settimana o mese
- prodotti da forno: tipo (pane bianco o integrale, crackers, grissini, fette biscottate, pizza, focaccia, biscotti, brioche vuote o piene, merendine, torte, pasticcini assortiti) e rispettiva frequenza di assunzione nell'arco di una settimana o mese
- cereali: tipo (fiocchi di mais o di avena, cereali soffiati o integrali, crusca, muesli, altri) e rispettiva frequenza di assunzione nell'arco di una settimana o mese
- carne: tipo ( vitello, maiale, cavallo, fegato e altre frattaglie, coniglio, pollo tacchino), tipo di cottura (bollito, ai ferri, forno, in umido) e di condimento (olio, burro, salse) e rispettiva frequenza di assunzione nell'arco di una settimana o mese
- salumi (solo per i pazienti toxo-immuni): tipo (es. mortadella, salame, capocollo, coppa, wurstel, bresaola, prosciutto cotto o crudo, spek, pancetta) e rispettiva frequenza di assunzione nell'arco di una settimana o mese
- pesce fresco o surgelato: tipo (pesce azzurro o altri pesci, crostacei, molluschi, pesce in scatola) con relativa frequenza di consumo dell'arco della settimana o mese, tipo di condimento usato (olio, burro o altro) e tipo di cottura ( fritto, bollito al forno o ai ferri)
- uova: tipo di cottura (fritte, sode) e condimento
- formaggi e latticini: tipo (formaggi a pasta molle o stagionati) e rispettiva frequenza di assunzione nell'arco di una settimana o mese

- ortaggi freschi: tipo (es. ortaggi in insalata, ortaggi crudi gialli o rossi), tipo di condimento usato e rispettiva frequenza di assunzione nell'arco di una settimana o mese
- ortaggi cotti: tipo (es broccoli, verza, cavolfiore, carciofi, zucchine, melanzane, cipolle, funghi ecc) con relativa frequenza di assunzione nell'arco di una settimana o mese e tipo di condimento usato
- patate e legumi: tipo di cottura per le patate, tipo di legumi (es. fagioli, ceci, lenticchie, piselli, fave ecc), se i legumi si intendono con o senza pasta e relativa frequenza di assunzione nell'arco di una settimana o mese
- frutta: tipo ovvero se frutta di tutto l'anno o frutta di stagione, agrumi, frutta secca e per ognuno la relativa frequenza di assunzione nell'arco di una settimana o mese
- alimenti vari: tipo (es. frutta sciroppata, gelato, marmellate, creme, cioccolato, caramelle, contorni sott'olio, sott'aceto, salse ecc.) e rispettiva frequenza di assunzione nell'arco di una settimana o mese

E' stato inoltre chiesto se viene fatto uso di alimenti arricchiti con fibre, omega 3, ferro, vitamine ecc.

A ciascun partecipante è stato effettuato un prelievo di sangue venoso all'inizio dello studio (11-14 settimane di gestazione), a 28 settimane di gestazione e a 6 settimane dopo il parto.

Al momento del parto sono stati raccolti:

- il sangue cordonale sul quale è stato effettuato l'emogas analisi per valutare lo stato di ossigenazione e il pH
- outcome della gravidanza (peso fetale e peso placentare)

La raccolta dei dati ematochimici materni ha fornito un quadro di insieme sullo stato marziale delle pazienti. Questo è stato correlato all'outcome della gravidanza ed ha dunque consentito di valutare il dosaggio e la formulazione di ferro più efficaci al benessere materno-fetale.

RISULTATI e  
DISCUSSIONE

# CORRELAZIONI TRA LE CARATTERISTICHE CLINICHE DELLA POPOLAZIONE RECLUTATA PER IL CAMPIONAMENTO PLACENTARE

L'analisi di correlazione sull'intera popolazione di studio ha mostrato (*tabella 6*):  
 una correlazione significativa positiva tra epoca gestazionale e peso fetale ( $p < 0,01$ ), epoca gestazionale e peso placentare ( $p < 0,01$ ), peso fetale e peso placentare ( $p < 0,01$ );  
 una correlazione significativa negativa tra emoglobina (Hb) materna e peso fetale ( $p < 0,01$ ) e tra Hb materna e peso placentare, probabilmente causata dalla maggior emodiluizione del sangue materno col progredire della gravidanza e quindi con l'aumentare del peso fetale; ciò è supportato dalla correlazione negativa che intercorre tra Hb materna e epoca gestazionale ( $p < 0,01$ ).

	<b>Età gestazionale</b>	<b>Peso fetale</b>	<b>Peso placentare</b>	<b>Hb materna</b>
<b>Età gestazionale:</b>				
Correlazione di Pearson	1	0,932**	0,770**	-0,464**
Sig. (2 code)	/	0,000	0,000	0,003
N	86	85	77	39
<b>Peso fetale:</b>				
Correlazione di Pearson	0,932**	1	0,805**	-0,520**
Sig. (2 code)	0,000	/	0,000	0,001
N	85	85	77	38
<b>Peso placentare:</b>				
Correlazione di Pearson	0,770**	0,805**	1	0,637**
Sig. (2 code)	0,000	0,000	0,000	0,000
N	77	77	77	31
<b>Hb materna:</b>				
Correlazione di Pearson	-0,464**	-0,520**	-0,637**	1
Sig. (2 code)	0,003	0,001	0,000	/
N	39	38	31	40

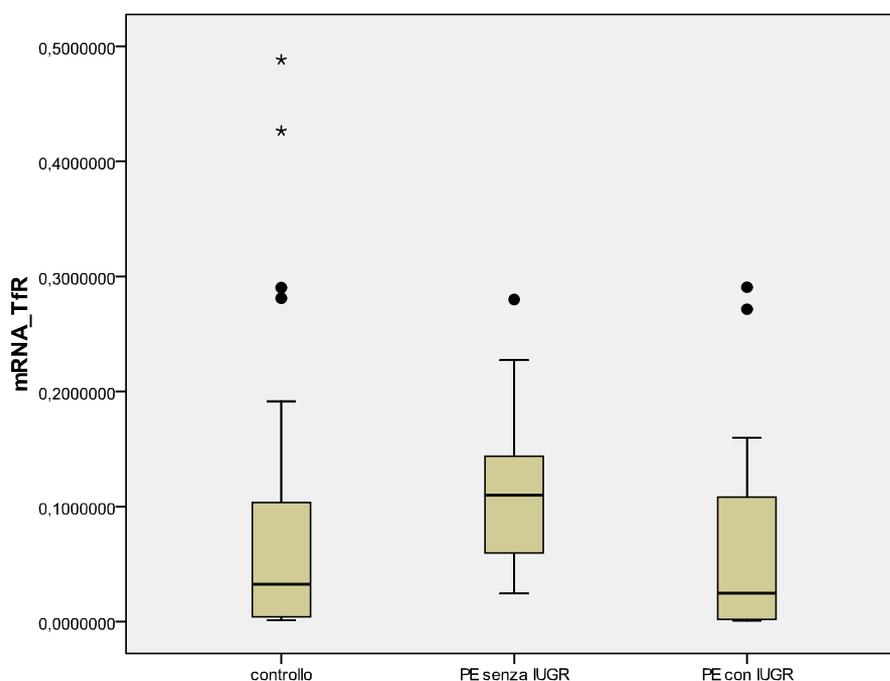
**Tabella 6:** Analisi di Correlazione di Pearson: \*\*. La correlazione è significativa a livello di 0,01

# STUDIO DI ESPRESSIONE GENICA: RECETTORE DELLA TRANSFERRINA (TFR1) E FERROPORTINA (FPN)

Lo studio di espressione del gene del Recettore della Transferrina e del gene della Ferroportina è stato eseguito su RNA estratto da campioni placentari, provenienti da gravidanze fisiologiche di controllo (CT), complicate da ritardo di crescita intrauterino (IUGR), complicate da pre-eclampsia (PE) e complicate da PE+IUGR. L'analisi dell'espressione genica è stata eseguita con la tecnica di Real-Time PCR.

## *Analisi di espressione genica del Recettore della Transferrina (TfR1)*

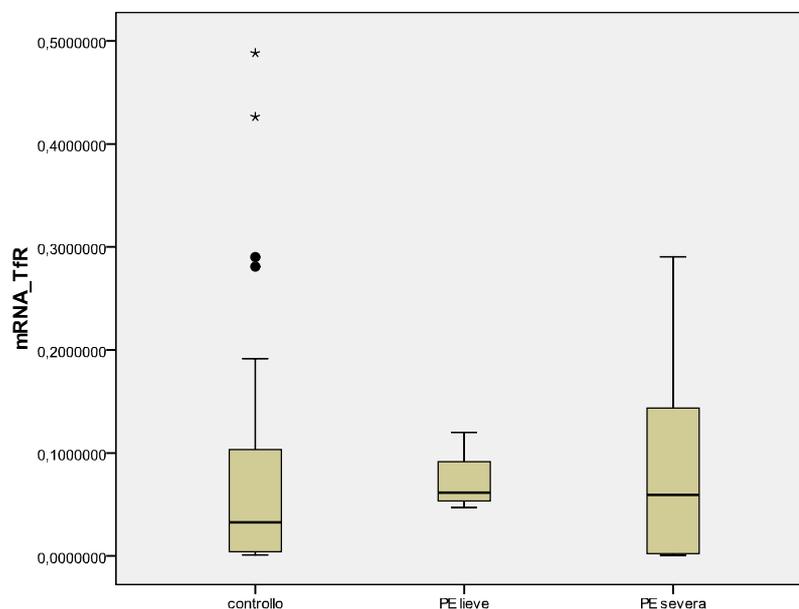
Per l'analisi dell'espressione genica del TfR1 sono stati analizzati 28 campioni CT, 10 campioni PE e campioni 15 PE+IUGR. Come mostrato in *figura 17* non è stata rilevata una differenza statisticamente significativa tra i 3 gruppi analizzati nonostante un *trend* di maggiore espressione nel gruppo PE rispetto al gruppo CT e al gruppo PE+ IUGR.



***Figura 17: Analisi di espressione genica del TfR1 eseguita con Real Time PCR su 28 campioni CT, 10 PE e 15 PE+IUGR. Le linee orizzontali rappresentano i valori delle mediane. Test statistico U di Mann Whitney:p=NS***

Successivamente l'analisi del messaggero del Tfr1 è stata fatta considerando la gravità della patologia pre-eclamptica.

I campioni PE e PE+IUGR sono stati suddivisi in PE precoce (numerosità N=6) e in PE tardiva (N=7) in base alla settimana di insorgenza della patologia pre-eclamptica (prima o dopo la 34° settimana di gestazione). Inoltre gli stessi campioni sono stati suddivisi in PE lieve (N=4) e in PE grave (N=21) in base ai valori pressori, di proteinuria rilevati al momento di insorgenza della patologia e alla presenza di restrizione di crescita fetale. In entrambi i tipi di classificazione patologica (PE precoce / PE tardiva e PE lieve / PE grave, l'analisi statistica non ha rilevato una differenza statisticamente significativa tra il gruppo di controllo (N=28) e i vari gruppi patologici.



**Figura 18:** *Espressione genica del Tfr1 in: 28 campioni CT, 4 campioni con PE lieve e 21 campioni PE grave. Test statistico U di Mann Whitney, p = NS.*

L'analisi di correlazione tra l'espressione genica del TfR1 e le caratteristiche cliniche della popolazione ha rilevato una correlazione positiva e significativa tra i livelli di mRNA del TfR1 e i valori di pressione sistolica ( $p = 0.007$ ), relazione positiva evidenziabile anche dal trend di maggiore espressione genica del TfR1 nel gruppo PE rispetto al gruppo CT (*vd. figura 17*).

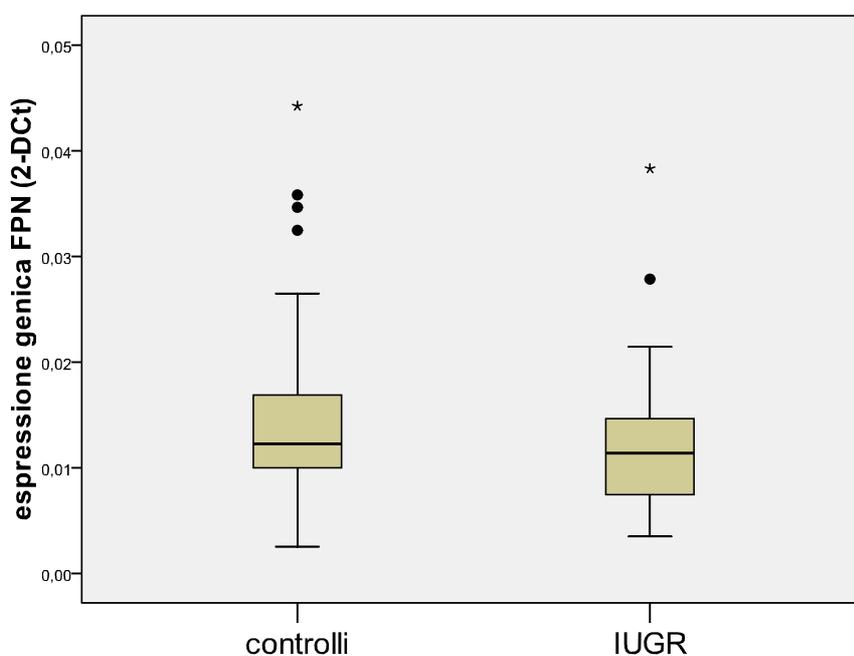
Inoltre è stata eseguita un'analisi di correlazione tra l'espressione genica del TfR1 e l'epoca gestazionale dell'intera popolazione su cui è stato analizzato il messaggero del TfR1. La Correlazione di Pearson su 41 campioni non ha evidenziato una correlazione significativa tra i due parametri ovvero la variazione di espressione del TfR1 non è influenzata dalla diversa epoca gestazionale del gruppo CT e dei gruppi PE e PE+IUGR. L'assenza di correlazione significativa tra espressione genica del TfR1 e la progressione della gravidanza potrebbe essere dovuta al livello massimo di espressione del recettore di uptake del ferro nell'ultimo trimestre di gravidanza.

Non è stata rilevata alcuna correlazione significativa tra espressione genica del TfR1 e i parametri clinici materni e fetali (età materna, body mass index BMI, epoca gestazionale, peso del feto e della placenta e pO<sub>2</sub> del sangue della vena ombelicale ).

## ***Analisi di espressione genica della ferroportina (FPN)***

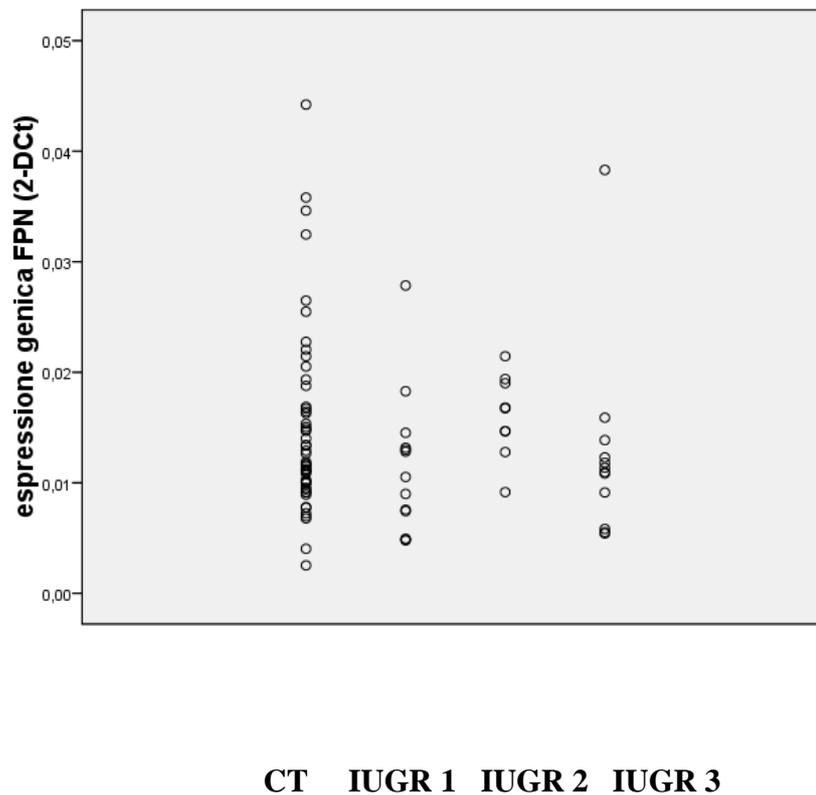
Sono stati analizzati 50 campioni CT vs. 33 IUGR, 28 campioni CT vs. 10 PE e 15 PE+IUGR. E' stato valutato se esistono differenze nei livelli di espressione genica della ferroportina tra placente CT, placente IUGR, placente PE e placente PE+IUGR. Inoltre sono state valutate possibili correlazioni tra l'espressione genica della ferroportina e diversi parametri clinici, quali l'età materna, l'epoca gestazionale, il peso del feto e della placenta, il sesso e la gravità dello IUGR e della PE.

Come mostrato in *figura 19* i livelli di espressione del gene della FPN delle placente IUGR non sono significativamente diversi da quelli delle placente CT.



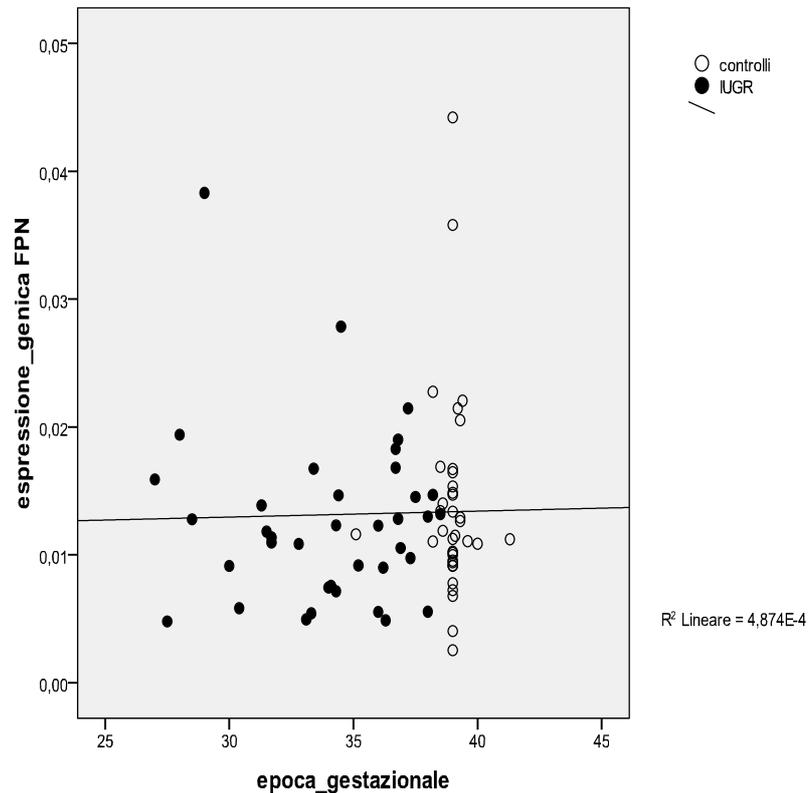
***Figura 19: Real Time PCR: confronto tra i livelli di espressione genica (mRNA) della FPN in placente fisiologiche di controllo (CT) e in placente con ritardo di crescita intrauterino (IUGR). I livelli di mRNA nelle placente IUGR non sono significativamente diversi rispetto alle placente CT. Test statistico U di Mann Whitney (p=NS). Le linee orizzontali rappresentano i valori delle mediane.***

In *figura 20* è invece mostrata l'espressione genica della FPN in campioni CT e in campioni IUGR suddivisi per severità della patologia valutata in base alla frequenza cardiaca fetale (FR) e all'indice di pulsatilità arteriosa (PI). Anche in questo caso non sono state evidenziate differenze significative nell'espressione genica della FPN tra il gruppo controllo e i diversi gradi di severità di IUGR.



***Figura 20: Real Time PCR: confronto tra i livelli di espressione genica della FPN in placentе controllo CT e in placentе IUGR divise in base alla loro severità clinica. Da sinistra a destra: 50 campioni controllo, 13 campioni IUGR di gravità 1, 8 campioni IUGR di gravità 2, 12 campioni IUGR di gravità 3.***

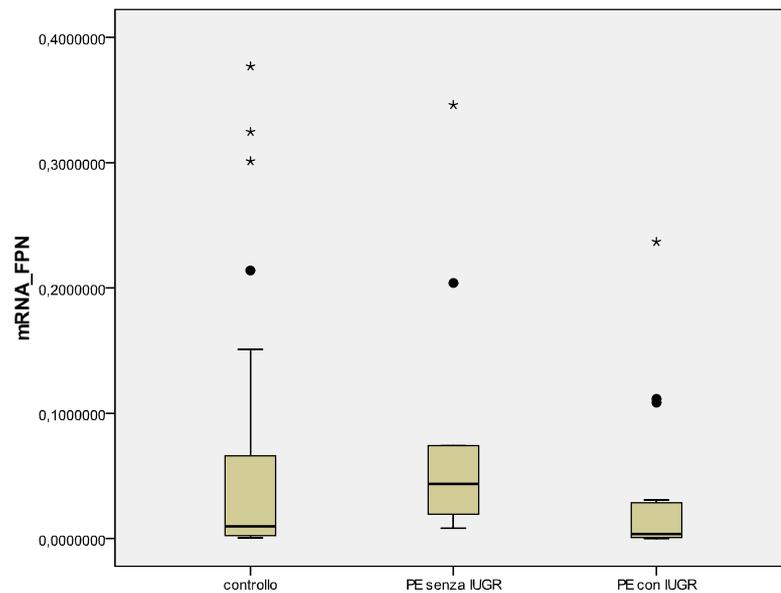
E' stata fatta l'analisi di correlazione di Pearson tra l'espressione genica della FPN e l'epoca gestazionale della popolazione analizzata. La *figura 21* mostra la retta di regressione tra espressione genica della FPN e epoca gestazionale delle gravidanze dei campioni CT e IUGR: nel range di età gestazionale in cui cadono i campioni placentari analizzati (27-41 settimana di gestazione), non è stata rilevata alcuna correlazione tra i due parametri ovvero l'espressione genica della ferroportina non varia con il progredire della gravidanza.



**Figura 21: Retta di Regressione Lineare.** Non c'è correlazione significativa tra espressione genica della ferroportina e epoca gestazionale (da 27 a 41 settimane di gestazione).

Poiché la pre-eclampsia (PE) è un disordine associato ad inefficiente placentazione ed è una delle cause che conduce a parto prematuro e a restrizione di crescita intrauterina, si è estesa l'analisi di espressione genica della FPN in campioni placentari di gravidanze PE e PE accompagnate da restrizione di crescita intrauterina.

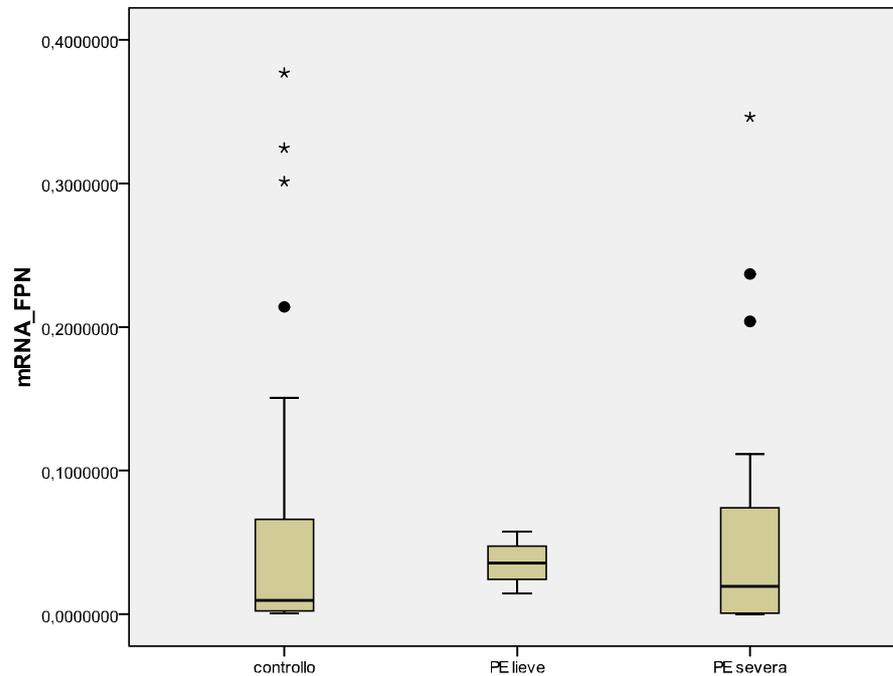
Come mostrato in *figura 22*, l'analisi dell'espressione genica della FPN in 28 campioni CT, in 10 campioni PE e in 15 campioni PE+IUGR non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i vari gruppi.



**Figura 22:** *Analisi di espressione genica della FPN eseguita con Real Time PCR in 28 campioni CT, 10 PE e 15 PE+IUGR. Le linee orizzontali rappresentano i valori delle mediane. Test statistico U di Mann Whitney:p=NS*

L'espressione genica della FPN è stata poi analizzata suddividendo le gravidanze patologiche per gravità della pre-eclampsia, valutata in base alla settimana di insorgenza della patologia, ai livelli pressori e proteinurici e alla presenza di restrizione di crescita fetale. Suddividendo i campioni per settimana di insorgenza della PE (prima o dopo la 34° settimana di gestazione), sono stati analizzati 6 campioni con PE precoce e 7 con PE tardiva vs. 28 CT. In base ai livelli di pressione e proteinuria e alla presenza di restrizione di crescita intrauterina sono stati analizzati 4 campioni con PE lieve e 21 con PE grave vs. 28 CT. In entrambi i tipi di classificazione dei campioni pre-eclamptici (PE precoce o tardiva e PE lieve o grave) non è stata rilevata una differenza significativa nell'espressione della FPN tra i vari gruppi patologici e il gruppo CT.

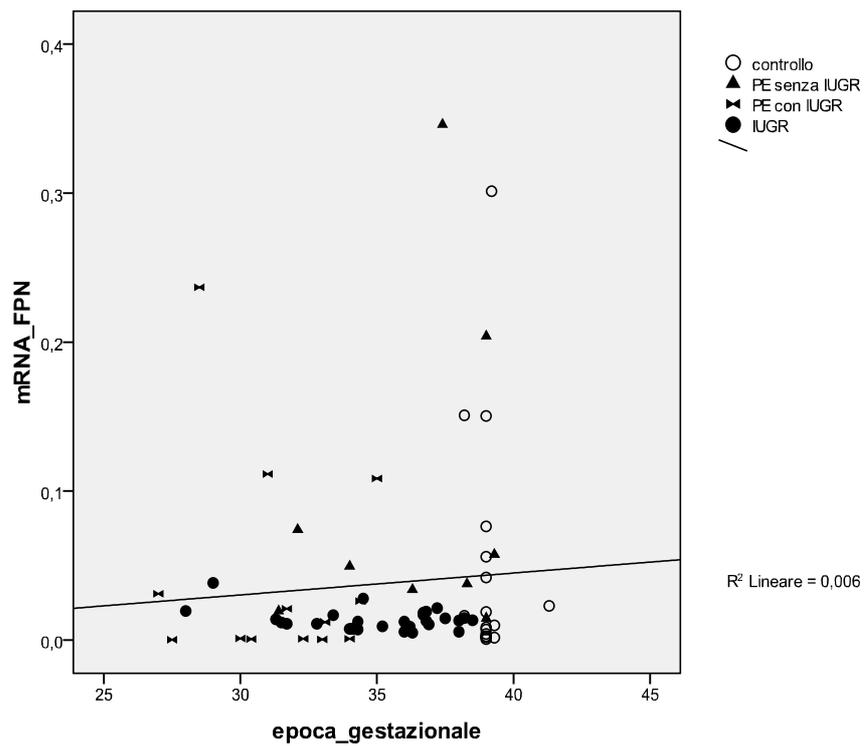
La *figura 23* mostra i livelli di messaggero della Fpn nel gruppo CT, nel gruppo PE lieve e nel gruppo PE severa.



**Figura 23:** Espressione genica della Fpn in: 28 campioni CT, 4 campioni con PE lieve e 21 campioni PE grave,  $p = NS$ .

Come per il Recettore della Transferrina, per poter analizzare l'influenza dell'età gestazionale sull'espressione della FPN è stata applicata la correlazione di Pearson tra espressione genica della FPN e l'epoca gestazionale dei campioni CT, PE e PE+IUGR: anche in questo caso non è stata rilevata una correlazione significativa tra i due parametri ( $p=NS$ ).

In *figura 24* è mostrata invece la retta di regressione tra l'espressione genica della FPN e l'età gestazionale dell'intera popolazione di studio (CT, IUGR, PE e PE+IUGR): come mostrato l'espressione genica della FPN non varia significativamente con l'aumentare dell'età gestazionale ( $R^2=0,006$ ).



**Figura 24:** Retta di Regressione tra espressione genica della FPN e l'epoca gestazionale (27-41 settimane di gestazione) dell'intera popolazione studiata: CT, PE, PE senza IUGR e PE + IUGR ( $R^2=0,006$ ).

Poiché il fumo di sigarette è dimostrato ridurre il rischio di pre-eclampsia (Kahan S.R. 2011) è stata quantificata l'espressione genica del TfR1 e della FPN in campioni placentari di donne fumatrici e non fumatrici affette da PE o da PE+IUGR. In particolare, l'analisi è stata condotta su 22 campioni di cui era disponibile l'informazione riguardo al fumo.

Su un totale di 22 donne gravide di cui è stato fatto il campionamento placentare per lo studio di espressione genica: 20 non fumano (91%) e 2 continuano a fumare anche in gravidanza (9%); tra le 20 che non fumano, 5 sono ex-fumatrici (23%) e quindi 15 risultano non aver mai fumato (68%). L'espressione genica delle due proteine trasportatrici del ferro è stata analizzata in ciascuna delle categorie di fumo sopra citate. Non è stata rilevata alcuna differenza significativa di espressione sia suddividendo i campioni per fumo e no-fumo che suddividendoli per ex-fumo, mai-fumo e fumo (*Test statistico U di Mann Whitney:p=NS*).

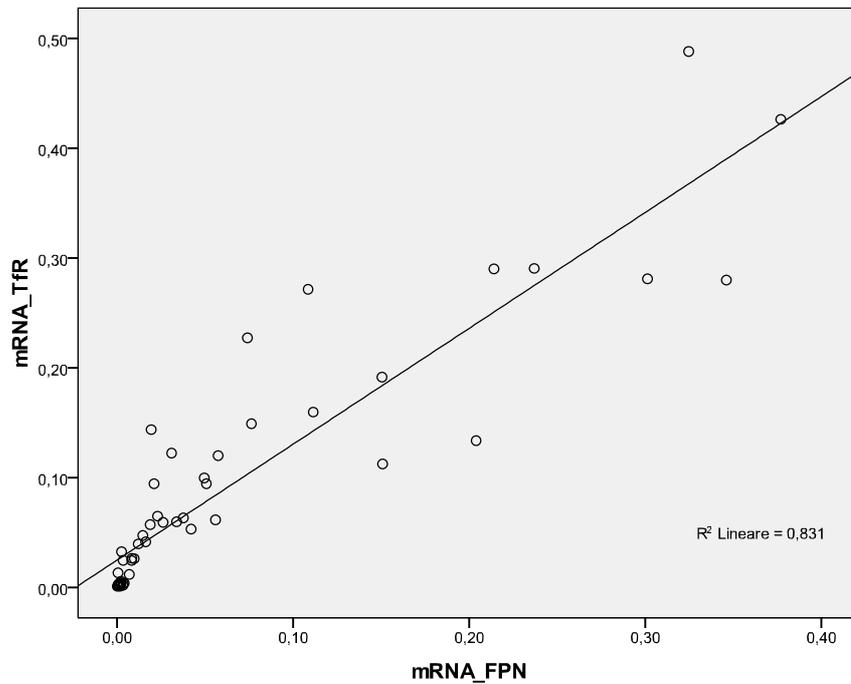
Per poter evidenziare una possibile influenza del sesso del feto sull'espressione delle due proteine trasportatrici del ferro è stata quantificata l'espressione genica del TfR1 e della FPN per sesso (maschio o femmina). L'analisi è stata fatta su un totale di 40 campioni di cui si aveva a disposizione l'informazione sul sesso e su cui era stato quantificato il mRNA per TfR1 e FPN. Non è stata rilevata una differenza statisticamente significativa per l'espressione genica del TfR1 e della FPN nei due gruppi analizzati (*Test statistico U di Mann Whitney:p=NS*).

Sull'intera popolazione in studio (CT, IUGR, PE e PE+IUGR) sono state analizzate le possibili correlazioni tra espressione genica della FPN e alcuni parametri clinici: la correlazione di Pearson non ha rilevato alcuna relazione significativa tra i livelli di espressione genica della FPN e i parametri clinici presi in esame (età materna, body mass index BMI, epoca gestazionale, peso del feto e della placenta e pO2 del sangue della vena ombelicale ).

		<b>Età materna</b>	<b>BMI</b>	<b>Epoca gestaz</b>	<b>Peso fetale</b>	<b>Peso placentare</b>
<b>Espressione genica FPN</b>	<i>Significatività(p della correlazione)</i>	0,861	0,266	0,851	0,662	0,949
	<i>Numerosità</i>	76	55	75	74	69

***Tabella 7: Correlazioni tra l'espressione genica della FPN e i parametri clinici in esame (Correlazione di Pearson).***

E' stata studiata la relazione tra l'espressione genica del TfR1 e della Fpn. L'analisi di correlazione di Pearson eseguita su 52 campioni ha rilevato una correlazione positiva e significativa ( $p < 0,001$ ) tra l'espressione genica del TfR1 e della Fpn (*figura 25*), evidenziando un'evidente correlazione nell'attività di queste due proteine di trasporto del ferro.

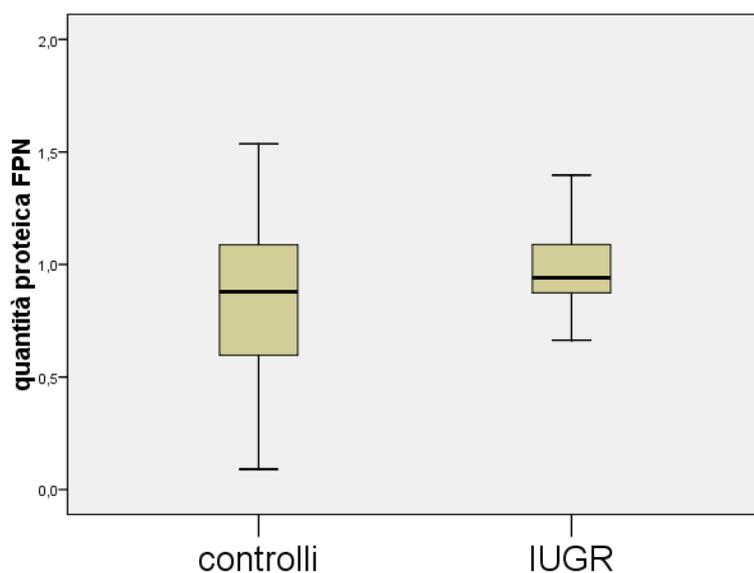


***Figura 25: Retta di Regressione: relazione lineare e positiva tra espressione genica del TfR1 e della Fpn.  $R^2=0,831$ ,  $N= 52$  campioni analizzati,  $p < 0,001$ .***

# STUDIO DELL'ESPRESSIONE PROTEICA DELLA FERROPORTINA (FPN)

Non avendo osservato alcuna differenza significativa nella espressione genica della ferroportina e poiché è noto che la FPN è regolata a livello post-trascrizionale, ho ipotizzato che la sua espressione potesse essere deregolata nel gruppo IUGR a livello post-trascrizionale. Ho quindi proseguito lo studio analizzando l'espressione proteica della FPN, mediante saggio ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), su estratto proteico di tessuto placentare. Complessivamente sono stati analizzati 26 campioni CT vs. 14 IUGR.

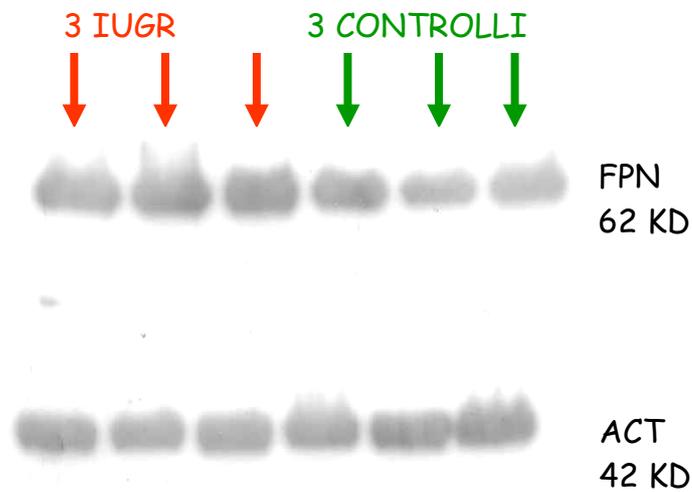
Come mostrato in *figura 26* i livelli di espressione proteica riscontrati nelle placente IUGR non sono significativamente diversi da quelli riscontrati nelle placente CT.



**Figura 26:** Confronto tra i livelli di espressione proteica della FPN in 26 placente fisiologiche (CT) e in 14 placente con ritardo di crescita intrauterino (IUGR). Le concentrazioni di ferroportina nelle placente IUGR non sono significativamente diversi rispetto alle placente CT. (Test statistico U di Mann Whitney:  $p=NS$ ).

A conferma del dato ottenuto con il saggio ELISA (tecnica quantitativa) fatto su numerosità elevata di campioni CT e IUGR è stato fatto anche un Western Blot (tecnica semiquantitativa) solo su 3 campioni CT e 3 campioni IUGR.

Questo ha consentito di confermare il dato di espressione proteica della FPN ottenuto col saggio ELISA.



**Figura 27:** *Western Blot su 3 campioni CT e 3 campioni IUGR. E' mostrata la banda della ferroportina con peso molecolare di 62 KDalton e la banda della  $\beta$  actina con peso molecolare di 42KDalton. L'actina viene utilizzata come housekeeping per normalizzare il dato della ferroportina. L'analisi densitometrica della bande non mostra differenze significative tra i due gruppi analizzati. (Test statistico U di Mann Whitney:p=NS).*

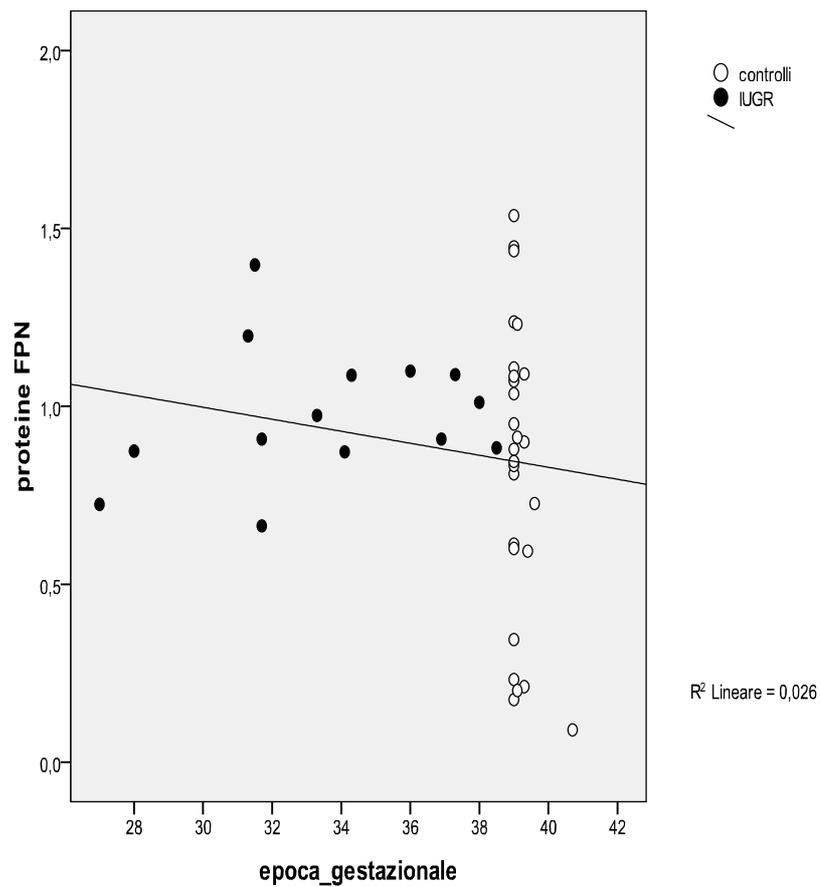
Anche suddividendo per gravità della patologia IUGR (4 campioni appartenenti al gruppo IUGR con severità 1, un campione appartenente al gruppo IUGR con severità 2 e 8 campioni appartenenti al gruppo IUGR con severità 3) non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nell'espressione proteica della FPN tra i vari gruppi analizzati.

Si sono valutate le possibili correlazioni tra l'espressione proteica della ferroportina e parametri clinici diversi della popolazione, quali l'età materna, l'epoca gestazionale, il peso del feto e della placenta, l'indice di massa corporea (BMI) e il sesso. Non è stata osservata alcuna relazione significativa nella popolazione in studio tra i livelli di espressione proteica della FPN e i parametri clinici presi in esame. La *Tabella 7* mostra le correlazioni con età materna, body mass index BMI, epoca gestazionale, peso del feto e della placenta).

		<b>Età materna</b>	<b>BMI</b>	<b>Epoca gestaz</b>	<b>Peso fetale</b>	<b>Peso placentare</b>
<b>Espressione proteica FPN</b>	<i>Significatività p della correlazione</i>	0,725	0,648	0,318	0,635	0,993
	<i>Numerosità</i>	40	37	40	40	34

***Tabella 7: Correlazioni tra l'espressione proteica della ferroportina e i parametri clinici della popolazione in esame..***

In particolare è stata fatta l'analisi di correlazione tra l'espressione proteica della Fpn e l'epoca gestazionale della popolazione analizzata (CT e IUGR). Come mostrato in *figura 28*, nel range di età gestazionale in cui cadono i campioni placentari analizzati (27-41 settimana di gestazione), non è stata rilevata alcuna relazione significativa tra i due parametri ovvero l'espressione proteica della ferroportina non varia con il progredire della gravidanza.

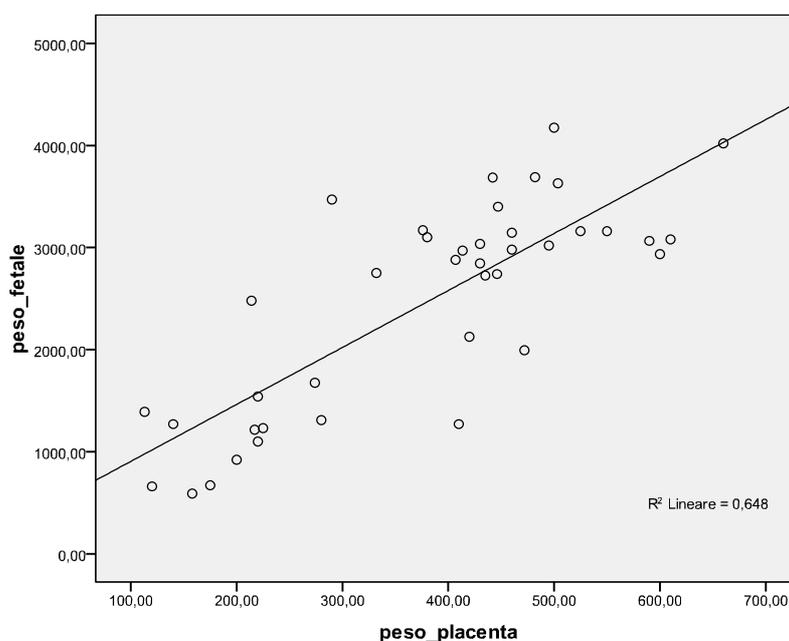


**Figura 28: Analisi di Regressione Lineare.** Relazione tra espressione proteica della ferroportina e epoca gestazionale (da 27 a 41 settimane di gestazione) sulla popolazione CT e IUGR utilizzata per l'analisi proteica della FPN.

# CORRELAZIONE TRA PESO FETALE E PESO PLACENTARE

La dimensione della placenta influisce direttamente sulla capacità di trasferimento dei nutrienti poiché viene modificata la superficie di scambio disponibile. Questo suggerisce che lo sviluppo della placenta esercita un'influenza determinante sulla dimensione del bambino (Thame M et al, 2004).

L'analisi dei parametri clinici all'interno della popolazione in studio ha messo in evidenza una correlazione positiva fortemente significativa tra peso fetale e peso placentare alla nascita, sia per le gravidanze controllo che per quelle affette da ritardo di crescita intrauterino e da pre-eclampsia, come mostrato in *figura 29*.



***Figura 29:*** *Correlazione lineare positiva tra peso fetale e peso placentare alla nascita effettuata sull'intera popolazione ovvero casi controllo e patologici.*

La correlazione tra peso placentare e peso fetale evidenzia come la dimensione della placenta influisca direttamente sulla capacità di trasferimento dei nutrienti al feto e quindi come una disfunzione nel trasporto placentare possa avere serie conseguenze sul corretto accrescimento e sviluppo fetale.

Come atteso, sia il peso fetale che il peso placentare correlano significativamente con l'epoca gestazionale ( $p < 0,01$ ).

# RELAZIONE TRA INTAKE ALIMENTARE, SUPPLEMENTAZIONE CON FERRO, STATO EMATICO E OUTCOMES DELLA GRAVIDANZA

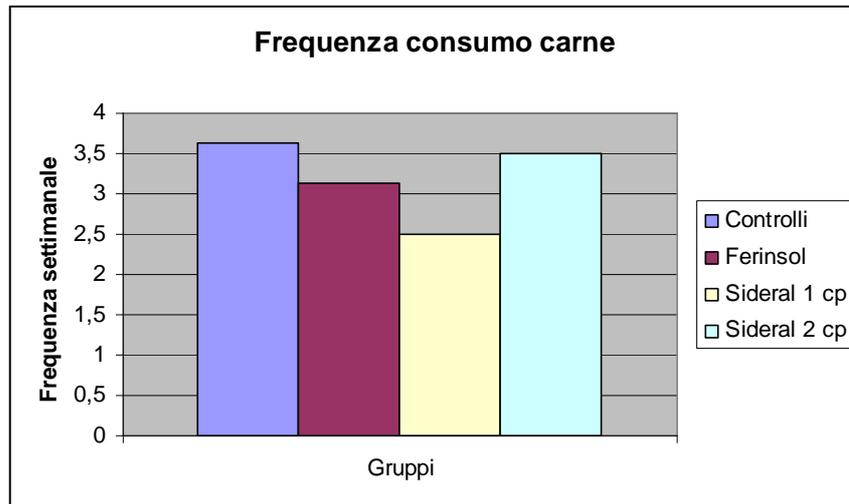
Come mostrato nella *tabella 5* sotto riportata, i 4 gruppi (controllo, ferro solfato 30 mg, ferro liposomiale 14 mg e ferro liposomiale 28 mg) sono risultati omogenei per età, indice di massa corporea (BMI), incremento ponderale, parità e fumo. Inoltre i 4 gruppi analizzati sono risultati omogenei per lo stato socioeconomico valutato in base al titolo di studio e alla professione.

Gruppi	Età	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Incremento ponderale	Nulliparità %	Fumatrici %	Età gestazionale al parto
<b>Controlli</b> (n=19)	30.5±4.8	22.4±1.3	8.4±3.0	42.0	21.0	39.8±0.8
<b>Fe Solfato 30 mg</b> (n=14)	29.4±4.9	21.6±2.7	7.4±2.0	63.6	27.2	39.2±1.1
<b>Fe liposomiale 14 mg</b> (n=12)	31.0±5.2	25.4±4.3	9.4±2.5	45.5	18.2	39.4±1.0
<b>Fe liposomiale 28 mg</b> (n=11)	30.1±3.9	21.9±2.9	8.5±2.2	45.5	18.1	38.9±1.4

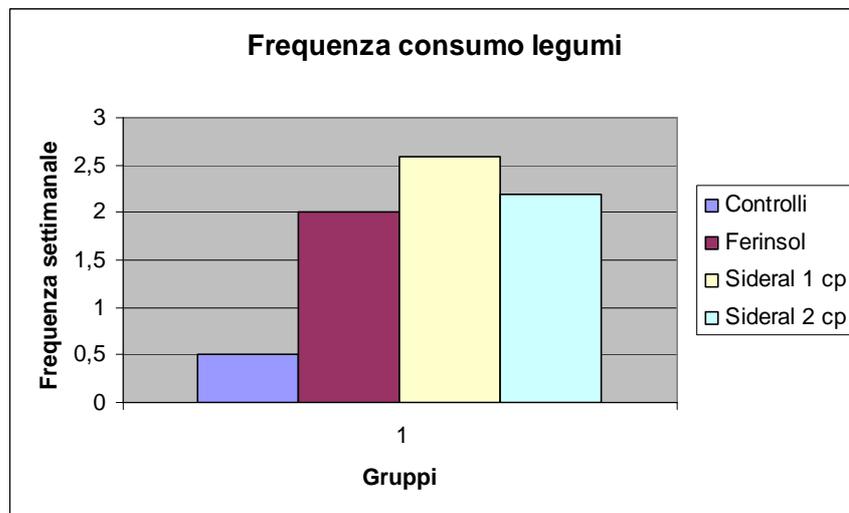
**Tabella 5:** *Caratteristiche materne a 28-31 settimane di gestazione. I risultati sono espressi come media ± deviazione standard.*

L'analisi dei questionari alimentari (Food Frequency Questionnaire FFQ) ha rilevato che nonostante l'identico livello socioeconomico tra i vari gruppi, il gruppo di controllo assume una quantità maggiore di carne. Nella carne il ferro è presente come ferro emico ovvero in una forma chimica maggiormente biodisponibile rispetto al ferro non emico (legumi e verdure a foglia verde) (vd *figura 30*).

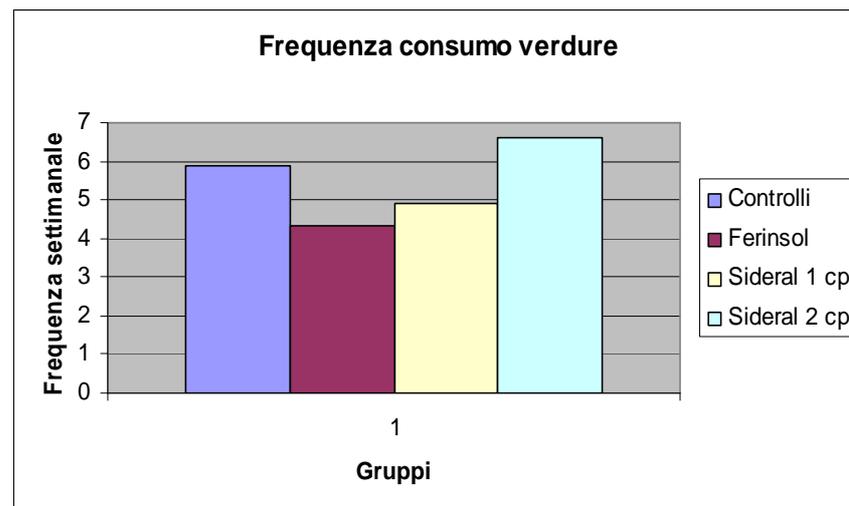
a)



b)



c)



**Figura 30:** Grafici di intake alimentare ottenuti dall'analisi del Food Frequency Questionnaire FFQ. a) frequenza del consumo di carne b) frequenza del consumo di legumi c) frequenza del consumo di verdure a foglia verde nei 4 gruppi di studio: gruppo controllo, gruppo Ferinson (ferro solfato 30 mg), gruppo Sideral 1 cp (ferro pirofosfato liposomiale 14 mg) e gruppo Sideral 2 cp (ferro pirofosfato liposomiale 28 mg).

L'analisi dei parametri ematochimici ha rilevato concentrazioni di emoglobina (Hb) materna significativamente maggiori nel gruppo supplementato con ferro liposomiale 28 mg (Sideral 2 cp) rispetto al gruppo di controllo ( $p = 0,03$ ) (tabella 8 e figura 31), mentre non ha rilevato differenze significative per i livelli di sideremia (ferritina e ferro sierico) e per i restanti parametri ematochimici in studio tra i vari gruppi.

	Controllo	Fe liposomiale 14 mg (Sideral 1cp)	Fe liposomiale 28 mg (Sideral 2cp)	Fe solfato 30 mg (Ferinsol)
<b>Ferro sierico</b>	86,9±29 N=12	82,6±37 N=11	71,4±18 N=10	92,9±25,4 N=9
<b>Ferritina sierica</b>	22,7±15 N=12	24±13 N=11	30±16 N=10	24,4±9,5 N=11
<b>Emoglobina</b>	11*±0,4 N=13	11,2±0,4 N=11	11,5*±0,4 N=11	11,2±0,8 N=11

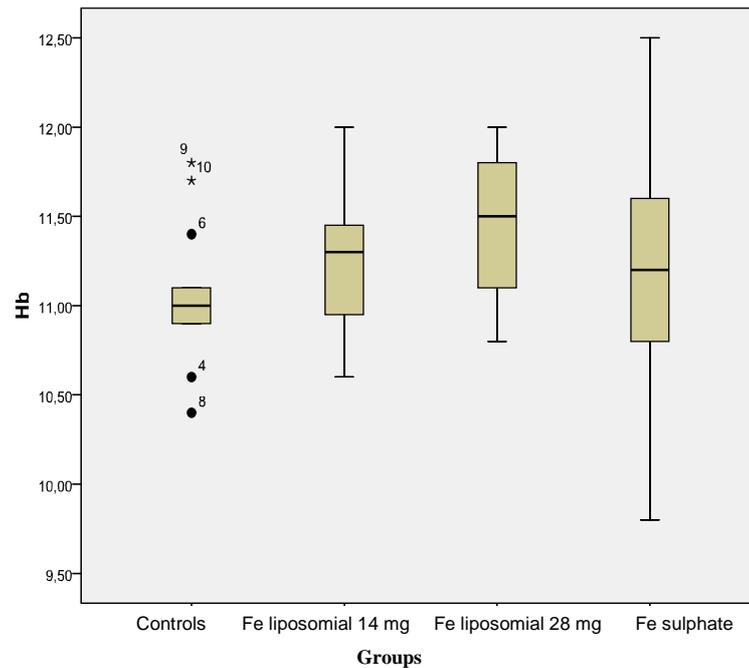
**Tabella 8:** *Principali valori ematochimici ottenuti da prelievo venoso della popolazione in studio alla 28 settimana di gestazione. I dati sono mostrati come media ± deviazione standard. N=numero di ciascun gruppo. L'Hb materna è significativamente maggiore nel gruppo controllo rispetto al gruppo supplementato con ferro liposomiale 28 mg (Sideral 2) (\* $p = 0,03$ ).*

Come mostrato in tabella 9, il 26,3% delle donne gravide del gruppo di controllo non supplementato, il 15,4% delle donne gravide supplementate con Ferro Solfato 30 mg e l'8,3% delle donne gravide supplementate con ferro liposomiale 14 mg, sviluppano anemia sideropenica nel corso della gravidanza.

	Controllo	Ferro Solfato 30 mg (Ferinsol)	Ferro Liposomiale 14 mg (Sideral 1cp)	Ferro Liposomiale 28 mg (Sideral 2cp)
<b>N° casi anemia sideropenica</b>	5	2	1	0
<b>N° totale casi</b>	19	13	12	11
<b>% insorgenza anemia sideropenica</b>	26,3%	15,4%	8,3%	0%

**Tabella 9:** *Percentuale di insorgenza di anemia sideropenica (livello di ferro e ferritina nel siero) per gruppo a 28 settimane di gestazione.*

Come mostrato in *tabella 9*, a 28 settimane di gestazione, 5 donne gravide del gruppo di controllo, 2 del gruppo supplementato con ferro solfato 30 mg e 1 donna gravida del gruppo supplementato con ferro liposomiale 14 mg sviluppano anemia sideropenica. Non si sono invece verificati casi di anemia nel gruppo supplementato con ferro liposomiale 28 mg.



**Figura 31:** Concentrazione di emoglobina materna (Hb) nei 4 gruppi a 28 settimane di gestazione. L'Hb è significativamente maggiore nel gruppo supplementato con ferro liposomiale 28 mg rispetto al gruppo di controllo ( $p=0,03$ ).

Nessuna differenza significativa è stata rilevata riguardo gli outcomes gravidici nei 4 gruppi: non sono state trovate differenze significative nel peso placentare e neonatale, nell'età gestazionale al parto e/o nel pH dell'arteria ombelicale.

# CONCLUSIONI

Il ritardo di crescita intrauterino (IUGR) e la pre-eclampsia (PE) sono patologie gravidiche caratterizzate da una inadeguata funzione placentare con conseguente alterazione nel trasporto di nutrienti e di ossigeno al feto.

Tra i micronutrienti essenziali per la crescita e lo sviluppo fetale vi è il ferro, elemento fondamentale per molti processi catalitici, per la respirazione mitocondriale e soprattutto per la sintesi di emoglobina e quindi per il trasporto di ossigeno. Uno sbilanciamento nei livelli di ferro determina alterazioni nelle funzioni enzimatiche ed essendo il ferro uno ione coinvolto nelle reazioni di ossido-riduzione un suo sbilanciamento è anche causa di stress ossidativo.

E' noto che la carenza di ferro in gravidanza aumenta fortemente il rischio di basso peso alla nascita e parto prematuro e altera lo sviluppo e la crescita del bambino (Beard et al., 2007; Allen et al., 2000; Malhotra et al., 2002; Gambling et al., 2003); nell'adulto può risultare in problemi cardiovascolari ed altre patologie (Lozoff et al., 1996; Zimmerman et al., 2007; Godfrey et al., 1991; Godfrey et al., 1995).

Il ferro viene trasportato attivamente e contro gradiente di concentrazione dalla madre al feto dunque un ruolo importante nella crescita fetale va attribuito ai trasportatori di questo micronutriente che ne mediano il passaggio verso il feto attraverso la barriera placentare.

In un precedente studio condotto nel laboratorio in cui ho svolto le mie ricerche è stato dimostrato che l'espressione genica e proteica del Recettore per la Transferrina 1 (TfR1), responsabile dell'ingresso di ferro nelle cellule placentari di sinciziotrofoblasto, è significativamente minore nelle placentate complicate da restrizione di crescita intrauterino (IUGR) rispetto alle placentate di controllo (CT) (C. Mandò et al., 2011).

Alla luce di ciò, ho ipotizzato che la minore espressione del TfR1 nelle placentate IUGR potesse essere determinata da un accumulo intracellulare di ferro, noto elemento di regolazione del TfR1 (Mckie et al. 2002). Ho quindi studiato l'espressione genica e proteica della ferroportina (FPN), principale proteina esportatrice di ferro dalle cellule di trofoblasto verso lo stroma placentare e coinvolta dunque nel passaggio di questo essenziale micronutriente dalla madre al feto.

Mai nessuno ad oggi ha indagato l'espressione di questo importante trasportatore del ferro in placentate umane IUGR rispetto ai CT. Ho quindi analizzato i livelli di espressione genica (mRNA) e proteica della FPN in placentate di gravidanze normali (CT) e complicate da IUGR, al fine di valutare se una possibile carenza della Ferroportina (FPN) possa essere una delle cause della minore espressione del TfR1 osservata nelle placentate IUGR.

Dall'analisi in Real Time PCR, l'espressione genica della ferroportina non è risultata significativamente diversa nelle placentate di controllo (CT) rispetto alle placentate con ritardo di crescita intrauterino (IUGR). Inoltre non sono state rilevate differenze nell'espressione genica della FPN tra i diversi gradi di severità della patologia IUGR ed i CT.

È noto però che l'espressione della FPN sia regolata anche a livello post-trascrizionale, poichè sul messaggero della ferroportina è presente un Iron Regulatory Element (IRE) in grado di legare le Iron Regulatory Proteins, a loro volta attivate dalla presenza del ferro (Mckie et al. 2002).. Ho dunque proseguito lo studio analizzando l'espressione proteica della FPN in placentate IUGR e in placentate CT. Anche l'espressione proteica non è risultata significativamente diversa nelle placentate IUGR rispetto alle placentate CT.

Sarà necessario misurare la quantità di ferro intracellulare per verificare se eventuali altri meccanismi portino ad un accumulo di ferro nelle cellule di trofoblasto, responsabile della down regolazione del TfR1.

La diminuzione di espressione del TfR1 e l'invariata espressione della FPN in placentate IUGR rispetto ai controlli fanno supporre che la quantità di ferro che arriva ai feti IUGR sia minore rispetto ai feti di controllo. Sarà dunque necessario misurare i livelli di ferro nel sangue cordonale per verificare questa ipotesi.

Il ferro è elemento essenziale per la sintesi di emoglobina quindi una diminuzione della quantità di ferro che giunge al feto potrebbe influire sulla sintesi di emoglobina fetale. L'analisi dell'emoglobina fetale venosa e arteriosa non ha rilevato differenze significative tra gruppo CT e gruppo IUGR ma poiché l'emoglobina non è il solo parametro ematochimico indice dello stato di ferro fetale, sarà necessario analizzare altri parametri (ferritina, transferrina, TfRs Recettore Solubile della Transferrina, Ferro sierico) la cui concentrazione potrebbe essere influenzata dal livello di ferro che arriva al feto.

Il mio progetto di Dottorato di Ricerca è poi proseguito con l'analisi delle proteine di trasporto del ferro anche in placentate di gravidanze pre-eclamptiche, anch'esse come lo IUGR caratterizzate da insufficienza placentare.

Nella pre-eclampsia si ha elevato stress ossidativo generato da variazioni del flusso uteroplacentare e in particolare da ripetuti cicli di ipossia/riossigenazione. Ciò rappresenta una delle cause dell'anomalo sviluppo e differenziazione del trofoblasto e conseguente alterazione della funzionalità placentare: l'inefficiente placentazione è una caratteristica della patologia pre-eclamptica. Lo stato di eccessivo stress ossidativo placentare potrebbe anche interferire con il trasporto del ferro dalla madre al feto.

Quindi, poichè come la patologia IUGR anche la PE è caratterizzata da una alterazione nei meccanismi di trasporto dei micronutrienti, ho esteso la mia ricerca analizzando i livelli di espressione di questi due importanti trasportatori del ferro (TfR1 e FPN) in campioni placentari di gravidanze complicate da PE e da PE+IUGR, che ad oggi nessuno ha mai studiato. Recenti studi hanno evidenziato una maggiore concentrazione di ferro, di epcidina e di ferritina nel siero di donne con gravidanze complicate da PE (Toldi G et al., 2010); inoltre è stata osservata una maggiore attività ferro-ossidasi della ceruloplasmina placentare in gravidanze complicate da PE rispetto ai controlli (Seth Guller et al., 2008). La dimostrata maggiore attività della ceruloplasmina che ossida il Fe (2+), esportato dalla FPN, alla forma meno tossica Fe (3+), viene interpretata dagli autori come protezione all'eccessivo danno ossidativo delle placente PE. Ciò induce allo studio dell'espressione della ferroportina la cui funzione è strettamente correlata all'attività ferro-ossidasi della ceruloplasmina.

Ho quindi analizzato l'espressione del TfR1 e della FPN in tessuto placentare di gravidanze CT, PE e PE + IUGR.

L'analisi in Real Time PCR non ha mostrato differenze significative di espressione genica del TfR1 e della FPN in placente PE e PE+IUGR rispetto ai controlli nonostante sia osservabile un trend di maggiore espressione di entrambe le proteine di trasporto nelle placente PE rispetto alle placente degli altri gruppi analizzati. Anche suddividendo i campioni IUGR e PE per gravità delle patologie gravidiche non è stata rilevata alcuna differenza significativa tra i vari gruppi.

In conclusione, i risultati ottenuti hanno messo in mostra una visione più completa del trasporto placentare del ferro nelle placente PE e PE+IUGR. Poiché, nonostante la mancata significatività, è possibile notare un trend di maggiore espressione del TfR1 e della FPN nelle placente PE rispetto ai CT, sarà necessario ampliare la casistica per lo studio di tali proteine nelle gravidanze complicate da PE per verificare se l'elevato stato infiammatorio e di stress ossidativo che caratterizza la pre-eclampsia possa effettivamente influire sul trasporto del ferro placentare.

Ho inoltre esaminato le caratteristiche cliniche della popolazione in esame ed eventuali correlazioni statistiche con l'espressione delle proteine TfR1 e della FPN coinvolte nel trasporto del ferro placentare.

L'analisi delle caratteristiche cliniche materne della popolazione ha mostrato una differenza statisticamente significativa nell'indice di massa corporea (BMI) tra campioni controllo e

campioni PE confermando tale parametro come fattore predisponente all'insorgenza di pre-eclampsia e rischio di esito avverso della gravidanza (Saeed F., et al. 2011).

A conferma di quanto già riportato in letteratura (Pardi G., 2003), l'analisi delle caratteristiche fetali ha evidenziato una diminuzione significativa nei livelli di pO<sub>2</sub> nella vena ombelicale dei campioni IUGR e PE+IUGR rispetto ai campioni di controllo: la diminuzione della pO<sub>2</sub> è risultata tanto maggiore quanto più severa è la patologia di restrizione di crescita riflettendo la condizione ipossica dei feti IUGR.

Una limitazione di questo studio è la significativa differenza nell'epoca gestazionale tra gravidanze patologiche e di controllo dei campioni analizzati: tale differenza potrebbe influenzare la variazione di espressione del TfR1 e della FPN. L'analisi di correlazione tra espressione di queste due proteine di trasporto del ferro e l'età gestazionale dei campioni placentari studiati non ha però rilevato una differenza statisticamente significativa tra i due parametri; in effetti è noto che l'espressione delle proteine di trasporto del ferro nel terzo trimestre di gravidanza è sempre molto alta per consentire il massimo trasferimento di ferro al feto.

Infine, l'analisi di correlazione tra l'espressione del TfR1 e l'espressione della FPN condotta sull'intera popolazione di studio ha evidenziato una correlazione positiva e significativa tra le due proteine di trasporto rilevando dunque una forte relazione nella loro funzionalità; non è stata rilevata una differenza di espressione del TfR1 tra gruppi PE e PE+IUGR e della FPN tra gruppi IUGR, PE e PE+IUGR rispetto ai CT, ma la variazione di espressione che si ha per singolo caso è osservabile con simile entità in entrambe le proteine di trasporto.

Saranno necessari ulteriori studi sulle proteine coinvolte nel trasporto del ferro (ferritina, IRPs, Divalent Metal Transporter 1 DMT1) per spiegare a pieno le eventuali disfunzioni che portano ad una ridotta sintesi di TfR1 nelle cellule placentari IUGR e per caratterizzare maggiormente il trasporto del ferro nelle placente di gravidanze complicate da IUGR e pre-eclampsia.

La placenta è un tessuto ricco di mitocondri, gli organelli deputati alla produzione di energia, ed è un organo altamente vascolarizzato ed esposto ad alte concentrazioni di ossigeno, contenuto nel sangue materno; ciò favorisce la produzione di radicali liberi, soprattutto a livello mitocondriale. Il ferro, microelemento essenziale per il corretto sviluppo e accrescimento fetale, è uno ione pro-ossidante il cui deficit o eccesso è in grado di generare radicali liberi che causano danno ossidativo alle cellule e ai tessuti (Esther Casanueva and Fernando E. Viteri, 2003). Alla luce di quanto appena detto, diventa importante definire i dosaggi ottimali e le formulazioni maggiormente tollerabili e biodisponibili della supplementazione marziale in gravidanza.

Ulteriore scopo di questo studio è stato dunque quello di determinare la relazione tra intake di ferro attraverso la dieta, supplementazione marziale e valori ematochimici materni per poter definire le quantità minime e le formulazioni di ferro più efficaci nella supplementazione in gravidanza.

Questo studio ha rilevato l'importanza della supplementazione con ferro in gravidanza nel prevenire l'insorgenza di anemia e in particolare ha evidenziato la maggiore biodisponibilità della forma ferro liposomiale 28 mg (Sideral 2 cp) rispetto al ferro solfato 30 mg (Ferinsol). Infatti, i risultati hanno evidenziato che nel gruppo controllo non supplementato si riscontra una maggiore percentuale di insorgenza di anemia rispetto ai 3 gruppi supplementati e che la supplementazione marziale in gravidanza previene lo sviluppo di anemia con una maggiore protezione offerta dal ferro liposomiale 28 mg. Inoltre il ferro liposomiale 28 mg risulta maggiormente biodisponibile rispetto al ferro solfato 30 mg in quanto, a parità di dosaggio e senza differenze di tollerabilità, la percentuale di donne gravide che sviluppa anemia è minore nel gruppo supplementato con ferro liposomiale 28 mg (0% vs. 15,4%).

La supplementazione con ferro in gravidanza non protegge invece dall'insorgenza di sideropenia: non è stata rilevata alcuna differenza significativa nei livelli di ferro e ferritina nei 4 gruppi di studio. L'assenza di differenze nei livelli di sideropenia potrebbe essere dovuta al diverso intake di ferro alimentare. Infatti dall'analisi dei questionari alimentari (Food Frequency Questionnaire, FFQ) è emerso che, nonostante i 4 gruppi siano omogenei per il loro livello socioeconomico, il gruppo di controllo assume una quantità maggiore di carne ovvero di ferro emico maggiormente biodisponibile rispetto ai 3 gruppi supplementati. Il maggior consumo di carne del gruppo controllo tende a livellare i vari gruppi di studio per quel che riguarda l'assunzione di ferro, impedendo il rilevamento di una effettiva protezione da sideropenia da parte della supplementazione marziale.

I 4 gruppi analizzati sono risultati omogenei riguardo agli esiti della gravidanza. L'assenza di differenze negli outcomes gravidici potrebbe essere legata all'esclusione delle donne anemiche a rischio maggiore di esiti avversi. Poiché non esiste infatti la possibilità di non supplementare una donna anemica e poiché per definizione i casi selezionati come controllo in questo studio possiedono una concentrazione di emoglobina maggiore di 10,5 g/dl, questo studio non consente di dare informazioni sugli esiti della gravidanza di una donna anemica.

In conclusione, i risultati ottenuti nel corso di questo dottorato di ricerca hanno consentito di avere una visione più completa del trasporto placentare del ferro nelle placente IUGR, PE e PE associate a IUGR. Inoltre, lo studio di diversi tipi di supplementazione marziale durante la gravidanza ha evidenziato diversità nella biodisponibilità tra le varie tipologie di ferro somministrate. Tutti questi studi saranno ampliati nel prossimo futuro per consentire una maggiore comprensione del ruolo del ferro nella gravidanza e nelle patologie ad essa correlate.

# BIBLIOGRAFIA

- **Alexander GR**, Kogan M, Bader D, Carlo W, Allen M, Mor J. *US birth weight/gestational age-specific neonatal mortality: 1995-1997 rates for whites, hispanics, and blacks*. *Pediatrics* 2003;111:e61-6
- **Allen LH**. *Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome*. *Am J Clin Nutr*. 2000 May;71(5 Suppl):1280S-4S. Review
- **Ar A, Mover H**. *Oxygen tension in developing embryos: System inefficiency or system requirement?* *Isr J Zool* 1994;40:307–26.
- **Balla J**, Jeney V, Varga Z, Komo’di E, Nagy E, Balla G. *Iron homeostasis in chronic inflammation*. *Acta Physiol Hung* 2007; 94:95–106.
- **Baschat AA**. *Fetal responses to placental insufficiency: an update*. *Br J Obstet Gynaecol* 2004;111:1031-41
- **Basher K**, Deb K. *Alteration in iron status in preeclampsia*. *Mymensingh Med J* 2006;15:22–4.
- Beard JL**. *Iron deficiency: assessment during pregnancy and its importance in pregnant adolescents*. *Am J Clin Nutr*. 1994 Feb;59(2 Suppl):502S-508S discussion 508S-510S. Review.
- **Beard JL**, Unger EL, Bianco LE, Paul T, Rundle SE, Jones BC. *Early postnatal iron repletion overcomes lasting effects of gestational iron deficiency in rats* .*J Nutr*. 2007 May;137(5):1176-82.
- **Bothwell TH** *Iron requirements in pregnancy and strategies to meet them..* *Am J Clin Nutr*. 2000 Jul;72(1 Suppl):257S-264S. Review.
- **Cairo G**, Recalcati S, Mantovani A, Locati M. *Iron trafficking and metabolism in macrophages:contribution to the polarized phenotype*. *Trends Immunol*. 2011 Jun;32(6):241-247.
- **Carriaga MT**, Skikne BS, Finley B, Cutler B, Cook JD. *Serum transferrin receptor for the detection of iron deficiency in pregnancy*. *Am J Clin Nutr*. 1991 Dec;54(6):1077-81.
- **Carter AM**. *Placental oxygen consumption. Part I: in vivo studies – a review*. *Placenta*, 2001; 21(Suppl.A):S31–7.
- **Casanuera Esther** and Fernando E. Viteri. *Iron and Oxidative Stress in Pregnancy*. *J.Nutr*. 2003
- **Cetin I**, Foidart JM, Miozzo M, Raun T, Jansson T, Tsatsaris V, Reik W, Cross J, Hauguel-de-Mouzon S, Illsley N, Kingdom J, Huppertz B. *Fetal growth restriction: a workshop report*. *Placenta*. 2004 Sep-Oct;25(8-9):753-7.

- **Cetin I.**, Alvino G., Radaelli T., Pardi G. *Fetal nutrition: A review*. Acta Paediatr Suppl. 2005-A Oct;94(449):7-13. Review.
- **Cetin I.**, Radaelli T. *Normal and Abnormal Fetal Growth*. In: Djelmiš J, Desoye G, Ivanišević M (eds): Diabetology of Pregnancy. Front Diabetes. Basel, Karger, 2005-B, vol 17, pp72-82.
- **Cetin I.**, Sparks JW. *Determinants of intrauterine growth*. In: Hay WW Thureen P, editors. Neonatal Nutrition and Metabolism. 2nd ed; 2005-C.
- **Cetin I.**, Cozzi V, Pasquini F, Nebuloni M, Garlanda C, Vago L et al. *Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX 3) in preeclampsia and intrauterine growth restriction*. Am J Obstet Gynecol 2006; 194: 1347-1353.
- **Cetin I.**, Alvino G. *Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport. A review*. Placenta. 2009 Mar;30 Suppl A:S77-82.Review
- **Chen H.**, Attieh ZK, Syed BA, et al. *Identification of zyklopen, a new member of the vertebrate multicopper ferroxidase family, and characterization in rodents and human cells*. J Nutr 2010;140:1728-35.
- **Chockalingam UM.**, Murphy E, Ophoven JC, Weisdorf SA, Georgieff MK. *Cord transferrin and ferritin values in newborn infants at risk for prenatal uteroplacental insufficiency and chronic hypoxia*. J Pediatr 1987;111:283–6.
- **Chong WS.**, Kwan PC, Chan LY Chiu PY, Cheung TK, Lau TK. *Expression of divalent metal transporter 1(DMT1) isoforms in first trimester human placenta and embryonic tissues*. Human Reprod 2005;20;3532-8.
- **Bothwell TH.** *Iron requirements in pregnancy and strategies to meet them*. Am J Clin Nutr. 2000 Jul;72(1 Suppl):257S-264S.
- **De Leeuw NK.**, Lowenstein L, Hsieh YS. *Iron deficiency and hydremia in normal pregnancy*. Medicine (Baltimore). 1966 Jul;45(4):291-315.
- **De Rooij SR.**, Painter RC, Holleman F, Bossuyt PM, Roseboom TJ. *The metabolic syndrome in adults prenatally exposed to the Dutch famine*. Am J Clin Nutr 2007; 86:1219-24
- **Dekker.** Gustaaf A. *Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts*. American Journal of Obstetrics and Gynaecology 1998; 179:1359.
- **Devalia V.**, Carter K, Walker AP, Perkins SJ, Worwood M, May A, Dooley JS (2002) *Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload associated with a 3 base pair deletion in the ferroportin 1 gene (SLC11A3)*. Blood 100:695-697

- **Donovan A**, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynyhana J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lucks SE, Pinkus JS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI *Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter*. Nature 403:776-781, 2000.
- **Eileen R.** Fowles, Lorraine O. Walker, C. Nathan Marti et al., *Relationships among maternal nutrient intake and placental biomarkers during the 1<sup>st</sup> trimester in low-income women*. Arch Gynecol Obstet 2012; 285:891-899.
- **Entman ss**, Kambam JR, Bradley CA, Cousar JB. *Increased levels of carboxyhemoglobin and serum iron as an indicator of increased red cell turnover in preeclampsia*. Am J Obstet Gynecol 1987, 156(5): 1169-1173.
- **Feder JN**, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo RJ, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL et al. (1996) *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. Nat Genet 13:399-408; 1996.
- **Franchi F**, Cetin I, Todros T, et al. *Intrauterine growth restriction and genetic predisposition to thrombophilia*. Haematologica 2004; 89: 444-449
- **Fischer B**, Bavister BD. *Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits*. J Reprod Fertil 1993;99:673-9.
- **Fowden AL**, Forhead AJ, Coan PM and Burton GJ. *The placenta and intrauterine programming*. Journal of Neuroendocrinology 2008; 20: 439-450.
- **Harding JE**. *The nutritional basis of the fetal origins of adult disease*. Int J Epidemiol. 2001 Feb;30(1):15-23. Review
- **Galan P**, Yoon HC, Preziosi P, Viteri F, Valeix P, Fieux B, Briançon S, Malvy D, Roussel AM, Favier A, Hercberg S. *Determining factors in the iron status of adult women in the SU.VI.MAX study. SUPPLEMENTATION EN VITAMINES ET MINÉRAUX ANTIOXYDANTS*. Eur J Clin Nutr. 1998 Jun;52(6):383-8.
- **Gambling L**, Danzeisen R, Gair S, Lea RG, Charania Z, Solanky N, et al. *Effect of iron deficiency on placental transfer of iron and expression of iron transport proteins in vivo and in vitro*. Biochem J 2001;356:883-9.
- **Gambling L**, Danzeisen R, Fosset C et al. *Iron and copper interactions in development and the effect on pregnancy outcome*. J Nutr 2003;133:1S-3S.
- **Gambling L**, Lang C, McArdle HJ. *Fetal regulation of iron transport during pregnancy*. Am J Clin Nutr. 2011 Dec;94(6 Suppl):1903S-1907S.
- **Garlanda C**, Bottazzi B, Bastone A. *Pentaxins at the Crossroad between Innate Immunità, Inflammation, Matrix Depositino, and Female Fertilty*. Annu Rev Innumol 2005;23:337-366.

- **Georgieff MK**, Mills MM, Gordon K, Wobken JD. *Reduced neonatal liver iron concentrations after utero-placental insufficiency. J Pediatr* 1995 Aug;127(2):308-14
- **Gleerup A**, Rossander-Hulthén L, Gramatkovski E, Hallberg L. *Iron absorption from the whole diet: comparison of the effect of two different distributions of daily calcium intake. Am J Clin Nutr.* 1995 Jan;61(1):97-104.
- **Gruper Y**, Bar J, Bacharach E, Ehrlich R. *Transferrin receptor co-localizes and interacts with the hemochromatosis factor (HFE) and the divalent metal transporter-1 (DMT1) in trophoblast cells. J Cell Physiol.* 2005 Sep;204(3):901-12.
- **Hallberg L**. *Bioavailability of dietary iron in man. Annu Rev Nutr.* 1981;1:123-47. Review.
- **Hallberg L**, Rossander-Hultén L. *Iron requirements in menstruating women. Am J Clin Nutr.* 1991 Dec;54(6):1047-58. Review.
- **Hallberg L**, Hultén L, Lindstedt G. *Iron deficiency in adolescent boys. J Intern Med.* 1996 Jan;239(1):84-8.
- **Helman AD**, Darnton-Hill I. *Vitamin and iron status in new vegetarians. Am J Clin Nutr.* 1987 Apr;45(4):785-9.
- **Hindmarsh PC**, Geary MP, Rodeck CH, Jackson MR, Kingdom JC. *Effect of early maternal iron stores on placental weight and structure. Lancet.* 2000 Aug 26;356(9231):719-23.
- **Hung TH**, Skepper JN, Charnock-Jones DS, et al. *Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. Circ Res* 90:1274-1281, 2002.
- **Ishihara N**, Matsuo H, Murakoshi H, et al. *Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. Am J Obstet Gynecol* 186:158-166, 2002
- **Jauniaux E**, Burton GJ, Moscoso GJ, Hustin J. *Development of the early placenta: A morphometric study. Placenta* 1991;12:269–76.
- **Jauniaux E**, Watson AL, Hempstock J, Bao Y-P, Skepper JN, Burton GJ. *Onset of maternal arterial bloodflow and placental oxidative stress; a possible factor in human early pregnancy failure. Am J Pathol* 2000;157:2111–22.
- **Jauniaux E**, Watson AL, Burton GJ. *Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks. Am J Obstet Gynecol* 2001;184:998–1003.
- **Jauniaux E**, Gulbis B, Burton GJ. *The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the fetus—A review. Placenta* 2003;24 Suppl A:S86–93.

- **Jonker JW**, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RP, et al. *The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria*. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:15649-54.
- **Kahn S.R.**, Nisha D Almeida, Helen McNamara H et al. *Smoking in preeclamptic women is associated with higher birthweight for gestational age and lower soluble fms-like tyrosine kinase-1 levels: a nested case control study*. BMC Pregnancy and Childbirth 2011;11:91.
- **Kaufer M**, Casaneuva E. *Relation of pregnancy serum ferritin levels to hemoglobin levels throughout pregnancy*. Eur J Clin Nutr. 1990 Oct;44(10):709-15.
- **Keel SB**, Doty RT, Yang Z, Quigley JG, Chen J, Knoblauch S, Kingsley PD, Domenico ID, Vaugh MB, et al. *A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis*. Science. 2008;319:825-8.
- **Khatun R**, Wu Y, Kanenishi K, Ueno M, Tanaka S, Hata T, et al. *Immunohistochemical study of transferrin receptor expression in the placenta of pre-eclamptic pregnancy*. Placenta 2003; 24:870–6.
- **Krebs C**, Macara LM, Leiser R, Bowman AW, Greer IA, Kingdom JC. *Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree*. Am J Obstet Gynecol 1996;175:1534-42.
- **Lattuada D**, Colleoni F, Martinelli A, Garretto A, Magni R, Radaelli T, et al. *Higher mitochondrial DNA content in human IUGR placenta*. Placenta 2008;29:1029-33
- **Lee DW**, Andersen JK. *Role of HIF-1 in iron regulation: potential therapeutic strategy for neurodegenerative disorders*. Curr Mol Med. 2006 Dec;6(8):883-93. Review.
- **Lim J**, Kim S, Park S, Yang H, Kim M, Ruy H. *Effective prediction of preeclampsia by a combined ratio of angiogenesis-related factors*. Obstet Gynecol 2008; 111:1403-1409.
- **Lok CN**, Ponka P. *Identification of a Hypoxia Response Element in the Transferrin Receptor Gene*. J Biol Chem. 1999 Aug 20;274(34):24147-52
- **Macara L**, Kingdom JC, Kaufmann P, Kohnen G, Hair J, More IA, et al. *Structural analysis of placental terminal villi from growth restricted pregnancies with abnormal umbilical artery Doppler waveforms*. Placenta 1996;17:37-48.
- **Malhotra M**, Sharma JB, Batra S, Sharma S, Murthy NS, Arora R. *Maternal and perinatal outcome in varying degrees of anemia*. Int J Gynaecol Obstet. 2002 Nov;79(2):93-100.

- **Mandò C**, Tabano S, Colapietro P, Pileri P, Colleoni F, Avagliano L, Doi P, Bulfamante G, Miozzo M, Cetin I. *Transferrin receptor gene and protein expression and localization in human IUGR and normal term placentas*. *Placenta*. 2011 Jan;32(1)
- **Many A**, Hubel CA, Fisher SJ, et al. *Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia*. *Am J Pathol* 2000; 156:321-331.
- **Marconi A. M**, Pardi G.: *Crescita e metabolismo della placenta*. In Candiani, Danesino, Gastaldi: *La Clinica Ostetrica e Ginecologica*. Masson, Milano, 1996.
- **McArdle HJ**, Andersen HS, Jones H, Gambling L. *Copper and iron transport across the placenta: regulation and interactions*. *J Neuroendocrinol*. 2008 Apr;20(4):427-31. Review
- **McKie AT**, Simpson RG (2002) *Basolateral transport of iron in mammalian intestine: from physiology to molecules*. In: Templeton DM (ed) *Molecular and cellular Iron transport*. Dekker, NY, pp175-188, 2002.
- **McKie AT**, Barlow DJ. *The SLC40 basolateral iron transporter family (IREG1/ferroportin/MTP1)*. *Pflugers Arch*. 2004 Feb;447(5):801-6. Review.
- **Nicolaides KH**, Bindra R, Turan OM, Chefetz I, Sammar M, Meiri H, Tal J, Cuckle HS. *A novel approach to first-trimester screening for early preeclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound*. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006;27:13-17.
- **O'Donnell JL**, Joyce MR, Shannon AM, Harmey J, Geraghty J, Bouchier-Hayes D. *Oncological implications of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) expression*. *Cancer Treat Rev*. 2006 Oct;32(6):407-16. Review
- **Painter RC**, Osmond C, Gluckman P, Hanson M, Phillips DI, Roseboom TJ. *Transgenerational effect of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life*. *BJOG* 2008; 115:1243-9
- **Parazzini F.**, Cortinovis I., Bortolus R. and Fedele L. *Standard di peso alla nascita in Italia*. *Ann Ostet Ginecol Med Perinat* 1991 Jul-Aug; 112 (4): 203-246
- **Pardi G**, Cetin I, Marconi AM, Bozzetti P, Buscaglia M, Makowsky EL, et al. *The venous drainage of the human uterus: respiratory gas studies in normal and fetal growth retarded pregnancies*. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:699-706
- **Pardi G**, Cetin I, Marconi AM, Lanfranchi A, Bozzetti P, Ferrazzi E, et al. *Diagnostic value of blood sampling in fetuses with growth retardation*. *N Engl J Med* 1993;328:692-6
- **Pardi G.**, Marconi A.M. and Cetin I. *Placental-fetal interrelationship in IUGR fetuses-a review*. *Placenta* 2002; 23 (S1): S136-S141
- **Pardi G**, Cetin I. *Human fetal growth and organ development: fifty years of discoveries*. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:1088-99.

- **Park CH**, Valore EV, Waring AJ, Ganz T (2001) *Hepcidin a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. J Biol Chem 276:7806-7810; 2001.
- **Petraglia F.**, Lombardo M., Genazzani A. R.: *Endocrinologia della placenta e della gravidanza*. In Candiani, Danesino, Gastaldi: La Clinica Ostetrica e Ginecologica. Masson, Milano, 1996.
- **Pijnenborg R**, Dixon G, Robertson WB, Bronsens I. *Trophoblastic invasion of human deciduas from 8 to 18 weeks of pregnancy*. Placenta 1980; 1:3
- **Qing Y**, Shuo W, Zhihua W, Huifen Z, Ping L, Lijiang L, Xiaorong Z, Liming C, Daiwen X, Yu H, Wei X, Min F, Zuohua F, Guanxin S. *The in vitro antitumor effect and in vivo tumor-specificity distribution of human-mouse chimeric antibody against transferrin receptor*. Cancer Immunol Immunother. 2006 Sep;55(9):1111-21
- **Rayman MP**, Barlis J, Evans RW, Redman CW, King LJ. *Abnormal iron parameters in the pregnancy syndrome preeclampsia*. Am J Obstet Gynecol 2002;187:412–8.
- **Rodesch F**, Simon P, Donner C, Jauniaux E. *Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy*. Obstet Gynecol 1992;80:283–5.
- **Ross M. G.**, Ervin M. G., Bissonnette J.: *Placental and fetal physiology*. In Gabbe, Niebyl, Simpson: Obstetrics, Normal and Problem Pregnancies. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1996.
- **Rovere-Querini P**, Antonacci S, Dell'Antonio G, Angeli A, Almirante G, Dal Cin E et al. *Plasma and tissue expression of the long pentraxin 3 during normal pregnancy and preeclampsia*. Obstet Gynecol 2006; 108; 148-155.
- **Salafia CM**, Pezzullo JC, Minior VK & Divon MY. *Placental pathology of absent and reversed end-diastolic flow in growth-restricted fetuses*. Obstet Gynecol,1997. 90, 830- 836
- **Saeed F**, Jawad A, Azmat A, Azam I, Kagazwala S *Anthropometric measurements as a risk for hypertensive disorders in pregnancy: a hospital based study in South Asian population*. J Pak Med Assoc. 2011 Jan;61(1):58-63.
- **Sheppard BL**, Bonnar J. *The ultrastructure of the arterial supply of the human placenta in early and late pregnancy*. Journal of Obstetrics and Gynecology British Common 1974; 81:497.
- **Sibley CP**, Turner MA, Cetin I, Ayuk P, Boyd CA, D'Souza SW, et al. *Placental phenotypes of intrauterine growth*. Pediatr Res 2005;58:827-32.
- **Svanberg B**. *Absorption of iron in pregnancy*. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl. 1975;48:1-108.

- **Stegers Eric A.P.**, Von Dadelszen Peter, Duvekot Johannes J, Pijnenborg Robert. *Preeclampsia*. Lancet 2010; 376:631-44.
- **Thame M**, Osmond C, Bennett F, Wilks R, Forrester T. *Fetal growth is directly related to maternal anthropometry and placental volume*. Eur J Clin Nutr. 2004 Jun;58(6):894-900.
- **Taylor DJ**, Lind T. *Red cell mass during and after normal pregnancy*. Br J Obstet Gynaecol. 1979 May;86(5):364-70.
- **Tao J**, Liu YQ, Li Y, Peng JL, Li L, Liu J, Shen X, Shen GX, Tu YT. *Hypoxia: dual effect on the expression of transferrin receptor in human melanoma A375 cell line*. Exp Dermatol. 2007 Nov;16(11):899-904.
- **Thanguch S**, Chakrabarty A, Guo Y, Wang H, Dey SK. *Maternal pentraxin 3 deficiency compromises implantation in mice*. Biol Reprod 2007;77(3):425-432.
- **Toldi Gergely**, Bala'zs Stenczer, Attila Molvarec, Zolta'n Taka'ts, Gabriella Beko, Ja'nos Rigo' Jr and Barna Va'sa'rhelyi. *Hepcidin concentrations and iron homeostasis in preeclampsia*. Clin Chem Lab Med 2010;48(10):1423–1426.
- **Yedwab GA**, Paz G, Homonnai TZ, David MP, Kraicer PF. *The temperature, pH, and partial pressure of oxygen in the cervix and uterus of women and uterus of rats during the cycle*. Fertil Steril 1976;27:304–9.
- **Zamudio S**, Baumann MU, Illsley NP. *Effects of chronic hypoxia in vivo on the expression of human placental glucose transporters*. Placenta. 2006 Jan;27(1):49-55.
- **Zhou Y**, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. *Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?* J Clin Invest 99:2139–2151, 1997.