

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MOLECOLARI
INDIRIZZO SCIENZE CHIMICHE
XXVIII CICLO

PROTEOMICA E METALLOMICA:
STUDIO DEL TESSUTO PLACENTARE IN PRESENZA
DI DIABETE GESTAZIONALE

DIRETTORE DELLA SCUOLA: CH.MO PROF. ANTONINO POLIMENO
SUPERVISORE: CH.MO PROF. VALERIO DI MARCO

DOTTORANDO: MARCO ROVERSO

A Giulia e Alessandro

PROTEOMICA E METALLOMICA: STUDIO DEL TESSUTO PLACENTARE IN PRESENZA DI DIABETE GESTAZIONALE

Il lavoro di ricerca presentato concerne lo sviluppo e il perfezionamento di metodi analitici atti allo studio del proteoma e del metalloma del tessuto placentare e alla valutazione di eventuali sue modificazioni e/o alterazioni in presenza di diabete gestazionale.

Le analisi di proteomica sono state effettuate mediante metodologie analitiche basate sulla spettrometria di massa (in particolare sono state utilizzate le tecniche di ionizzazione MALDI e ESI) e sull'elettroforesi mono e bi-dimensionale. Allo stato attuale dell'arte queste tecniche analitiche risultano essere gli approcci sperimentali più adatti a condurre indagini di questo tipo grazie all'elevata sensibilità e specificità che le caratterizza. I risultati analitici hanno evidenziato la presenza di specie proteiche diversamente espresse nel caso di diabete gestazionale; in particolare è stato notato un incremento dei livelli di somatomammotropina corionica e una diminuzione della concentrazione delle catene alfa, beta e gamma del fibrinogeno e di *Tubulointerstitial nephritis antigen-like* nelle placente complicate da GDM.

Le analisi di metallomica sono state condotte mediante ICP-MS, a sua volta tecnica analitica caratterizzata da elevata sensibilità e robustezza. Le analisi hanno rivelato un aumento della concentrazione di Se e una diminuzione dei livelli di Cd nelle placente patologiche rispetto a quelle sane. L'approccio seguito ha permesso di valutare l'efficacia del campionamento e delle procedure pre-analitiche, l'influenza del tessuto ematico sui risultati ottenuti e ha mostrato l'importanza di altri parametri, come ad esempio lo stile di vita della gestante, nella valutazione statistica dei dati sperimentali.

In conclusione, si può affermare che le informazioni ottenute possono essere utili per lo studio e la delucidazione dei processi biochimici che caratterizzano la patologia e per la determinazione di nuovi bio-marcatori che permettano lo sviluppo di test diagnostici innovativi per il diabete gestazionale.

PROTEOMICS AND METALLOMICS: THE CASE OF HUMAN PLACENTAL TISSUE IMPAIRED BY GESTATIONAL DIABETES

The present research work concerns the development of new analytical methods aimed to the study of the proteome and the metallome of placental tissue and the evaluation of its possible modifications and/or alterations due to gestational diabetes.

Proteomics analysis was performed by different experimental approaches based on mass spectrometry (ESI-MS and MALDI-MS), and on one- and two-dimensional electrophoresis. These analytical techniques are presently the most suitable experimental approaches to be used in omics applications thanks to their high sensitivity and specificity. Results showed the presence of protein species differently expressed in the case of gestational diabetes; in particular, it was measured an increment of the chorionic somatomammotrophin level and a decrease in the concentration of alpha, beta and gamma chains of fibrinogen and tubulointerstitial nephritis antigen-like in the case of placental tissues impaired by GDM.

Metallomics analysis was carried out by ICP-MS, an analytical technique characterized by high sensitivity and robustness. The study reported an increased concentration of Se and a decrease of Cd level in pathological placental tissues compared to healthy ones. Furthermore, this approach allowed the evaluation of the effectiveness of the sampling procedure, the influence of the blood on the obtained results and showed the importance of other parameters, such as the lifestyle of the patients, in the statistical evaluation of the experimental data.

In conclusion, the obtained data might be useful for the study and the explanation of the biochemical processes that characterize the disease and for the determination of new biomarkers aimed to the development of innovative diagnostic tests for gestational diabetes.

Sommario

1 - Introduzione.....	1
1.1 - La placenta umana.....	3
1.1.1 - Funzioni della placenta umana.....	3
1.1.2 - Formazione e sviluppo della placenta	4
1.1.3 - Circolazione sanguigna nella placenta.....	5
1.1.4 - Secondamento	7
1.2 - Il diabete gestazionale	8
1.3 - Diabete gestazionale e placenta.....	11
1.3.1 - GDM ed anatomia placentare	11
1.3.2 - GDM e infiammazione placentare.....	12
1.3.3 - GDM e trasporto placentare di nutrienti	12
1.4 - Spettrometria di massa	14
1.4.1 - Ionizzazione Electrospray (ESI).....	15
1.4.2 - Ionizzazione per desorbimento laser assistita da matrice (MALDI).....	17
1.4.3 - MALDI Ion Imaging.....	21
1.4.4 - Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)	24
2 - Scopo della tesi.....	29
3 - Caratterizzazione delle proteine a basso peso molecolare espresse dal tessuto placentare	31
3.1 - Materiali e Metodi.....	31
3.2 - Risultati e Discussione	32
3.3 - Conclusioni	35
4 - MALDI Ion Imaging della placenta umana	37
4.1 - Materiali e Metodi.....	38
4.2 - Risultati e Discussione	40
4.3 - Conclusioni	47

5 – Analisi del proteoma placentare in presenza di GDM.....	49
5.1 - Materiali e Metodi	49
5.2 – Risultati e Discussione.....	51
5.3 - Biochimica delle proteine placentari	57
5.4 - Conclusioni.....	59
6 – Analisi del profilo peptico e proteico di linfociti da sangue cordonale in presenza di GDM.....	61
6.1 - Materiali e Metodi	61
6.2 - Risultati e Discussione.....	63
6.3 - Conclusioni.....	68
7 – Analisi del metalloma placentare in presenza di GDM.....	71
7.1 - Materiali e metodi	71
7.2 – Risultati e Discussione.....	73
7.4 - Conclusioni.....	82
8 – Analisi del metalloma placentare in presenza di GDM, parte 2	83
8.1 Materiali e Metodi	83
8.2 Risultati e Discussione	87
8.2.1 -Analisi delle Componenti Principali	100
8.3 – Conclusioni.....	104
9 – Conclusioni.....	107
Appendice	109
Bibliografia.....	113

1 - Introduzione

La medicina dei sistemi (*System Medicine*) è un approccio innovativo, multidisciplinare e omnicomprensivo adatto allo studio delle molteplici e complesse interazioni molecolari che avvengono all'interno del corpo umano, sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Lo scopo principale di questo "brulicante" campo della medicina risiede nello sviluppo di metodi innovativi per la diagnosi, prognosi e trattamento di varie patologie al fine di apportare un'ottimizzazione consistente alle procedure di assistenza sanitaria e quindi un miglioramento della salute umana [1].

Le conoscenze e le nuove scoperte scientifiche che alimentano lo sviluppo della medicina dei sistemi sono possibili grazie all'applicazione nel campo della medicina, dell'epidemiologia molecolare e della biotecnologia di nuovi approcci analitici in grado di permettere lo studio e il monitoraggio di intere classi di molecole e biomolecole in sistemi complessi, quali il corpo umano, e di consentire l'individuazione delle relative modificazioni e alterazioni a seguito di interazioni con l'ambiente, sviluppo di patologie ed esposizione a stimoli di varia natura.

Queste nuove tecniche, definite "omiche" comprendono:

- Genomica, ovvero l'analisi completa della struttura del DNA e delle sue funzioni;
- Trascrittomica, ovvero lo studio dei livelli di espressione delle molecole di RNA, compresi mRNA, rRNA, tRNA e altre sequenze non codificanti (es. miRNA);
- Proteomica, la quale si riferisce allo studio della struttura e della funzione delle proteine, al relativo livello di espressione e alla presenza di modificazioni post-traduzionali (PTMs);
- Metabolomica, ovvero lo studio di molecole a basso peso molecolare, quali lipidi, metaboliti, etc., e delle loro interazioni all'interno di un sistema biologico;
- Metallomica, la quale prevede l'analisi completa di tutte le specie metalliche e metalloidiche all'interno di un ben determinato substrato biologico.

L'ottenimento dei dati sperimentali utili ad eseguire indagini di questo tipo è stato possibile grazie all'evoluzione di tecniche strumentali quali la spettrometria di massa (MS) e la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR). In particolare per la spettrometria di massa, sono state sviluppate nuove tecniche di ionizzazione, quali

MALDI, ESI, nano-ESI, e nuovi analizzatori ad alta risoluzione, che hanno permesso di sviluppare nuovi metodi analitici caratterizzati da elevata sensibilità, specificità e automatizzazione [2].

L'ostetricia è una delle branche della medicina che ha beneficiato di queste nuove tecnologie. In letteratura infatti, sono presenti numerosi lavori che riportano studi di proteomica e metabolomica relativamente a pre-eclampsia, sviluppo di infezioni neonatali, nascita pretermine e ritardo di crescita [3]. Nel caso del diabete gestazionale (GDM), patologia oggetto di questa tesi, in letteratura sono riportati alcuni studi che applicano approcci di proteomica differenziale *gel-based* o *gel-free* [4] per la determinazione di variazioni nell'espressione proteica tra gestanti GDM e di controllo [5, 6]. Molti di questi studi, riassunti in un articolo pubblicato da Sight et al. [7], si limitano comunque a indagini relative a campioni di siero/plasma, urine o liquido amniotico. In questo lavoro di tesi si è ritenuto opportuno analizzare un altro substrato, il tessuto placentare, considerando che esso rappresenta l'organo chiave della gravidanza e dal quale si possono potenzialmente ottenere informazioni "omiche" più significative sul GDM.

La placenta umana è un organo fondamentale e complesso che media il trasporto selettivo di soluti e gas tra la madre e il feto; inoltre, il tessuto placentare è coinvolto nella produzione di ormoni e di altri fattori che sostengono la gravidanza e provvedono a formare una barriera protettiva contro il sistema immunitario materno. La placenta sfrutta un sistema ramificato di villi, i quali forniscono un'area superficiale elevata che permette un efficace scambio di sostanze tra il sangue materno e fetale. La caratterizzazione bio-chimica della placenta umana in presenza di una determinata patologia, esemplificata dagli studi di proteomica e metallomica in presenza di GDM riportati in questo lavoro di tesi, è di vitale importanza per determinare l'eventuale alterazione di importanti processi molecolari dell'organismo che possono essere causa o conseguenza della malattia stessa.

1.1 - La placenta umana

La placenta è l'organo che collega il feto in sviluppo con la parete uterina, al fine di permettere l'assorbimento dei nutrienti, l'eliminazione dei rifiuti e lo scambio di gas attraverso il sangue materno. Un'immagine schematizzata della placenta umana è riportata in Figura 1

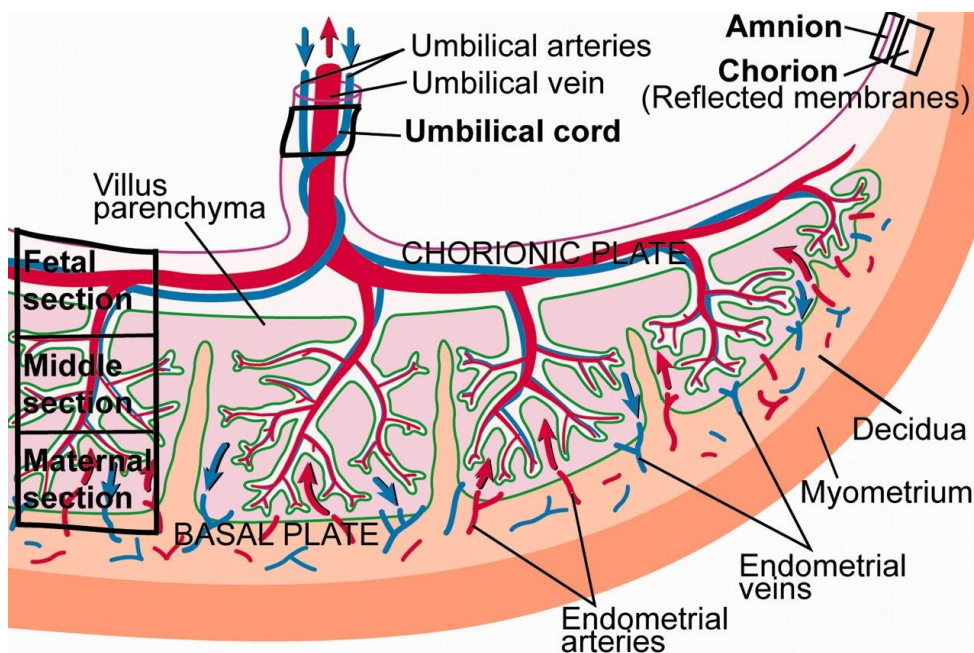


Figura 1: Schema anatomico della placenta umana.

Nella specie umana la placenta misura mediamente 22 cm di diametro e 2-2.5 cm in spessore (lo spessore è massimo al centro e decresce verso la zona periferica); il suo peso è approssimativamente di 500 g, ha una forma di disco ed è di colore rosso scuro. Il cordone ombelicale che collega il feto alla placenta misura 55-60 cm e contiene una vena e due arterie; questo si inserisce eccentricamente nella placenta a livello del piatto coriale. I vasi sanguigni si espandono su tutta la superficie dell'organo e si dividono formando una fitta rete che ha come termine i villi coriali; nella parte materna i villi sono raggruppati in lobi chiamati cotiledoni.

1.1.1 - Funzioni della placenta umana

La placenta permette lo scambio di sostanze per trasporto attivo o passivo tra la madre e il feto: l'ossigeno e i nutrienti sono portati dalla madre verso il feto, mentre l'anidride carbonica e i prodotti di rifiuto (urea, acido urico, creatinina, etc.) seguono il percorso inverso. Il trasporto attivo, inoltre, permette di mantenere concentrazioni molto diverse di alcune macromolecole tra la parte fetale e materna della barriera

placentare. Quando si hanno delle gravidanze problematiche, ad esempio se la madre è diabetica o obesa, la quantità di nutrienti trasportati può aumentare portando ad una crescita eccessiva del feto, la quale a sua volta comporta una serie di complicazioni cliniche che si possono verificare sia durante la gestazione che al momento del parto [8].

La placenta umana consente anche lo scambio di anticorpi IgG e funge da barriera contro la trasmissione dei batteri, fornendo una protezione efficace al feto.

La placenta, inoltre, è in grado di secernere alcuni ormoni molto importanti durante la gravidanza. Il primo ormone prodotto è la gonadotropina corionica umana (hCG), che può essere trovato nel sangue e nelle urine materne già alcuni giorni dopo il concepimento (è tale ormone che viene rivelato nei test di gravidanza); l'hCG è anche responsabile della soppressione del sistema immunologico materno, il quale attaccherebbe la placenta e il feto in quanto ritenuti corpi estranei. Un altro ormone prodotto dalla placenta è l'ormone lattogeno placentare (hPL), coinvolto nella crescita delle ghiandole mammarie e nella regolazione dei livelli materni di glucosio, proteine e lipidi disponibili al feto. La placenta sintetizza anche estrogeno, che contribuisce allo sviluppo delle ghiandole mammarie in vista dell'allattamento e stimola l'allargamento dell'utero al fine di contenere il feto in crescita. Il progesterone, presente ad alti livelli durante la gravidanza, è necessario per il mantenimento dell'endometrio e per prevenire i parti prematuri, poiché riduce le contrazioni del miometrio [9, 10].

Per ultimo, la placenta funge anche da riserva ematica per il feto, fornendo sangue in caso di ipotensione.

1.1.2 - Formazione e sviluppo della placenta

Il processo di formazione della placenta inizia già tre giorni dopo la fecondazione dell'ovulo, quando i trofoblasti (i principali componenti cellulari della placenta) iniziano a produrre l'hCG. Dopo pochi giorni dal concepimento l'embrione si sviluppa in blastocisti, ovvero una struttura sferica composta esternamente di trofoblasti e internamente da un gruppo di cellule denominate "massa cellulare interna". Le cellule più interne si sviluppano per formare il feto, mentre lo strato più esterno porta alla formazione della placenta e delle membrane esterne. Nei giorni successivi, i trofoblasti invadono la parete uterina dando inizio alla gravidanza. Nelle successive settimane, la placenta produce una serie di ormoni utili a controllare la fisiologia della madre, in modo che il feto sia rifornito con i nutrienti e l'ossigeno necessari per una corretta crescita.

L'impianto della blastocisti è regolato da una complessa interazione tra i trofoblasti e l'endometrio: i trofoblasti hanno una capacità invasiva notevole e se non

fossero controllati potrebbero invadere tutto l'utero, mentre l'endometrio ha il compito di gestire e modulare la diffusione dei trofoblasti secernendo localmente delle sostanze regolatrici come le citochine e gli inibitori delle proteasi. Una volta che la blastocisti ha fatto presa sull'endometrio, il feto continua a crescere e ad espandersi, rimanendo però completamente separato dai tessuti e dal sangue materno grazie ad uno strato di citotrofoblasti (trofoblasto mononucleato, precursore dei trofoblasti) e di sinciziotrofoblasti (trofoblasti polinucleati, responsabili dello scambio dei nutrienti e della produzione degli ormoni); questo è molto importante non solo per permettere un efficace scambio di nutrienti, ma in particolare per proteggere il feto dagli attacchi immunologici della madre.

Dopo due settimane di sviluppo, i trofoblasti sono in grado di penetrare i vasi sanguigni dell'endometrio, formando delle cavità riempite di sangue materno, che successivamente formano la parte materna della placenta in sviluppo [11]. Dopo tre settimane dal concepimento si notano le prime evidenze della circolazione fetale, ovvero i villi coriali in sviluppo. Alla quarta settimana di gestazione, sebbene il feto sia grande poco più di 2 cm, la struttura base della placenta matura è già stata delineata: si nota una circolazione sanguigna fetale, che termina in capillari ad anello, i villi coriali, i quali penetrano nello spazio intervilloso continuamente rifornito di sangue materno da arterie a forma di spirale e drenato dalle vene uterine. I villi coriali si sviluppano ulteriormente nelle successive settimane, formando una massa di tessuto coriale, ovvero la placenta; l'endometrio, invece, subisce la decidualizzazione, ossia si instaura un processo che vede l'aumento continuo del diametro delle arterie che trasportano il sangue materno alla placenta, permettendo di avere al termine della gravidanza un flusso di sangue arterioso pari a 600-700 mL/min.

Al raggiungimento della ventesima settimana gestazionale si ha la completa formazione della placenta, della membrana coriale o corion (è lo strato membranoso più esterno e in diretto contatto con l'utero, composto da trofoblasti e da matrice extracellulare), della membrana amniotica o amnion (è lo strato di membrana più interno, in diretto contatto con il liquido amniotico) e della decidua (identifica l'endometrio durante la gravidanza) [12].

1.1.3 - Circolazione sanguigna nella placenta

Uno schema della circolazione sanguigna nella placenta è riportato in Figura 2.

Il sangue fetale carico di anidride carbonica e prodotti di scarto raggiunge la placenta attraverso la vena contenuta nel cordone ombelicale; nella giunzione tra la

placenta e il cordone ombelicale, i vasi sanguigni si diramano radialmente formando le vene coriali. Queste, a loro volta, si suddividono per originare i cotiledoni, che sono delle strutture a forma di albero rovesciato; ogni ramo di questo albero viene denominato villo coriale ed è caratterizzato da un'estesa rete di capillari arteriosi-venosi che permettono lo scambio direzionale di sostanze con la madre, senza provocare il mescolamento tra il sangue materno e quello fetale. I villi coriali sono le vere e proprie unità funzionali della placenta poiché mediano l'assorbimento dei nutrienti, l'eliminazione dei rifiuti e generano quasi tutti gli ormoni necessari durante la gravidanza. La sezione trasversale di un villo coriale maturo è costituita centralmente di tessuto connettivo (mesenchima) che ingloba i capillari fetali circondati da uno strato di citotrofoblasti e sinciziotrofoblasti. Una volta che il sangue fetale è stato ossigenato e arricchito di sostanze nutritive, esso ritorna al feto attraverso le arterie ombelicali.

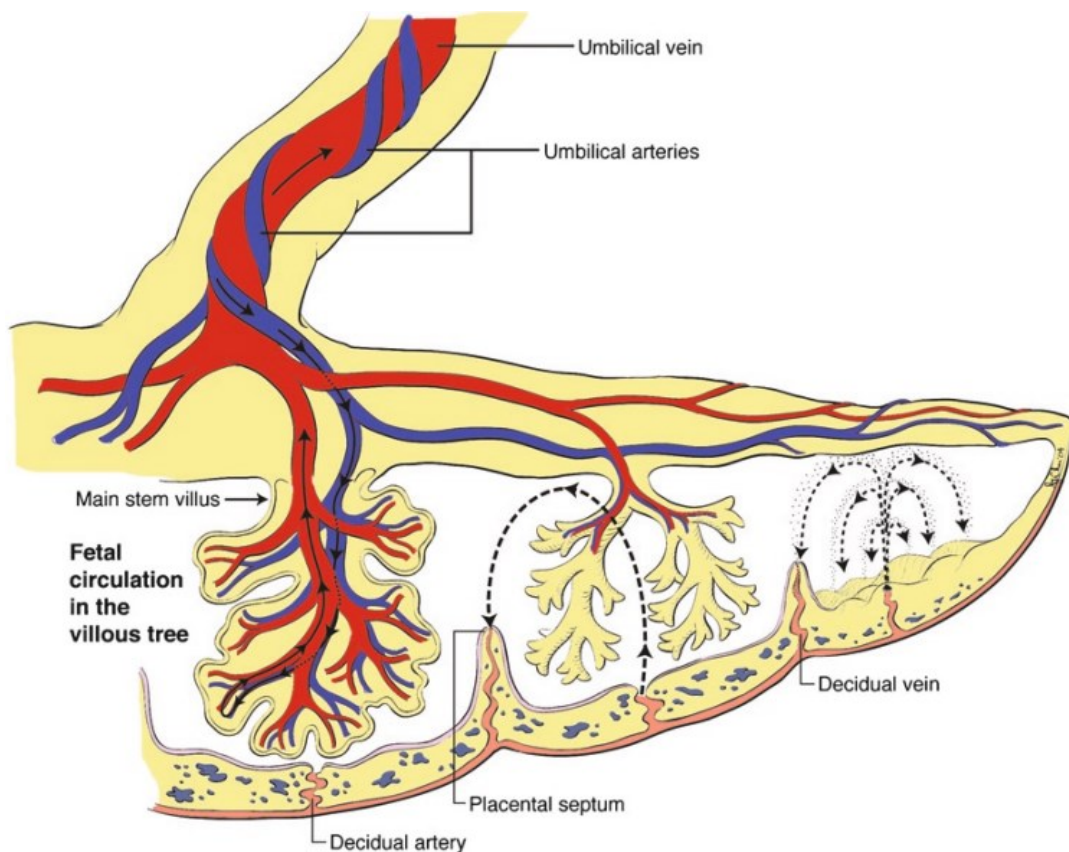


Figura 2: Circolazione del sangue nella placenta umana.

Il sangue materno, invece, è immesso nella placenta attraverso delle arterie a spirale presenti nell'utero; nel punto di contatto tra queste arterie e la placenta si nota un'apertura che consente di riversare copiosamente il sangue materno nello spazio intervilloso. Il sangue materno è successivamente drenato dalle vene uterine e

reimpresso nella circolazione sanguigna materna. Verso il termine della gravidanza, per permettere un corretto sviluppo del feto e un efficace scambio di sostanze, circa il 35% del sangue materno si trova nello spazio intervilloso [13].

1.1.4 - Secondamento

Dopo la nascita del bambino, restano ancora nell'utero della donna i cosiddetti annessi fetali ossia placenta e sacco amniotico. La fase di espulsione è detta secondamento e può essere praticata con modalità attiva o passiva.

Attualmente è praticata la modalità attiva che comporta il taglio precoce del cordone, l'uso di farmaci per via endovenosa o intramuscolare (es. ossitocina) per favorire l'espulsione e manovre di trazione controllata del cordone e di "spremitura" dell'utero dall'esterno, in modo che premendo sull'addome della madre e stimolando la contrazione dell'utero da una parte e tirando il cordone dall'altra, venga provocato il distacco e la fuoriuscita della placenta (detto anche parto della placenta). La pratica attiva accelera notevolmente i tempi del secondamento (circa 30 minuti), dato che per il processo naturale e spontaneo sono necessarie da una a due ore.

La modalità passiva comporta, invece, l'attesa del distacco fisiologico della placenta: il cordone ombelicale è lasciato integro, il bambino viene allattato al seno o comunque posto accanto alla madre, non vengono somministrati farmaci e non si eseguono manovre di "spremitura", a meno che non sia necessario per la salute della madre o del bambino (ad esempio in caso di emorragia).

1.2 - Il diabete gestazionale

Il Diabete Gestazionale (GDM), definito come “intolleranza ai carboidrati di gravità variabile a insorgenza o primo riscontro in corso di gravidanza”, è oggi tra le più frequenti complicanze della gestazione, interessando una percentuale variabile tra l’1 e il 14% di tutte le gravidanze a seconda della popolazione o gruppo etnico considerati e dei metodi e indici di riferimento che possono differire da un Paese all’altro [14].

La gravidanza è caratterizzata da un progressivo aumento dell’insulino resistenza determinato da livelli progressivamente crescenti di ormoni contro-insulari di origine feto-placentare quali il progesterone, il cortisolo, l’ormone della crescita e la prolattina [15]. Tali modifiche sono finalizzate ad ottenere un flusso di nutrienti dalla madre al feto tale da permettere la normale crescita fetale. Il pancreas normalmente compensa tale insulino resistenza aumentando la secrezione di insulina, ma quando ciò non è sufficiente o quando la secrezione di insulina declina a causa di una compromissione della funzionalità delle beta cellule, si sviluppa il GDM [16, 17]. La conseguente iperglicemia materna, tipica del GDM, provoca un maggiore trasferimento di glucosio al feto, causa a sua volta di iperinsulinemia fetale e di una crescita eccessiva e non armonica dei tessuti insulino-sensibili (soprattutto adiposo). Questo può determinare numerose conseguenze relativamente alla salute del feto, sia a medio che a lungo termine (Figura 4). In particolare, a medio termine il GDM può causare trauma alla nascita, macrosomia, distocia di spalla e morti perinatali; si possono anche verificare delle complicanze metaboliche, quali ipoglicemia, iperbilirubinemia, ipocalcemia, ipomagnesemia, policitemia e sindrome da stress respiratorio [18]. Per quanto riguarda le complicanze a lungo termine, il GDM si associa ad un aumentato rischio di diabete e obesità in età adolescenziale ed adulta [18]. Vi sono inoltre delle complicanze materne a medio termine legate al GDM quali ipertensione e preeclampsia e complicanze a lungo termine come l’aumento del rischio di sviluppare diabete di tipo 2, soprattutto nei primi cinque anni dopo il parto [19].

Per questi motivi, negli ultimi anni, le principali linee-guida nazionali e internazionali raccomandano di porre una specifica attenzione allo screening di questa condizione. In questo contesto, la pubblicazione dei risultati dello studio internazionale HAPO (*Hyperglycaemia and Adverse Pregnancy Outcome*) ha dato luogo a un vivace confronto che è ancora in corso [20]. Lo studio, condotto su oltre 25.000 gravide di varie etnie, ha evidenziato una relazione continua tra glicemia materna (basale, a 1 ora e a 2 ore dopo OGTT con 75 g di glucosio) e alterato outcome materno e fetale. Sulla base dei risultati dello studio, un panel internazionale di esperti dell’IADPSG (*International*

Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups) ha redatto una proposta di nuovi criteri diagnostici e di screening. In sintesi, le nuove indicazioni prevedono che il test OGTT (*Oral Glucose Tolerance Test*) con 100 g di glucosio sia sostituito da un unico test che prevede la somministrazione orale di 75 g di glucosio da effettuare a tutte le donne in gravidanza fra la 24ma e la 28ma settimana gestazionale. In Italia, lo screening si basa sulla valutazione di fattori di rischio specifici. Le donne con almeno un fattore di rischio per il GDM devono eseguire un OGTT con 75 g di glucosio alla 24-28ma settimana di gestazione. Per alcune categorie a elevato rischio (obesità, pregresso GDM e glicemia a digiuno pari a 100-125 mg/dL, all’inizio o prima della gravidanza) è offerto uno screening precoce attraverso OGTT con 75 g di glucosio alla 16-18ma settimana da ripetere, se negativo, alla 24-28ma settimana, come riassunto in Figura 3 [21, 22, 23].

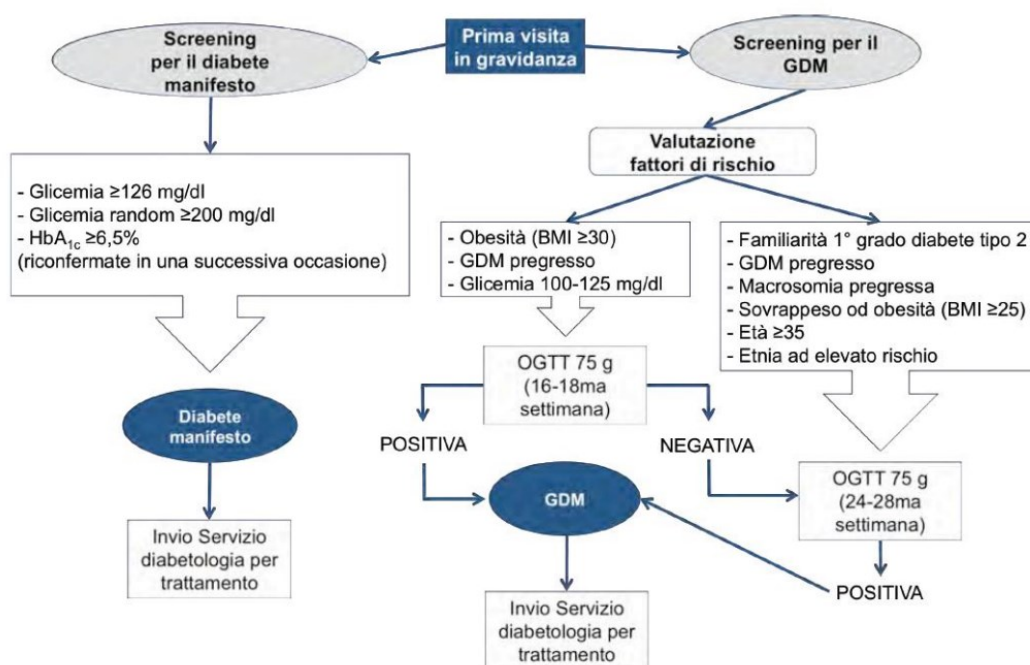


Figura 3: Iter diagnostico per lo screening e la diagnosi del GDM.

Dal un punto di vista epidemiologico, gli studi che hanno valutato la prevalenza del GDM sono limitati e, soprattutto, non sono immediatamente confrontabili tra loro a causa di differenze metodologiche nella scelta della modalità di screening e nella selezione del campione. Si prevede che l’applicazione dei criteri IADPSG porterà a un notevole incremento della prevalenza del GDM nelle varie nazioni, anche se con una notevole variabilità legata alle caratteristiche della popolazione stessa. A tal proposito, esistono ancora pochi studi, tutti retrospettivi e numericamente non rappresentativi della realtà nazionale italiana, i quali dimostrano anche nel nostro paese un notevole incremento

della malattia, con tassi di prevalenza dell'11-13% considerando i nuovi criteri, rispetto ad una prevalenza del 7-8% con l'utilizzo dei vecchi parametri diagnostici [24, 25, 26].

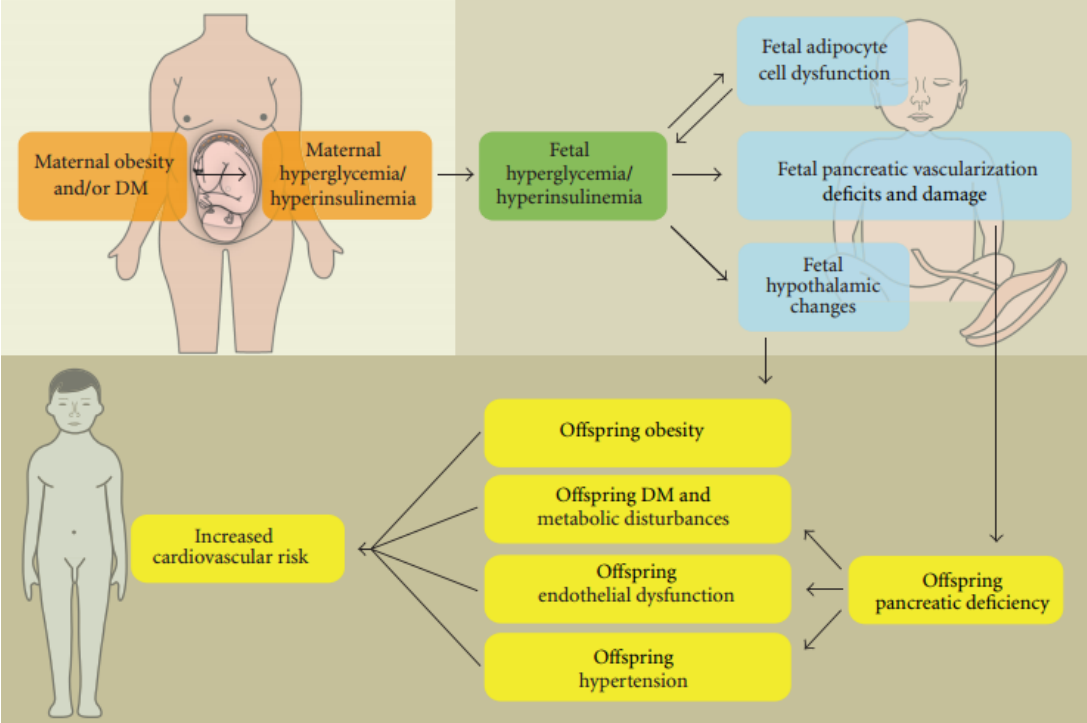


Figura 4: Fisiologia del diabete gestazionale.

1.3 - Diabete gestazionale e placenta

La placenta è l'organo essenziale per lo sviluppo della vita nei mammiferi ed è responsabile del trasporto di sostanze essenziali e dei prodotti di scarto tra madre e feto. Inoltre, il tessuto placentare produce e secerne una vasta gamma di ormoni e citochine, importanti mediatori dell'adattamento materno alla gravidanza, e gestisce la maturazione fetale e il parto [27, 28].

Diversi fattori influenzano il trasporto placentare: i flussi utero-placentare e di sangue ombelicale, la superficie disponibile per lo scambio, il metabolismo placentare e l'attività/espressione di specifiche proteine di trasporto site nella barriera placentare stessa. In generale, il trasferimento transplacentare di sostanze è notoriamente mediato dalla diffusione passiva, dal trasporto attivo e dalla diffusione facilitata, nonché dalla fagocitosi e dalla pinocitosi. Tra questi la diffusione passiva, ovvero la permeazione di sostanze per opera del gradiente di concentrazione, rappresenta la forma predominante di trasporto transplacentare. Vi sono poi trasportatori attivi a livello dei sinciziotrofoblasti (parte materna e fetale) la cui regolazione dipende in gran parte dall'azione ormonale. I microvilli del sinciziotrofoblasto esprimono infatti numerosi recettori ormonali, inclusi i recettori per l'insulina, IGF-I e leptina [29, 30]. La posizione strategica tra i flussi sanguigni materno e fetale rende la placenta non solo un regolatore cruciale della nutrizione del feto, ma rende questo organo fetale anche un target delle alterazioni metaboliche materne associate alla gravidanza, tra cui il GDM. In particolare il GDM può modificare sia lo sviluppo che la funzione placentare.

1.3.1 - GDM ed anatomia placentare

In generale, a livello macroscopico, la condizione di GDM si associa ad un aumento del peso della placenta ed a un ridotto rapporto tra peso fetale e peso placentare. Ciò può essere causato da un aumento del numero di cellule da un lato e da un eccesso di contenuto di acqua dall'altro. Dal punto di vista macroscopico, non sono state evidenziate altre significative differenze tra placente di gravidanze fisiologiche e di gravidanze complicate da GDM. Le alterazioni maggiori sono infatti a livello microscopico. Nella seconda metà della gravidanza i villi placentari sono sottoposti ad una vasta angiogenesi e neovascolarizzazione. Il GDM si associa a compromissione nello sviluppo della placenta con immaturità dei villi o ad alterazioni della vascolarizzazione dei villi stessi [31, 32]. In particolare, nelle placente di gravidanze complicate da GDM non vi è nessun effetto sulle dimensioni, sul numero di villi terminali, sulla superficie totale dei villi, ma vi è una correlazione diretta tra controllo glicemico medio e l'area dei vasi dei villi [33]. Studi

istologici hanno dimostrato la presenza di necrosi fibrinoide, di corangiosi ed edema dei villi. L'angiogenesi placentare è regolata da molti fattori angiogenici tra cui VEGF (*vascular endothelial growth factor*), FGF-2 (*fibroblast growth factor*), PPAR- γ (*peroxisome proliferation-activated receptor*) [34]. In letteratura, vi sono evidenze di un aumento dell'espressione di mRNA di FGF-2 e di ridotta regolazione del suo recettore FGF-2R e di ridotta regolazione di PPAR- γ in placentate provenienti da gravidanze complicate da GDM [35, 36]. Il GDM si associa inoltre ad una riduzione delle proteine di aderenza e di giunzione e quindi ad un'alterata funzione della barriera placentare [37].

1.3.2 - GDM e infiammazione placentare

Il tessuto placentare produce diverse citochine che contribuiscono a determinare una condizione di infiammazione di basso grado, tipica del terzo trimestre di gravidanza. Dati di letteratura hanno dimostrato come, in placentate di gravidanze complicate da GDM, vi sia un aumento del 200% della produzione di IL-1 β (*interleukin-1 beta*) e del 58% per quanto riguarda TNF- α (*tumor necrosis factor -alpha*), rispetto a placentate di gravidanze fisiologiche. Tale incremento della produzione di citochine sembra sia influenzato dalle concentrazioni di glucosio; in particolare, all'aumentare dei livelli di glicemia vi è un aumento della sintesi di citochine pro-infiammatorie [38]. In questo contesto è importante capire come le alterazioni micro-anatomiche placentari indotte dal GDM possano influenzare le funzioni primarie dell'organo, quali il trasporto di ossigeno e di nutrienti.

1.3.3 - GDM e trasporto placentare di nutrienti

Glucosio: la produzione fetale di glucosio è minima, quindi il feto dipende quasi completamente dall'apporto materno. Il flusso transplacentare di glucosio segue il gradiente di concentrazione materno-fetale e viene gestito da tre isoforme del trasportatore di glucosio (GLUT); in particolare, tale flusso sembra sia concentrazione-dipendente, ma non regolato dalla disponibilità di trasportatori. In questo contesto, tutte i dati disponibili in letteratura sostengono l'idea che nel GDM non vi sia un maggiore flusso di glucosio materno-fetale trasportatore-mediato, ma che il gradiente di concentrazione materno-fetale sia il punto chiave [39].

Aminoacidi: anche il trasporto di aminoacidi risulta alterato dal GDM. In particolare è stato dimostrato un aumento delle concentrazioni di aminoacidi essenziali e non essenziali nel sangue venoso ed arterioso ombelicale in gravidanze complicate da

GDM, nonostante le concentrazioni sanguigne materne siano normali, provando un alterato metabolismo o trasporto placentare degli aminoacidi [39].

Lipidi: l'aumento della produzione di citochine pro-infiammatorie, tipico del GDM, determina un'aumentata espressione della fosfolipasi A2 che può determinare un accumulo di acidi grassi omega-3 nel tessuto placentare. In generale il GDM induce un'aumentata regolazione dei geni placentari coinvolti nel metabolismo lipidico e nel trasporto lipidico [39].

1.4 - Spettrometria di massa

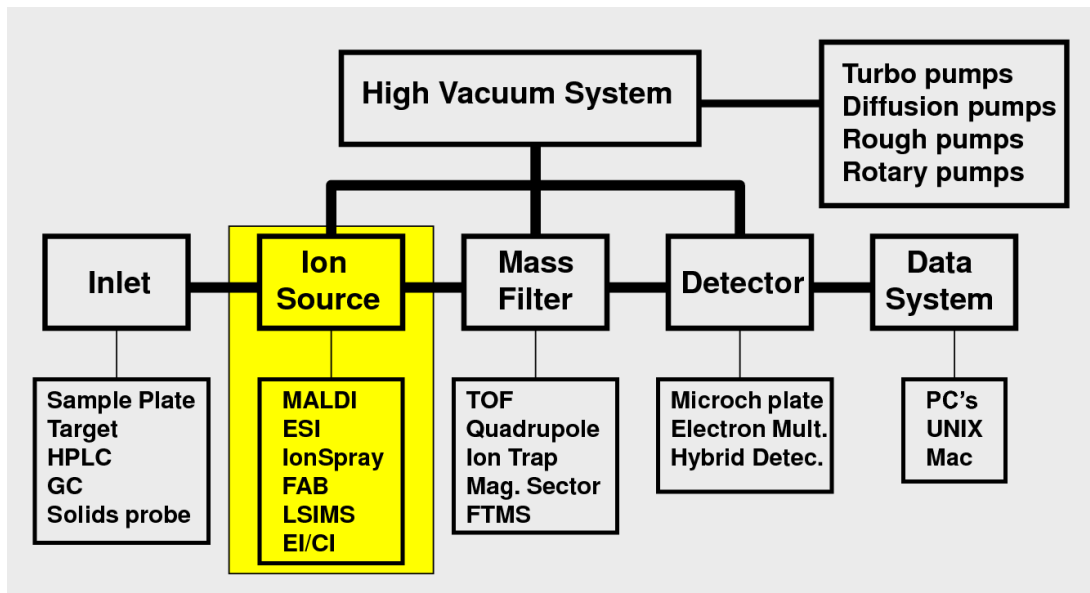


Figura 5: Schematizzazione di uno spettrometro di massa.

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che permette l'identificazione di sostanze incognite, la determinazione quantitativa di composti noti e la delucidazione delle proprietà strutturali e chimiche delle molecole. Le analisi in spettrometria di massa richiedono quantità di campione estremamente limitate (in alcuni casi è possibile lavorare con femtomoli di analita) e possono essere effettuate anche su matrici molto complesse, caratteristiche di campioni biologici di varia natura (sangue, urine, tessuto, etc.). La tecnica, inoltre, è caratterizzata da elevata sensibilità, basso limite di rivelabilità e alta specificità.

Grazie ai progressi tecnologici avvenuti nell'ultimo decennio, sul mercato sono presenti spettrometri di massa con varie configurazioni; lo schema base che li caratterizza è comunque il medesimo ed è rimasto inalterato nel tempo (Figura 5); esso prevede:

- un sistema di inserimento del campione in sorgente, il quale può essere immesso direttamente oppure provenire da un sistema di separazione quale un gascromatografo, HPLC, elettroforesi capillare, etc.;
- una sorgente di ionizzazione, che ha il compito di provvedere alla produzione degli ioni di analita in fase gassosa;
- un analizzatore di massa, il cui scopo è la separazione degli ioni prodotti in sorgente in base al loro rapporto m/z ;
- un rivelatore, che riceve la corrente ionica generata dagli ioni provenienti dall'analizzatore;

- un sistema di elaborazione e gestione dati, che si occupa della trasformazione del segnale analogico proveniente dall'analizzatore in un segnale digitale e della generazione e dell'immagazzinamento dello spettro di massa e dei dati relativi all'analisi. Il computer, inoltre, è in grado di gestire tutte le parti dello strumento, permettendo il controllo e la modifica dei parametri di analisi.
- un sistema di pompaggio, che deve assicurare l'alto vuoto (10^{-5} - 10^{-8} torr) all'interno dello strumento al fine di permettere un'efficace trasmissione degli ioni, evitando così la collisione di quest'ultimi con molecole di acqua o aria residue.

1.4.1 - Ionizzazione Electrospray (ESI)

La Ionizzazione Electrospray (ESI) è una tecnica di ionizzazione a pressione atmosferica, sviluppata da Fenn e Whitehouse negli anni Ottanta del secolo scorso.

La formazione degli ioni di analita in fase gas, contenuti in soluzione, avviene a seguito della nebulizzazione del campione con un gas, solitamente azoto, e dell'applicazione di un potenziale elettrico dell'ordine dei kilovolt (± 1 - 4 kV) sulla punta del capillare nel quale viene fatta defluire la soluzione stessa. E' una tecnica di ionizzazione soft che consente di analizzare molecole ad alto peso molecolare (es. proteine e polimeri), non volatili e polari. Si possono formare ioni derivanti dalla protonazione dell'analita ($[M+H]^+$), ioni multicaica ($[M+nH]^{n+}$) o ioni derivanti dalla deprotonazione delle molecole di analita ($[M+H]^-$). Si nota comunemente anche la formazione di addotti con sodio $[M+Na]^+$, potassio $[M+K]^+$, ammonio $[M+NH_4]^+$, litio $[M+Li]^+$, cloro $[M+Cl]^-$, etc.

Il processo di ionizzazione elettrospray può essere riassunto in tre fasi fondamentali, che avvengono a pressione atmosferica:

- La soluzione di analita è ridotta in goccioline cariche a seguito dell'interazione della soluzione con un flusso di gas coassiale al capillare e all'imposizione sulla punta di quest'ultimo di un potenziale elettrico. Questo processo porta alla formazione del cono di Taylor.
- Diminuzione del volume delle goccioline cariche a seguito dell'evaporazione del solvente e conseguente esplosione delle stesse a causa dell'accumulo di carica. Questo processo porta alla formazione di goccioline estremamente piccole aventi una concentrazione di carica elevata, in grado di produrre ioni in fase gassosa.
- Produzione degli ioni di analita in fase gassosa.

La Figura 6 rappresenta i processi appena descritti per la formazione di ioni positivi a pressione atmosferica. La penetrazione del campo elettrico, dovuto all'applicazione del potenziale, all'interno della soluzione liquida contenuta nel capillare promuove la formazione di un doppio strato carico sul menisco del liquido in uscita dalla punta del capillare stesso. La formazione del doppio strato è dovuta alle caratteristiche del solvente, quali la polarizzabilità e il momento di dipolo, che portano all'arricchimento in ioni positivi della zona prossima al menisco. Questo porta alla destabilizzazione del menisco a causa della mutua repulsione tra cariche dello stesso segno e alla formazione di un cono con conseguente emissione di un getto di goccioline portanti un eccesso di cariche positive. Le goccioline cariche, poi, diminuiscono di volume per evaporazione, portando ad un'ulteriore concentrazione di carica; la repulsione coulombiana crescente tra le cariche che si avvicinano destabilizza nuovamente le goccioline, le quali generano nuovamente un getto di goccioline progenie. Questo meccanismo continua finché non si ha la formazione dello ione in fase gas [40].

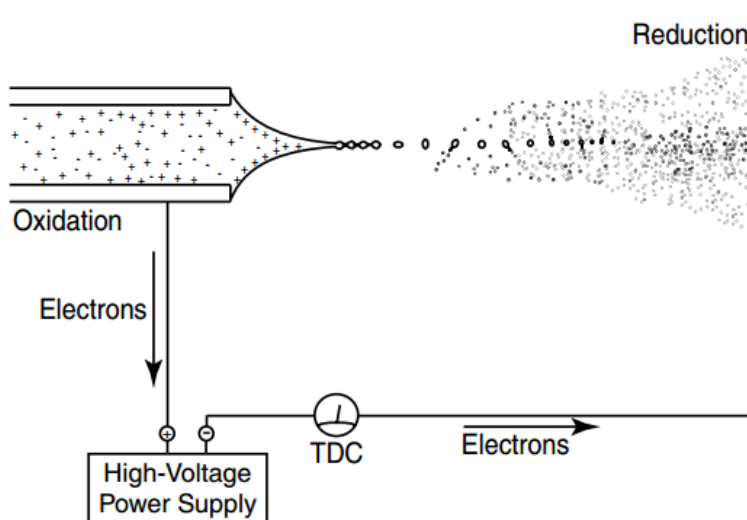


Figura 6: Schematizzazione del processo di ionizzazione ESI.

A questo punto, una parte degli ioni prodotti deve essere trasferita nella zona ad alto vuoto dello spettrometro di massa attraverso un orifizio o per mezzo di un capillare di campionamento. Poiché la maggior parte degli ioni prodotti in sorgente risulta ancora clusterizzata con qualche molecola di solvente o di additivo presente nella soluzione, il capillare di trasferimento è riscaldato in modo da favorire la perdita del solvente residuo. Gli ioni, quindi, attraversano lo *skimmer*, il quale completa la declusterizzazione grazie all'applicazione di un piccolo potenziale elettrico tra l'uscita del capillare di campionamento e lo *skimmer* stesso e collima il fascio ionico portando gli ioni verso l'analizzatore di massa Figura 7.

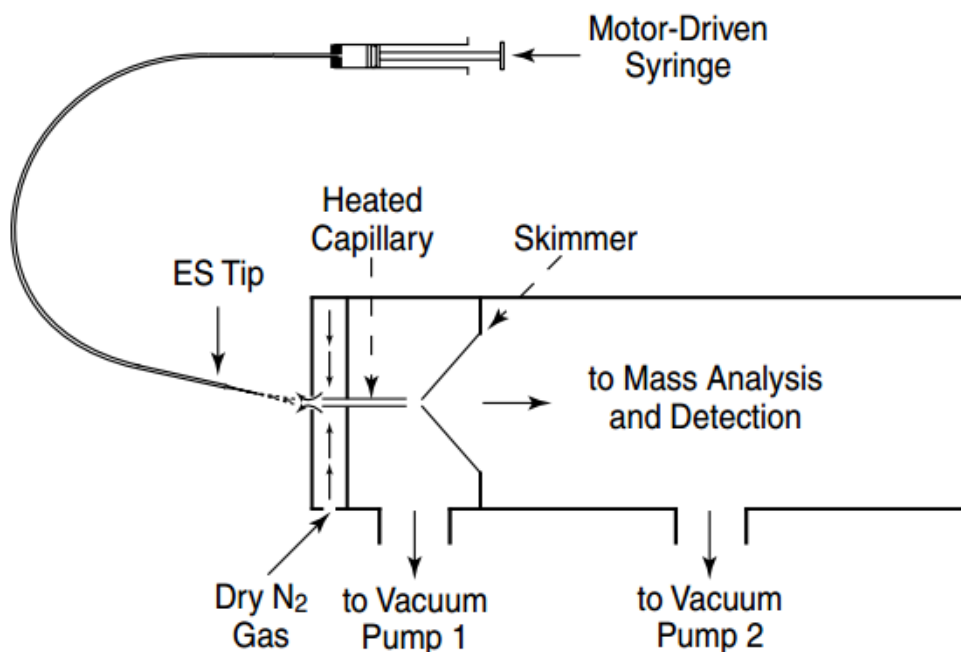


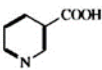
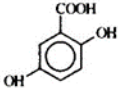
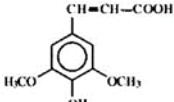
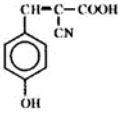
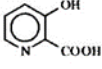
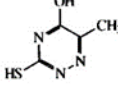
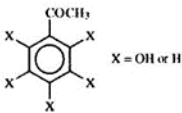
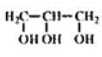
Figura 7: Schema di uno spettrometro di massa con sorgente ESI.

La sorgente di ionizzazione electrospray può essere accoppiata ad analizzatori di massa di vario tipo, come il quadrupolo (e quindi al triplo quadrupolo), la trappola quadrupolare, l'Orbitrap, etc. Negli ultimi anni sono stati sviluppati molti strumenti con sorgente di ionizzazione ESI accoppiati ad analizzatori ibridi (es. Q-TOF), che consentono di determinare la massa accurata degli analiti, di determinarne la struttura attraverso varie tipologie di esperimenti collisionali (es. CID (*collision induced dissociation*), ETD (*electron transfer dissociation*), ECD (*electron capture dissociation*), etc.) e di effettuare misure quantitative sempre più accurate. Ultimamente, la sorgente ESI è stata accoppiata anche alla mobilità ionica; questo consente di aggiungere un'ulteriore dimensione allo spettro di massa, riportando il valore di *collisional cross section* (CCR), che risulta molto utile soprattutto nelle applicazioni di metabolomica e proteomica.

1.4.2 - Ionizzazione per desorbimento laser assistita da matrice (MALDI)

La tecnica MALDI si basa sul processo di desorbimento/ionizzazione tramite irraggiamento laser di una soluzione solida composta dall'analita e da un'opportuna matrice. Come matrici sono utilizzate molecole organiche a basso peso molecolare che possiedono una banda di assorbimento nell'intervallo di lunghezze d'onda del laser utilizzato. Generalmente esse contengono gruppi funzionali acidi in grado di cedere un

protone; le matrici più comunemente usate sono acidi benzoici variamente sostituiti, derivati dell'acido cinnamico (Figura 8).

Matrix	Structure	Wavelength	Major applications
Nicotinic acid		UV 266 nm	Proteins, peptides, adduct formation
2,5-Dihydroxybenzoic acid (plus 10% 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid)		UV 337 nm, 353 nm	Proteins, peptides, carbohydrates, synthetic polymers
Sinapinic acid		UV 337 nm, 353 nm	Proteins, peptides
α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid		UV 337 nm, 353 nm	Peptides, fragmentation
3-Hydroxy-picolinic acid		UV 337 nm, 353 nm	Best for nucleic acids
6-Aza-2-thiothymine		UV 337 nm, 353 nm	Proteins, peptides, non-covalent complexes; near-neutral pH
k,m,n-Di(tri)hydroxy- acetophenone		UV 337 nm, 353 nm	Protein, peptides, non-covalent complexes; near-neutral pH
Succinic acid	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	IR 2.94 μm , 2.79 μm	Proteins, peptides
Glycerol		IR 2.94 μm , 2.79 μm	Proteins, peptides, liquid matrix

IR = infrared; UV = ultraviolet.

Figura 8: Strutture e utilizzo delle principali matrici impiegate in MALDI/MS.

Le principali funzioni della matrice sono:

- Fungere da solvente per le molecole di analita e favorire la formazione di co-cristalli matrice/analita, essenziali per l'ottenimento di uno spettro di massa MALDI. Il rapporto molare matrice/analita varia a seconda del tipo di molecola: in generale per le proteine è di circa 10^4 - 10^5 :1, mentre per polimeri sintetici è di circa 200:1.
- Assorbire l'energia dell'impulso laser e trasformarla in energia di eccitazione vibrazionale del sistema solido, inducendo così un istantaneo cambiamento di fase di un micro-volume di co-cristallo. Questo avviene solo dopo aver raggiunto una soglia energetica minima, indicando quindi che il processo è collettivo e non si

tratta di semplice evaporazione molecolare. Si forma così un gas ad alta densità che si espande nel vuoto a velocità supersonica (*plume*).

- Avere un ruolo attivo nel processo di ionizzazione delle molecole di analita. Anche se non è ancora ben chiaro il reale meccanismo di desorbimento/ionizzazione caratteristico della tecnica MALDI, sicuramente la radiazione laser provoca fotoionizzazione di molecole di matrice che a loro volta inducono ionizzazione chimica delle molecole di analita [M]. Si formano così molecole protonate $[M+H]^+$, ioni molecolari multicarica $[M+nH]^{n+}$, ioni addotti tra molecole di analita $[nM+H]^+$, ioni addotti tra molecole di analita e matrice $[M+matrice]^+$ e ioni cationizzati $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$. Gli ioni più abbondanti sono in ogni caso quelli dovuti a molecole protonate, cioè $[M+H]^+$.

Un punto critico dell'analisi MALDI è rappresentato dal fatto che il rapporto molare analita/matrice non è omogeneo nel cristallo di campione depositato sul supporto. Ad esempio, quando si studiano le proteine, il rapporto 1:10⁴ è quello della soluzione originaria, ma non è mantenuto nel campione allo stato solido a causa del diverso prodotto di solubilità della matrice e dell'analita nel solvente usato. I cristalli che si formano, pertanto, non possono essere considerati omogenei poiché sono caratterizzati da zone più favorevoli all'analisi (*hot spot*), e da zone meno interessanti. Negli *hot spot* il rapporto molare analita/matrice è costante (sebbene ignoto), e lì è possibile ottenere dei buoni spettri caratterizzati da un elevato rapporto segnale/rumore. Nelle altre zone, al contrario, il rapporto analita/matrice è molto diverso e non permette di ottenere dei segnali validi. Ciò costringe l'operatore ad intervenire manualmente per scegliere il punto migliore su cui effettuare l'analisi [41].

Il sistema laser è costituito, generalmente, da un laser ad N₂ ($\lambda=337$ nm) con energia di 100 μ J e tempo di emissione di 100 ns.

Il sistema ottico presenta una serie di specchi che permettono di convergere una parte del fascio (1%) verso un rivelatore, per generare il segnale di inizio acquisizione dello spettro di massa. Il restante 99% dell'intensità del fascio laser può essere controllata, mediante un opportuno attenuatore, al fine di ottimizzare la quantità di ioni formati.

Uno schema semplificato di una sorgente di ionizzazione MALDI è riportato in Figura 9.

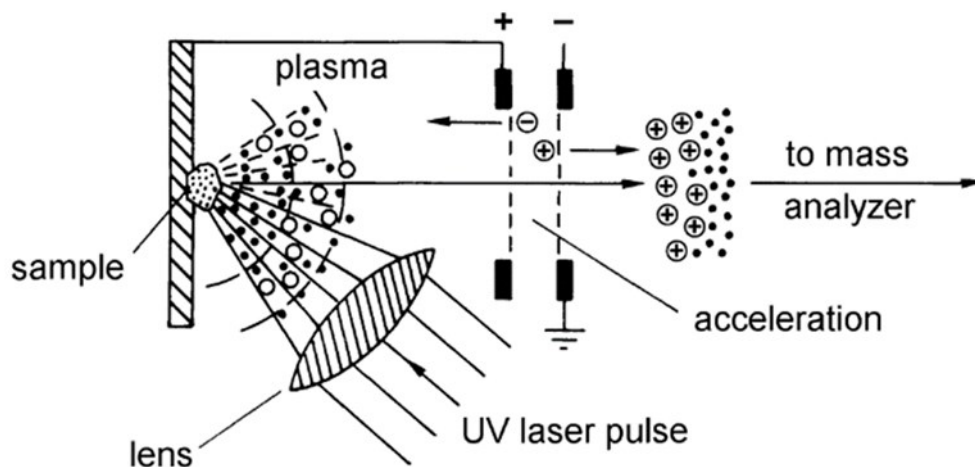


Figura 9: Schema semplificato di una sorgente di ionizzazione MALDI.

Il meccanismo di formazione degli ioni in MALDI è ancora oggetto di studio. Le ricerche principali sono rivolte a determinare la relazione tra resa ionica e fluensa del laser [42, 43], a capire quale sia l'evoluzione temporale del processo di desorbimento e di come questo influisca sulla formazione degli ioni [44], a misurare la velocità iniziale degli ioni desorbiti [45, 46, 47] e al comprendere se la fonte principale di specie ioniche in MALDI sia dovuta a ioni preesistenti nel campione o a ioni generati in fase gas [48, 49, 50].

Al di sotto di una soglia minima di irradianza del laser pari a 10^6 W cm^{-2} non si osserva la produzione di ioni. Al raggiungimento della soglia minima, si ha un netto inizio dei processi di desorbimento/ionizzazione e l'abbondanza degli ioni aumenta all'aumentare (da cinque a nove volte) dell'irradianza [43]. La soglia minima di fluensa della radiazione laser che permette di osservare ioni di matrice e analita dipende dalla matrice che si sta usando e dal rapporto molare matrice/analita; ad esempio la soglia minima di fluensa del laser per il citocromo C si ottiene per un rapporto matrice-campione di 4000 : 1. Rapporti significativamente più alti o più bassi richiedono una fluensa del laser almeno del doppio [51]. L'incremento necessario in condizioni di bassa concentrazione di analita può essere dovuto ad una diminuzione dell'efficienza di rivelazione, poiché un volume maggiore di campione deve essere desorbito al fine di generare un numero sufficiente di ioni di analita. A concentrazioni maggiori di analita, invece, l'energia assorbita per unità di volume diminuisce, poiché la matrice risulta diluita dalle molecole di analita, provocando un aumento della soglia di fluensa minima. Il rapporto ioni-neutri nel *plume* è stato determinato essere minore di 10^{-5} [52].

Nel processo di desorbimento/ionizzazione laser gli ioni vengono generati in tempi dell'ordine di 10^{-7} s ed è quindi necessario l'uso di un analizzatore che separi gli ioni in base al loro rapporto massa/carica (m/z) in tempi particolarmente ristretti. A tale scopo sono utilizzati preferenzialmente analizzatori a tempo-di-volo (TOF, 'Time-of-Flight').

1.4.3 - MALDI Ion Imaging

Una delle applicazioni più interessanti del MALDI è l'*ion imaging* (IMS), ossia una tecnica di indagine microscopica, introdotta nel 1997, che prevede l'analisi delle molecole di interesse direttamente su un tessuto biologico; in questo modo è possibile determinare la distribuzione spaziale e l'abbondanza relativa di proteine, peptidi, glicoproteine, lipidi, metaboliti e farmaci su una porzione sottile di tessuto biologico [53].

A seguito della ricopertura della sezione di tessuto con una matrice opportuna è possibile acquisire i dati di massa in vari punti del campione: il fascio laser della sorgente MALDI, infatti, può eseguire dei micro campionamenti seguendo un *raster* definito dall'utente. Il tessuto è suddiviso virtualmente in una griglia e ogni cella della griglia, avente coordinate x e y , corrisponde ad un punto sul quale è registrato uno spettro di massa. Successivamente, attraverso un software, è possibile richiamare il *raster* e selezionare una particolare specie con un certo valore di m/z dagli spettri acquisiti; così facendo si può ricostruire un'immagine del tessuto, dove attraverso una scala cromatica si indica quali sono i punti dove la specie selezionata è presente con una certa intensità. Il processo è riassunto in Figura 10.

L'utilità di un *ion imaging* tissutale è di estremo interesse per numerose ragioni, ad esempio può permettere:

- l'identificazione di *biomarker*, ovvero peptidi, metaboliti o piccole molecole diagnostiche di un certo stato biologico (malattia, intossicazione, metastasi, etc.) del tessuto e valutazione della loro distribuzione;
- l'analisi farmacocinetica, cioè la possibilità di monitorare sulla scala spazio-temporale il deposito, l'eliminazione e la degradazione di farmaci, tossine o molecole biologicamente attive nel tessuto o sulla sezione di un intero animale;
- lo studio di profili proteici e metabolici, e l'identificazione di zone sane o malate in relazione a patologie specifiche;
- più analisi qualitative e quantitative in parallelo sullo stesso campione;

- l'identificazione contemporanea di più proteine mediante digestione triptica *in situ*.

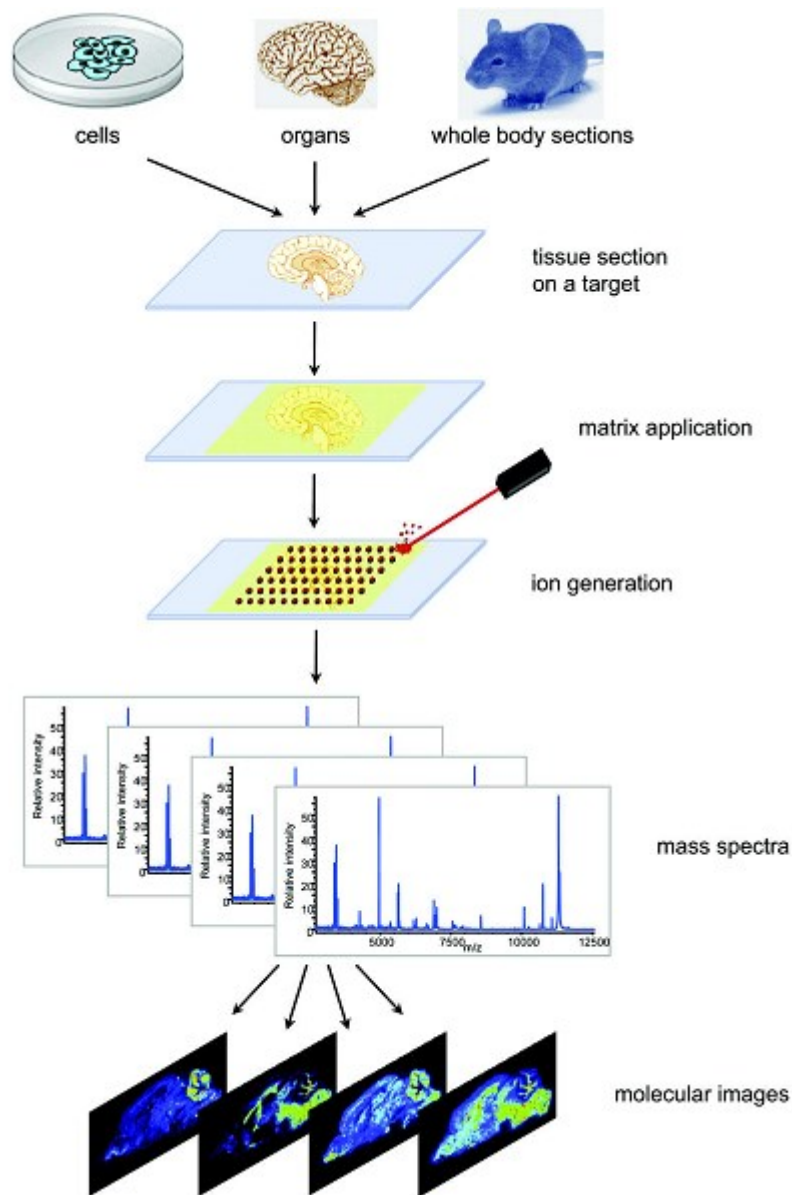


Figura 10: Schema di un esperimento di IMS [54].

Gli esperimenti di IMS possono essere generalmente eseguiti in due modalità: *profiling* e *imaging*. Il *profiling* consiste nell'analizzare individualmente solo alcune aree di interesse del tessuto, come ad esempio un gruppo di cellule con particolari caratteristiche; questa modalità è usata quando si studiano tessuti molto eterogenei, dove solamente una piccola area risulta interessante all'analisi. Gli esperimenti in modalità di *imaging*, invece, analizzano tutta l'area superficiale della porzione di tessuto; in questo modo, la mappa di distribuzione ionica di ogni segnale presente nello spettro di massa potrà essere correlata con le caratteristiche istologiche. L'immagine ottenuta

(un esempio è mostrato in Figura 11) è molto utile perché permette di visualizzare facilmente la composizione del tessuto e la distribuzione delle specie al suo interno: ad esempio in un campione contenente delle cellule tumorali, se queste presentano un particolare segnale dovuto ad un certo *biomarker*, è possibile stabilire qual è la porzione di tessuto malato rispetto alla parte sana. Per poter elaborare i dati registrati e ottenere immagini ad alta risoluzione (utilizzando un laser nell'UV con lunghezza d'onda pari a 337 nm, è possibile ottenere una risoluzione spaziale di massima di 10 μm) è necessario possedere computer potenti e software con algoritmi adatti a manipolare intelligentemente e velocemente la grande quantità di informazioni raccolte [55].

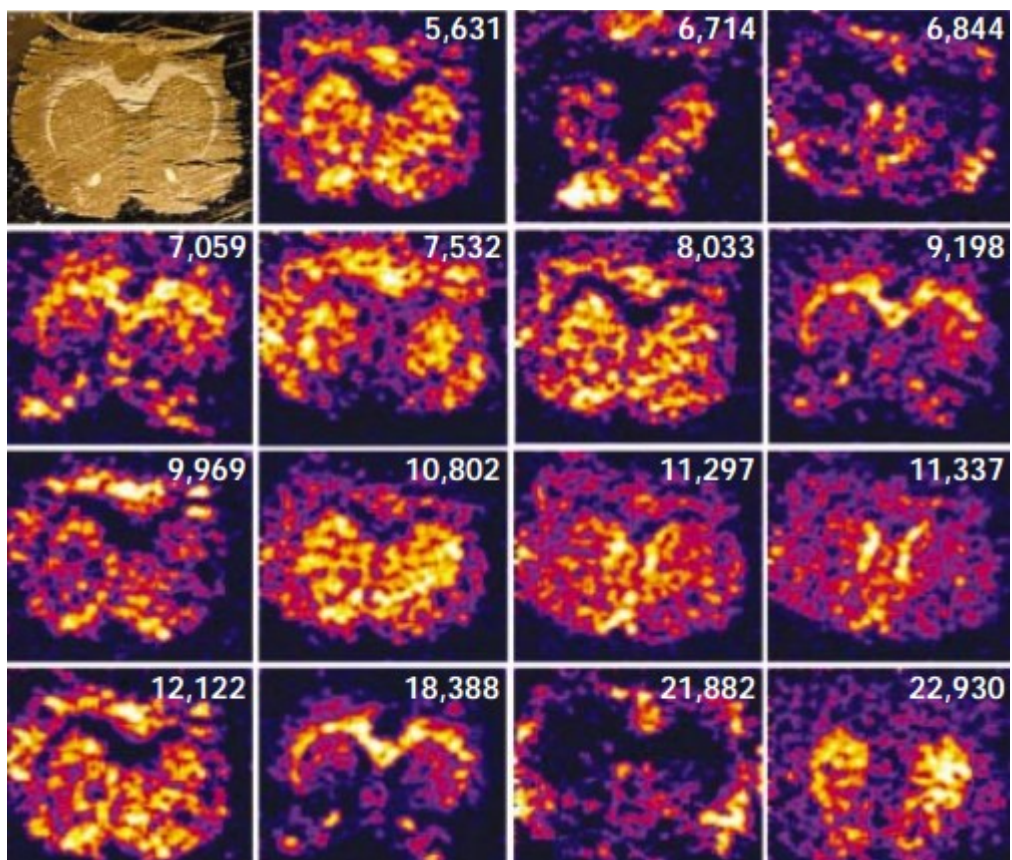


Figura 11: Risultato finale di un esperimento di IMS [56].

Nei protocolli di IMS il trattamento, la conservazione e la preparazione del campione, così pure l'applicazione della matrice, sono dei punti critici per la qualità e la riproducibilità dei dati spettrometrici. Il campione di tessuto, dopo la rimozione chirurgica, deve essere conservato adeguatamente a -80°C e in assenza di aria fino al momento dell'analisi, in modo da evitarne la degradazione. Le porzioni di campione devono essere tagliate in modo accurato con un micrometro criostatato; lo spessore non sembra essere importante per l'analisi poiché il laser è in grado di penetrare solo in parte il tessuto, ma in ogni caso è consigliabile non superare i 10-20 μm . La porzione di tessuto

deve essere successivamente depositata su un supporto conduttivo, solitamente un vetrino drogato ITO (*Indium tin oxide*), e lasciata asciugare sottovuoto per circa un'ora; il tessuto, comunque, deve essere leggermente bagnato al fine promuovere la co-cristallizzazione della matrice con il campione. In alcuni casi, ad esempio nell'analisi delle proteine o dei peptidi, il tessuto deve essere lavato con dei solventi (etanolo, isopropanolo, acetone, etc.) in modo da rimuovere eventuali specie contaminati come i sali, i lipidi e il sangue residuo [57].

Tipicamente, la matrice solida è sciolta con una soluzione di acqua/acetonitrile 50:50 v/v e contenente lo 0.1% di acido trifluoroacetico (TFA) (in alcuni casi si consiglia di usare una soluzione più concentrata in TFA, fino al 2%, per favorire la ionizzazione). L'applicazione della matrice sul tessuto può essere effettuata manualmente, depositando delle gocce del volume di 250 nL (max 1 µL); sebbene con questo metodo si possano ottenere degli spettri di alta qualità, le macchie di matrice che si formano sono piuttosto larghe e non permettono di ottenere una risoluzione spaziale elevata (0.5-1 mm). La matrice può essere depositata anche con l'ausilio di un robot, in grado di posare volumi molto piccoli, dell'ordine di qualche decina di picolitro, e formare gocce con diametro di 100-180 µm. Altri metodi prevedono di spruzzare la soluzione di matrice sull'analita, ad esempio con l'ausilio di un aerografo; in questo caso, si devono eseguire dei cicli multipli di spruzzatura per ottenere un'applicazione adeguata della matrice. Benché in letteratura si trovino varie metodologie, la deposizione della matrice deve permettere di ricoprire il campione in modo omogeneo, evitando la traslocazione degli analiti. Infine, si deve ricordare che i cristalli che si formano devono avere dimensioni minori della risoluzione spaziale [58].

Attraverso l'uso di software specifici, inoltre, la qualità dello spettro può essere ulteriormente migliorata effettuando, ad esempio, la sottrazione della linea di base, la riduzione del rumore di fondo, la calibrazione e la normalizzazione rispetto alla corrente ionica totale (TIC) [59].

1.4.4 - Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)

L'ICP-MS è una tecnica analitica basata sull'utilizzo di uno spettrometro di massa avente come sorgente una torcia al plasma accoppiato induttivamente. Oggigiorno, l'ICP-MS risulta essere il sistema analitico d'eccellenza per l'analisi elementare, caratterizzato da bassi limiti di rivelabilità per la maggior parte degli elementi, elevata sensibilità, buona precisione e accuratezza, velocità di analisi ed elevata selettività. Inoltre, è in grado di distinguere isotopi dello stesso elemento. Diversamente dall'assorbimento

atomico, che può misurare un solo elemento per volta, l'ICP-MS consente la determinazione simultanea di tutti gli elementi con il conseguente vantaggio di rendere l'analisi estremamente veloce [60].

L'ICP-MS consente di analizzare quasi tutti gli elementi della tabella periodica, inclusi anche numerosi non-metalli (P, B, Si, S ed alogeni) sebbene questi ultimi siano determinabili con riproducibilità e con limiti di rivelabilità piuttosto modesti; gli unici elementi non determinabili via ICP-MS sono H, C, N, F, O, Ar ed He.

La sorgente al plasma accoppiato induttivamente è costituita da tre tubi di quarzo concentrici nei quali scorre argon con un flusso di 12-17 L/min. Il tubo più grande ha un diametro di circa 2.5 cm e la relativa estremità superiore è circondata da una bobina di induzione raffreddata ad acqua e alimentata da un generatore di radiofrequenze che negli strumenti commerciali lavora a 40.68 MHz, in modo da massimizzare l'efficienza di accoppiamento tra la bobina e il plasma. L'argon è inizialmente ionizzato da una scintilla prodotta da una bobina Tesla (dispositivo in grado di produrre correnti elettriche a tensioni e frequenze molto elevate); gli ioni che si formano e i relativi elettroni interagiscono successivamente con il campo magnetico fluttuante prodotto dalla bobina di induzione. L'interazione costringe gli ioni e gli elettroni che si trovano nello spazio all'interno della bobina a percorrere un moto circolare provocando un riscaldamento ohmico del plasma. In questo modo è possibile raggiungere temperature dell'ordine dei 6000-10000 K. L'isolamento del plasma è realizzato facendo fluire dell'argon tangenzialmente alle pareti del tubo. Questo flusso tangenziale consente sia di raffreddare le pareti interne del tubo centrale che di sostenere il plasma stesso. In Figura 12 è riportato lo schema di una sorgente a plasma accoppiato induttivamente, detta torcia.

Il campione da analizzare è inizialmente aspirato mediante una piccola pompa peristaltica e portato ad un nebulizzatore. L'aerosol prodotto viene quindi convogliato in un'apposita camera (camera spray) in modo da ottenere gocce molto piccole e di dimensioni pressoché costanti. L'analita subisce quindi l'evaporazione dalla fase liquida a cui segue l'atomizzazione e la successiva ionizzazione nella torcia.

La parte critica dello strumento ICP-MS è costituita, come in tutte le sorgenti ioniche a pressione atmosferica, dall'interfaccia che collega la torcia ICP con l'analizzatore di massa sottovuoto (10^{-5} torr). L'interfaccia è costituita da un cono di campionamento in nickel, raffreddato ad acqua, avente sulla sommità un orifizio con diametro minore di 1 mm. Il plasma è quindi aspirato attraverso l'orifizio e gli ioni presenti sono gradualmente portati nella zona ad alto vuoto e il relativo fascio ionico è collimato attraverso l'uso di lenti elettrostatiche.

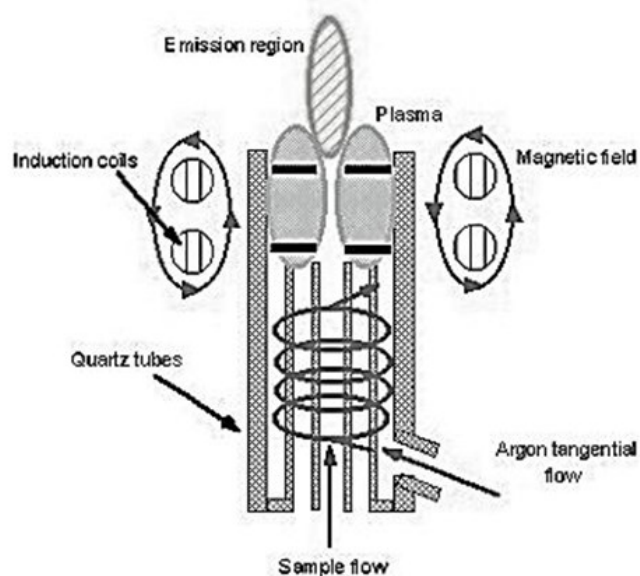


Figura 12: Torcia al plasma accoppiato induttivamente.

Molti strumenti sono anche dotati di una cella di collisione (solitamente un ottapolo), posta subito dopo la zona di campionamento degli ioni. La cella di collisione ha il compito di eliminare le interferenze dovute alla presenza di ioni poliatomici che si formano nel plasma a seguito dell'interazione degli ioni argon con gli elementi chimici presenti nel campione [60].

L'analizzatore di massa presente nella strumentazione ICP-MS è solitamente un quadrupolo o un triplo quadrupolo (Figura 13).

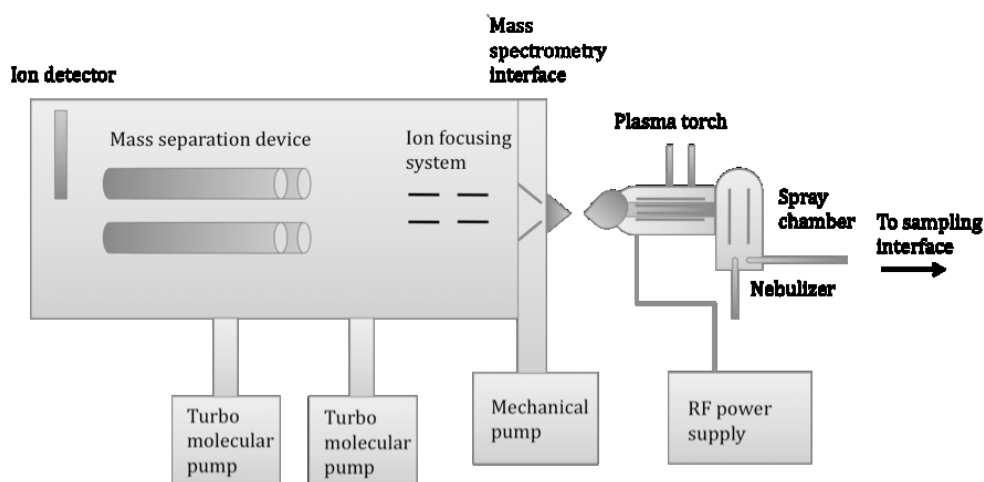


Figura 13: Schema di uno strumento ICP-MS.

Uno dei vantaggi dell'utilizzo della spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente rispetto alla rivelazione ottica è che gli spettri di massa sono generalmente molto più semplici e facili da interpretare rispetto a quelli ottici; resta però il problema delle interferenze spettroscopiche.

Le interferenze spettroscopiche si verificano quando una specie ionica presente nel plasma ha lo stesso valore di m/z di uno ione derivante dall'analita. Tali interferenze rientrano in quattro categorie:

- Ioni isobarici: le specie isobariche sono elementi i cui isotopi hanno la stessa massa. Poiché le sovrapposizioni isobariche sono prevedibili con certezza dalle tabelle di abbondanza isotopica, le correzioni possono essere eseguite utilizzando un software opportuno.
- Interferenze di ioni poliatomici: tale interferenza è dovuta all'interazione tra le specie presenti nel plasma e quelle contenute nel campione. Queste specie possono pertanto produrre ioni molecolari aventi lo stesso valore di m/z di alcuni ioni atomici. Tali ioni sono rimossi nella cella di collisione mediante l'utilizzo di un gas collisionale (He) come visto in precedenza.
- Interferenze dovute a ossidi e idrossidi: l'interferenza più problematica che si può avere nell'ICP-MS è quella dovuta agli ossidi e idrossidi che si formano a partire dall'analita stesso, dai componenti della matrice, dal solvente e dai gas del plasma. La formazione degli ossidi dipende da alcune variabili sperimentali, quali la velocità del flusso d'iniezione, la potenza delle radiofrequenze, le dimensioni dell'orifizio di campionamento, la composizione del gas nel plasma, l'eliminazione dell'ossigeno e l'efficienza di rimozione del solvente; tutte queste variabili possono essere regolate in funzione delle caratteristiche del campione in analisi.
- Ioni a doppia carica: analogamente alla formazione degli ossidi, il livello di formazione degli ioni a doppia carica è legato alle condizioni di ionizzazione nel plasma e può essere generalmente minimizzato attraverso un'attenta ottimizzazione del flusso di gas nel nebulizzatore, della potenza della radiofrequenza e della posizione del campione all'interno del plasma.

2 – Scopo della tesi

Il presente lavoro di tesi si inserisce in un progetto di ricerca più ampio il cui scopo è la definizione di un metodo robusto e affidabile per la diagnosi del diabete gestazionale (GDM) nel primo trimestre di gravidanza. Questo studio prevede una prima parte sperimentale volta alla determinazione, attraverso un approccio “omico”, di possibili biomarcatori urinari, plasmatici o placentari per il GDM e di una parte clinica durante la quale sarà valutata l'effettiva efficacia dei bio-marcatori evidenziati nella prima fase relativamente alla diagnosi del diabete gestazionale. Il gruppo di ricerca è composto da vari ricercatori afferenti al Dipartimento di Medicina (valutazione della casistica, reclutamento dei pazienti), al Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino (raccolta dei campioni, valutazione della casistica), al Dipartimento di Scienze Cardiovascolari e Toraciche (analisi di metabolomica), al Dipartimento di Scienze Chimiche (analisi di metallomica) dell'Università di Padova e al Laboratorio di Spettrometria di Massa del CNR-ICMATE di Padova (analisi di proteomica).

Il presente lavoro ha come scopo principale la valutazione quali/quantitativa delle specie proteiche (proteomica) espresse dalla placenta in presenza di GDM rispetto a controlli sani e la determinazione di possibili alterazioni o modificazioni dei residui amminoacidici (PTM) delle proteine placentari in presenza di GDM.

Inoltre, si vuole eseguire uno screening approfondito di tutti gli elementi chimici (metallomica) caratteristici del tessuto placentare e valutare la presenza di differenze statisticamente significative tra la composizione elementare di placente sane e placente provenienti da gestanti con GDM

3 – Caratterizzazione delle proteine a basso peso molecolare espresse dal tessuto placentare

Questa parte del lavoro di ricerca ha lo scopo di approfondire e confermare i dati ottenuti durante il mio lavoro di tesi di laurea magistrale intitolato “Sviluppo di un metodo analitico per la valutazione dei cambiamenti a livello proteico indotti sul tessuto placentare da diabete gestazionale” [61]. I dati raccolti hanno evidenziato una serie di problematiche non banali legate all’analisi e al trattamento del tessuto placentare, come ad esempio l’elevato contenuto di sangue residuo, e hanno permesso di mettere a punto delle strategie analitiche idonee al fine di ottenere informazioni più interessanti e dettagliate.

Nel suddetto lavoro sono stati analizzati due campioni di omogenato di placenta: il primo è stato ottenuto da un pool di venti campioni di tessuto proveniente da gestanti sane, mentre il secondo deriva da un pool di venti campioni di tessuto placentare prelevato da gestanti con diabete gestazionale. Entrambi i pool sono stati analizzati direttamente mediante spettrometria di massa MALDI-TOF per la determinazione delle proteine a basso peso molecolare (5–40 kDa) e attraverso elettroforesi monodimensionale per l’identificazione delle proteine a più alto peso molecolare (40–200 kDa).

Nel primo caso, a seguito dell’analisi diretta dell’omogenato con lo spettrometro MALDI-TOF, le specie proteiche rivelate sono state identificate basandosi esclusivamente sul loro peso molecolare e il confronto con opportuni database quali *Human Protein Reference Database* e *PhosphositePlus*. Tuttavia, questo approccio risulta essere poco accurato e le informazioni che se ne ricavano devono essere esaminate con estrema attenzione. Pertanto, al fine di valutare i risultati ottenuti, è stato deciso di eseguire uno studio più approfondito; quest’ultimo è caratterizzato dalla digestione enzimatica delle proteine a basso peso molecolare e dalla determinazione della sequenza amminoacidica dei prodotti di digestione al fine di identificare le proteine stesse.

3.1 – Materiali e Metodi

I campioni di placenta umana sono stati raccolti subito dopo il secondamento e refrigerati a -80 °C fino al giorno delle analisi. L’omogenato è stato ottenuto trattando 1

g di campione di tessuto con 3 mL di buffer di lisi (10 mM Hepes, 1 mM EDTA, 0.5 mM ditiotreitolo, pH=7) e termostatando il sistema a 4 °C. L'omogenato è quindi stato centrifugato (10 minuti a 15000 rpm) e il surnatante, contenente le proteine idrosolubili, è stato analizzato allo spettrometro MALDI-TOF/TOF (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics) usando come matrice acido sinapinico (10 mg/mL in H₂O/ACN 50:50 contenente 0.1% TFA) [62].

Successivamente il surnatante è stato trattato con un filtro di cut-off da 10 kDa al fine di rimuovere i peptidi circolanti. Le proteine presenti nel retentato sono quindi state ridotte con ditiotreitolo, alchilate con iodoacetamide e digerite con tripsina per 24 ore. I prodotti della digestione sono stati analizzati con lo spettrometro MALDI-TOF/TOF (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics) usando come matrice l'acido α -ciano-4-idrossicinnamico (10 mg/mL in H₂O/ACN 50:50 contenente 0.1% TFA); la sequenza amminoacidica dei peptidi è stata ottenuta per mezzo di esperimenti collisionali (MALDI-TOF/TOF). I dati acquisiti in modalità MS/MS sono stati processati con MASCOT, utilizzando i seguenti parametri: come database è stato scelto NBCInr (versione marzo 2013), limitando la ricerca alle proteine umane; la specificità enzimatica è stata selezionata sulla tripsina e visto il trattamento del campione è stata impostata come modificazione costante la carbamidometilazione dei residui di cisteina, mentre come modificazione variabile è stata scelta l'ossidazione dei residui di metionina. Per quanto riguarda i parametri strumentali, invece, è stata impostata una tolleranza massima di 0.2 Da sul valore di massa del precursore e di 0.5 Da per i frammenti.

3.2 – Risultati e Discussione

L'analisi preliminare delle proteine idrosolubili a basso peso molecolare espresse nel tessuto placentare ha portato ai risultati riportati in Tabella 1. L'identificazione delle specie proteiche è stata eseguita confrontando il loro peso molecolare con i dati riportati in *Human Protein Reference Database* e *Phosphosite Plus*, restringendo la ricerca alle sole proteine presenti nel tessuto placentare.

Questo approccio, comunque, non può considerarsi del tutto corretto, poiché non è stata effettuata alcuna conferma della sequenza amminoacidica delle proteine ipotizzate; pertanto, i dati ottenuti sono da considerarsi provvisori. I criteri impostati per la ricerca nei database, inoltre, hanno limitato di molto il campo di indagine, presupponendo che in un tessuto/organo siano esclusivamente presenti proteine/peptidi caratteristiche dell'organo stesso, trascurando invece le sue possibili interazioni con gli altri componenti dell'organismo. Considerando la funzione della

placenta e l'importante ruolo che essa ricopre nel fornire al feto le sostanze necessarie al suo sviluppo e nell'eliminare i prodotti di scarto, è necessario allargare il campo di ricerca alle proteine espresse nel sangue. Il tessuto ematico è infatti indispensabile affinché la placenta possa svolgere correttamente il suo compito; pertanto l'interazione tra i due sistemi è piuttosto forte e comunque non trascurabile. Anche a livello anatomico e morfologico si riscontra questo fatto, tantoché osservando il tessuto placentare sia a livello macro che microscopico è possibile stabilire la stretta sinergia che li lega (il tessuto placentare può essere considerato una "spugna" imbevuta di sangue).

Tabella 1: Confronto tra i valori di m/z delle specie ioniche rivelate nell'omogenato del tessuto placentare a seguito dell'analisi MALDI e le masse teoriche delle proteine ipoteticamente identificate.

Protein Name	Gene Name	Molecular Weight	Detected m/z
39S ribosomal protein L55, mitochondrial	MRPL55	15,128	15,128
Insulin-like peptide INSL5	INSL5	15,333	15,337
Probable ergosterol biosynthetic protein 28	C14orf1	15,864	15,868
Histone H3-like centromeric protein A	CENPA	15,991	15,999
R-spondin-3	RSPO3	30,929	30,901
Mitochondrial dicarboxylate carrier	SLC25A10	31,282	31,259

L'analisi del digerito triptico dell'omogenato del tessuto placentare e la determinazione delle sequenze amminoacidiche dei prodotti di digestione ha quindi permesso di identificare in modo più accurato le specie proteiche espresse. La digestione enzimatica delle proteine, in questo caso usando come enzima la tripsina (catalizza l'idrolisi del legame amminoacidico con specificità per residui di arginina e lisina), permette di ottenere delle sequenze di proteina più corte e con pesi molecolari minori (prodotti della digestione), le quali possono essere efficacemente analizzate per mezzo di esperimenti MS/MS al fine di ricostruire la sequenza amminoacidica che le caratterizza. Una volta ottenuta questa informazione è possibile risalire alla proteina di appartenenza grazie ad opportuni software e database; l'informazione ricavata è corredata da un "punteggio" (*score*) che descrive la probabilità di appartenenza del peptide analizzato alla proteina trovata. Questa procedura sperimentale ha la sola funzione di determinare l'identità della proteina e la sua sequenza amminoacidica, ma non permette di ottenere informazioni sulla sua struttura, funzione o interazione con altre specie.

In Tabella 2 sono riportate le sequenze amminoacidiche dei prodotti di digestione e la corrispondente proteina identificata. In Figura 14, invece, è riportato lo spettro di massa MALDI dell'omogenato, sia per il pool dei controlli (A) che per il pool delle gestanti

diabetiche (B), nell'intervallo 14-17 kDa. Come si nota, le specie a m/z 15128 e m/z 15868 corrispondono rispettivamente alle sub-unità alfa e beta dell'emoglobina, mentre la specie a m/z 15999 è correlabile con la sub-unità gamma dell'emoglobina. E' interessante anche evidenziare la presenza del segnale a m/z 14971, attribuibile a una modificazione enzimatica della sub-unità alfa dell'emoglobina; questa è dovuta all'azione proteolitica della Carbossipeptidasi B, la quale catalizza la perdita del residuo di arginina C-terminale [63]. L'analisi dei prodotti di digestione non ha fornito ulteriori informazioni circa la presenza di altre specie proteiche nell'omogenato.

Tabella 2: Identificazione dei prodotti di digestione dell'omogenato (MASCOT).

Detected m/z	Expected m/z	Amino Acidic Sequence	Protein ID
1274.765	1273.758	LLVYPWTQR	Hemoglobin α chain Hemoglobin β chain Hemoglobin γ chain
1529.776	1528.727	VGAHAGEYGAEALER	Hemoglobin α chain
1833.936	1832.885	TYFPFDLSHGSAQVK	Hemoglobin α chain
2228.199	2227.191	SAVTALWGKVNVDVEVGGEALGR	Hemoglobin β chain
2586.304	2585.297	GTFATLSELHCDKLHVDPENFR	Hemoglobin β chain
2996.573	2995.566	VADALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK	Hemoglobin α chain
3124.672	3123.666	KVADALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK	Hemoglobin α chain
3217.653	3216.646	GHFTEEDKATITSLWGKVNVEDAGGETLGR	Hemoglobin γ chain

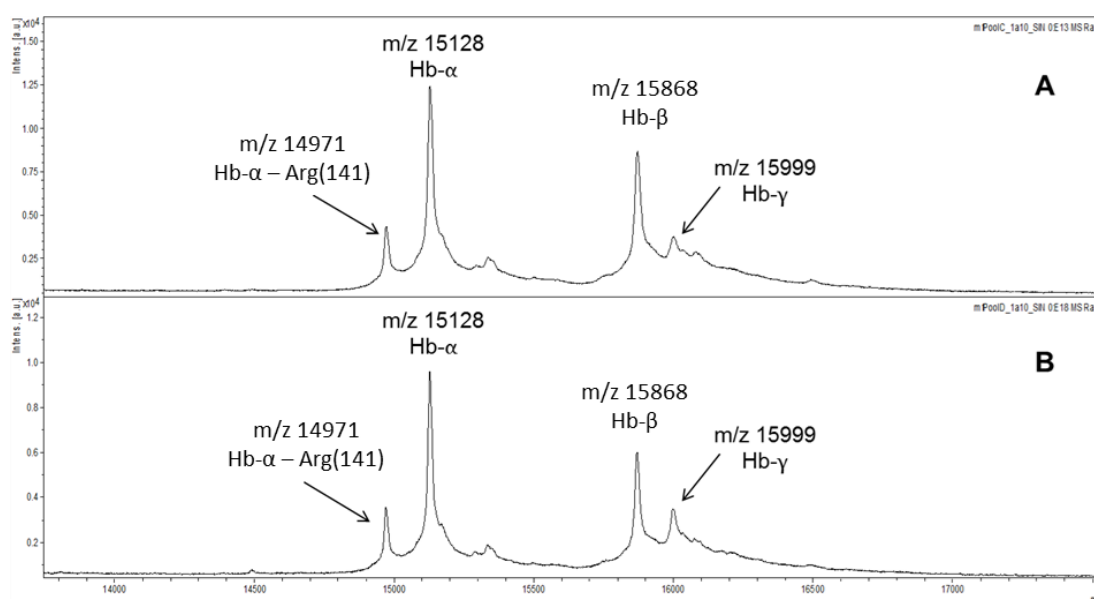


Figura 14: Spettro MALDI dell'omogenato per il pool dei controlli (A) e per il pool delle gestanti diabetiche (B); zoom 14000-17000 Da.

3.3 – Conclusioni

I risultati dell'analisi appena descritta mostrano indiscutibilmente la presenza di emoglobina nell'omogenato del tessuto placentare. I segnali relativi alle sub-unità α , β e γ dell'emoglobina risultano essere molto intensi negli spettri MALDI dell'omogenato non digerito, tanto da poter ipotizzare con una certa sicurezza un possibile fenomeno di soppressione dei segnali ionici relativi ad altre specie proteiche, le quali probabilmente sono presenti in concentrazione molto minore rispetto all'emoglobina. Per quanto riguarda l'analisi del digerito triptico si possono fare delle considerazioni analoghe, in particolare si può affermare che l'elevata concentrazione di emoglobina ha fatto sì che fosse quest'ultima ad essere digerita in modo preferenziale dalla tripsina, mentre le altre specie sono state processate in modo incompleto. Inoltre, anche negli spettri MALDI del digerito, l'elevata intensità dei segnali relativi alla proteolisi dell'emoglobina ha provocato la soppressione dei segnali meno intensi dovuti alle altre specie proteiche, non permettendo quindi di acquisire informazioni importanti relativamente al contenuto proteico del tessuto placentare.

Durante la fase di preparazione del campione, la placenta è stata opportunamente lavata proprio al fine di eliminare quanto più tessuto ematico possibile, tuttavia non si sono ottenuti i risultati sperati. Come descritto precedentemente, l'interazione fisiologica e fisica tra il tessuto placentare e il tessuto ematico è talmente intensa da rendere molto difficile una loro effettiva separazione; pertanto con questa metodica analitica non è possibile studiare in modo completo ed esauriente il proteoma placentare e/o eventuali sue modificazioni in relazione ad una condizione patologica. Il trattamento dell'omogenato con altre tecniche di separazione, quali l'elettroforesi monodimensionale ha comunque fornito risultati più interessanti [62].

Viste le precedenti considerazioni, è necessario continuare le analisi seguendo altri tipi di approcci sperimentali. In particolare è necessario implementare un'adeguata fase pre-analitica nella quale il campione sia raccolto e purificato il più efficacemente possibile dalla contaminazione ematica, evitando allo stesso tempo che il trattamento causi una pesante degradazione del tessuto placentare stesso. Inoltre, la fase analitica deve essere implementata con una o più tecniche di separazione (elettroforesi bidimensionale e HPLC) prima di effettuare l'analisi tramite spettrometria di massa.

4 – MALDI Ion Imaging della placenta umana

Alcuni degli aspetti più interessanti della spettrometria di massa MALDI sono le varie applicazioni di questa tecnica di ionizzazione all'*ion imaging* (IMS), ossia una metodo di indagine microscopica, introdotta nel 1997, che prevede l'analisi delle molecole di interesse direttamente su un tessuto biologico; in questo modo, è possibile determinare la distribuzione spaziale e l'abbondanza relativa di proteine, peptidi, glicoproteine, lipidi, metaboliti e farmaci su una porzione sottile di substrato biologico. A seguito della ricopertura della sezione di tessuto con una matrice opportuna è possibile acquisire i dati di massa in vari punti del campione: il fascio laser della sorgente MALDI, infatti, può eseguire dei microcampionamenti seguendo un raster definito dall'utente. Il tessuto è suddiviso virtualmente in una griglia e ogni cella della griglia, avente coordinate x e y , corrisponde ad un punto per il quale è registrato uno spettro di massa. Successivamente, attraverso un opportuno software, è possibile richiamare il raster e selezionare una particolare specie con un certo valore di m/z dagli spettri acquisiti; così facendo si può ricostruire un'immagine "molecolare" del tessuto, dove attraverso una scala cromatica si indica quali sono i punti dove la specie selezionata è presente con una certa intensità e quindi con una certa concentrazione [64].

In questo studio si è voluto valutare e sfruttare le potenzialità del "MALDI *ion imaging*" al fine di ottenere un'immagine microscopica riportante la distribuzione spaziale di specie molecolari caratteristiche della placenta. Il lavoro risulta essere alquanto innovativo; in letteratura, infatti, le informazioni relative alla proteomica del tessuto placentare sono presenti in numero limitato e comunque non sono disponibili studi che indagano la distribuzione tissutale placentare di proteine e/o peptidi.

Lo scopo principale di questo lavoro, pertanto, è stato quello di ottenere un fingerprint più definito delle proteine espresse dalla placenta e di determinare le possibili differenze nella distribuzione spaziale delle specie di interesse tra il lato fetale e materno del tessuto placentare sano e proveniente da gestanti con GDM. Inoltre, si è voluto studiare come i dati ricavabili con questo metodo dipendano dal trattamento del campione e dal rapporto matrice/analita.

4.1 - Materiali e Metodi

L'analisi è stata condotta su 10 campioni di placenta (5 campioni provenienti da gestanti sane e 5 campioni provenienti da gestanti con diabete gestazionale), raccolti subito dopo il parto e stoccati a -80°C. Il giorno dell'analisi i campioni sono stati sezionati in fette dello spessore di 20 µm per mezzo di un microtomo criostatato e montati a freddo su un vetrino ricoperto di un film conduttivo ITO (*Indium tin oxide*).

Al fine di massimizzare il numero e l'abbondanza delle specie rivelabili, i campioni di tessuto sono stati lavati con opportune soluzioni. Queste consentono l'eliminazione della maggior parte dei sali, dei lipidi e di altre molecole che interferiscono nel processo di ionizzazione, permettendo quindi l'ottenimento di spettri di migliore qualità. Sono state testate quattro diverse tipologie di trattamento:

- 1) nessun trattamento del campione;
- 2) lavaggio in due step: 70% etanolo (30 s), 90% etanolo (30 s) [57];
- 3) lavaggio in due step: 70% 2-propanolo (30 s), 90% 2-propanolo (30 s) [57];
- 4) lavaggio in tre step: 70% etanolo (30 s), 90% etanolo (30 s), 0.1% Triton + 0.1% TFA (30 s) [65].

A seguito dei vari lavaggi, i campioni sono stati fatti asciugare sotto vuoto per un'ora.

Successivamente si è proceduto con la deposizione della matrice, essenziale per far avvenire la ionizzazione degli analiti in modalità MALDI. Al fine di poter determinare variazioni di distribuzione relativamente alle specie proteiche o peptidiche espresse dal tessuto, la matrice necessita di essere depositata in modo omogeneo sul campione: l'intensità del segnale MALDI, infatti, dipende dal rapporto matrice/analita e solamente mantenendo costante la quantità di matrice è possibile ottenere informazioni significative sulla concentrazione delle varie specie nei vari punti del tessuto. Il metodo di deposizione della matrice, inoltre, deve permettere l'ottenimento di cristalli molto piccoli della stessa (con dimensioni dell'ordine dei 50 µm) per non inficiare la risoluzione spaziale (quest'ultima non può essere maggiore del diametro del cristallo di matrice) e non provocare delocalizzazione degli analiti.

A questo scopo, nel nostro laboratorio è stato messo a punto un sistema SBD (*Sieve-Based Device*, Figura 15) [66], costituito da una sorgente electrospray che permette di spruzzare una soluzione di matrice perpendicolarmente al campione biologico. Tra la sorgente electrospray e il campione è interposto un setaccio di acciaio inox di maglia variabile che consente di controllare il diametro delle particelle di matrice che si depositano sul campione. Il sistema è stato progettato in modo che si possa

controllare il flusso di soluzione di matrice (pompa a siringa), il flusso del gas di nebulizzazione, il voltaggio del capillare, la distanza tra la sorgente e il setaccio e la distanza tra il setaccio e il campione.

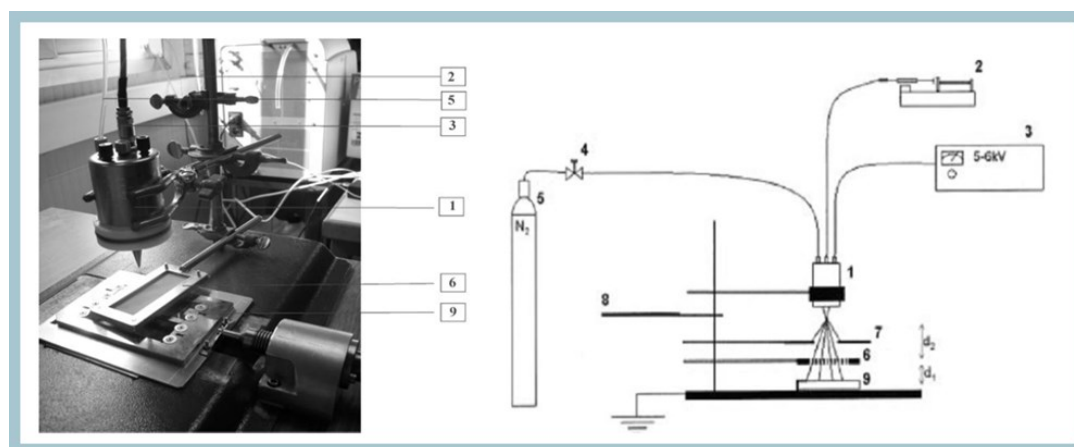


Figura 15: Sieve Based Device (SBD).

Tutti i parametri modificabili devono essere opportunamente valutati prima di procedere alla deposizione della matrice sul campione di interesse poiché essi influenzano la dimensione dell'area di ricopertura del tessuto, il tempo di trattamento minimo utile ad ottenere un rapporto segnale/rumore elevato nell'analisi allo spettrometro di massa e la risoluzione spaziale. Pertanto, sul tessuto placentare sono stati eseguiti vari test per mettere a punto le condizioni sperimentali migliori. L'ottimizzazione dei vari parametri ha portato ai seguenti valori:

- Distanza setaccio-spray: 40 mm;
- Distanza setaccio-tessuto: 10 mm;
- Diametro dei pori del setaccio: 106 μm ;
- Pressione dello sheat gas (N2): 70 psi (4.76 atm);
- Voltaggio del capillare: 0 kV;
- Matrice: acido sinapinico (5 mg/mL H₂O/ACN 50:50 + 0.1%TFA);
- Flusso della soluzione di matrice: 800 $\mu\text{L/h}$;

Si ottiene, così, un flusso di matrice sul campione pari a $1.8 \cdot 10^{-4} \text{ mmol min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$.

A questo punto è stato valutato il tempo di deposizione necessario per ottenere degli spettri con elevato numero di specie rivelate, elevata abbondanza e risoluzione, in funzione del pre-trattamento del campione. In pratica sono stati esaminati due parametri, il numero di specie ioniche rivelate e l'intensità dei relativi segnali, a intervalli temporali di deposizione di 5 minuti, per un tempo massimo di 40 minuti. I risultati

migliori si sono ottenuti pre-trattando il campione con la soluzione 4 e depositando come matrice una soluzione di acido sinapinico per un tempo di spruzzatura pari a 25 minuti.

I 10 campioni di placenta sono stati analizzati con lo spettrometro MALDI-TOF/TOF (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics) sia sul lato fetale che materno, campionando il tessuto con un raster di 100 μm . Gli spettri di massa sono stati acquisiti in modalità di rivelazione di ioni positivi, considerando l'intervallo di m/z da 5000 a 60000, previa calibrazione dello strumento. Le immagini rappresentanti la distribuzione delle proteine sul tessuto placentare e il confronto tra i vari campioni sono stati ottenuti con il software FlexImaging 3.3 (Bruker Daltonics), normalizzando gli spettri acquisiti per la corrente ionica totale (TIC).

4.2 - Risultati e Discussione

In Figura 16 sono stati riportati gli spettri ottenuti a seguito dell'analisi del tessuto placentare non trattato a diversi tempi di spruzzatura della matrice. Come si nota, nello spettro di massa è presente un'unica specie a m/z 15200 e, cosa ancora più interessante, l'intensità del segnale diminuisce all'aumentare della quantità di matrice depositata (Figura 17).

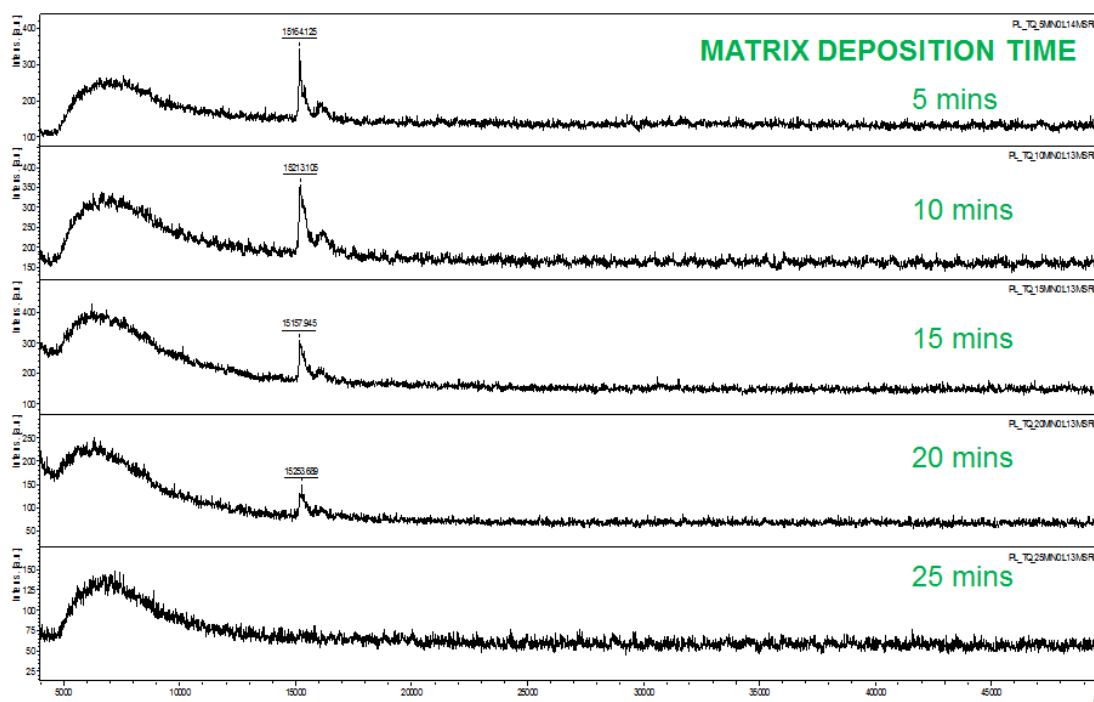


Figura 16: Tessuto placentare, nessun trattamento del campione.

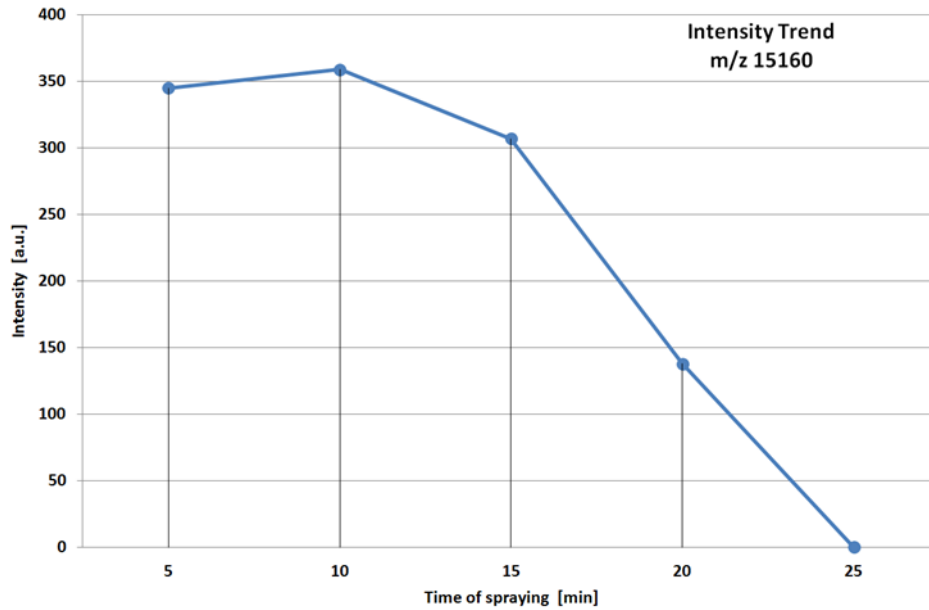


Figura 17: Abbondanza assoluta delle specie ioniche vs. tempo di spruzzatura; campione di placenta non trattato.

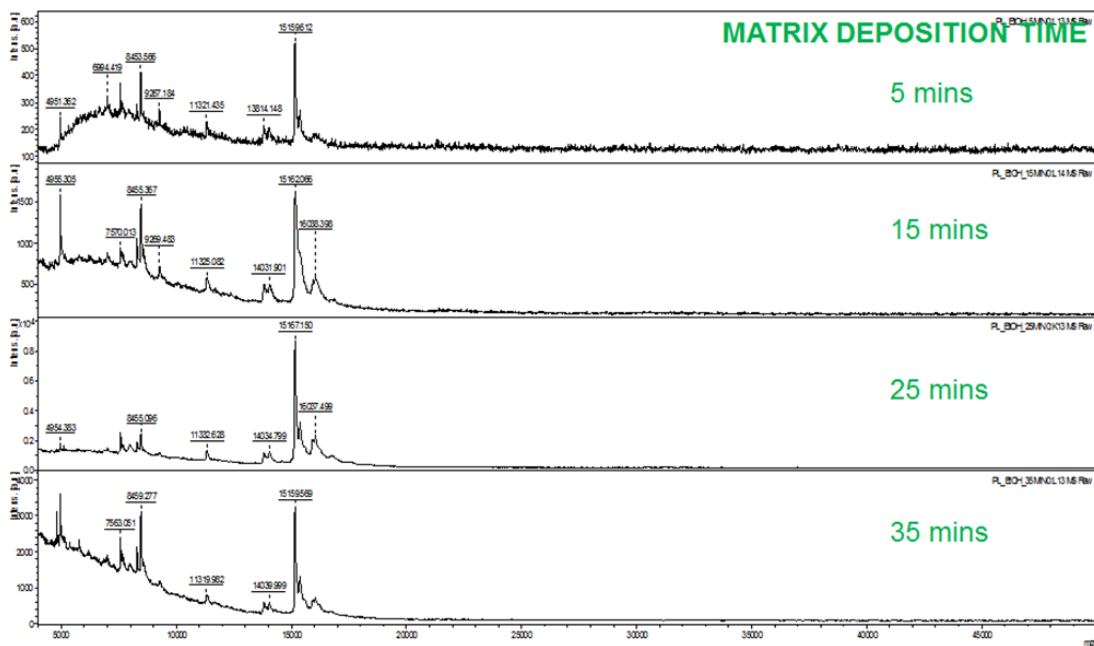


Figura 18: Tessuto placentare, pre-trattamento: etanolo.

Trattando il tessuto con etanolo (Figura 18) si nota un netto miglioramento della qualità degli spettri poiché è possibile rivelare varie specie ioniche nell'intervallo di m/z 5000-20000; a masse più elevate, invece, non sono presenti segnali significativi. Il numero massimo di proteine rivelabili si ottiene dopo venti minuti di spruzzatura (Figura 19); a tempi di deposizione maggiori il numero dei segnali diminuisce. Per quanto riguarda l'intensità del segnale relativo alle specie ioniche (ad esempio in Figura

20 è riportato l'andamento per le specie a m/z 11321, m/z 13815 e m/z 15129) si ha un massimo tra i 20 e i 25 minuti di deposizione della matrice.

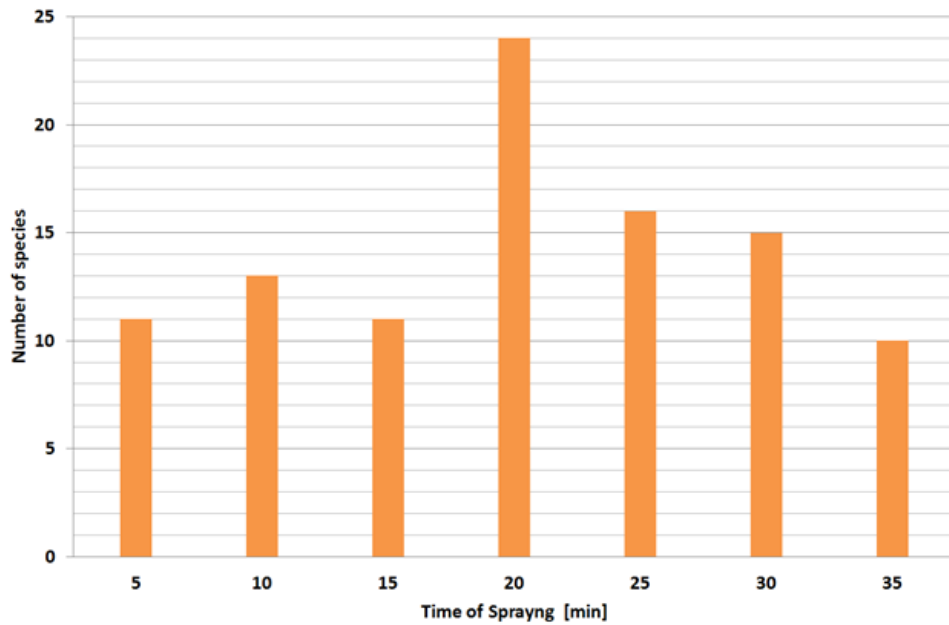


Figura 19: Numero di specie rivelate vs. tempo di spruzzatura; tessuto placentare trattato con etanolo.

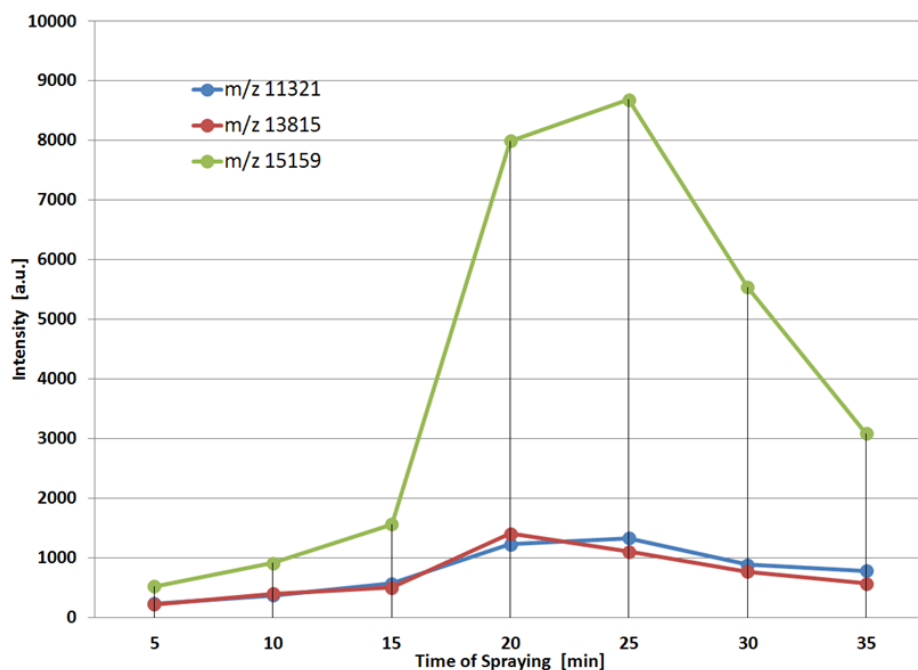


Figura 20: Abbondanza assoluta delle specie ioniche vs. tempo di spruzzatura; campione di placenta trattato con etanolo.

Il lavaggio che fornisce i migliori risultati è quello effettuato con la soluzione 4. Gli spettri mostrano chiaramente la presenza di numerose specie nell'intervallo 5000-20000 Da, circa il doppio rispetto al numero delle stesse rivelato nei casi precedenti (Figura 21). Inoltre, è possibile rivelare dei segnali anche a valori di m/z maggiori, nell'intervallo 20000-35000 Da (Figura 22). Le condizioni sperimentali migliori sono state ottenute dopo 25 minuti di applicazione della matrice (Figura 23). Questo metodo di pre-trattamento del tessuto, visto l'elevato numero di specie rivelabili, è stato scelto per la preparazione dei campioni per le successive analisi.

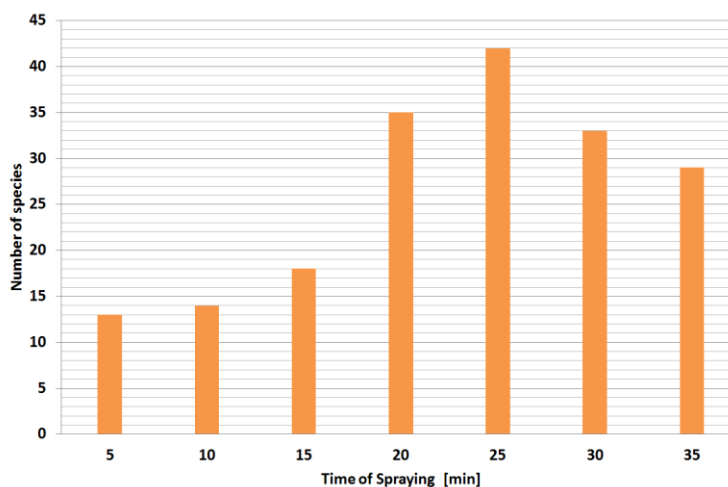


Figura 21: Numero di specie rivelate vs. tempo di spruzzatura; tessuto placentare trattato con la soluzione 4.

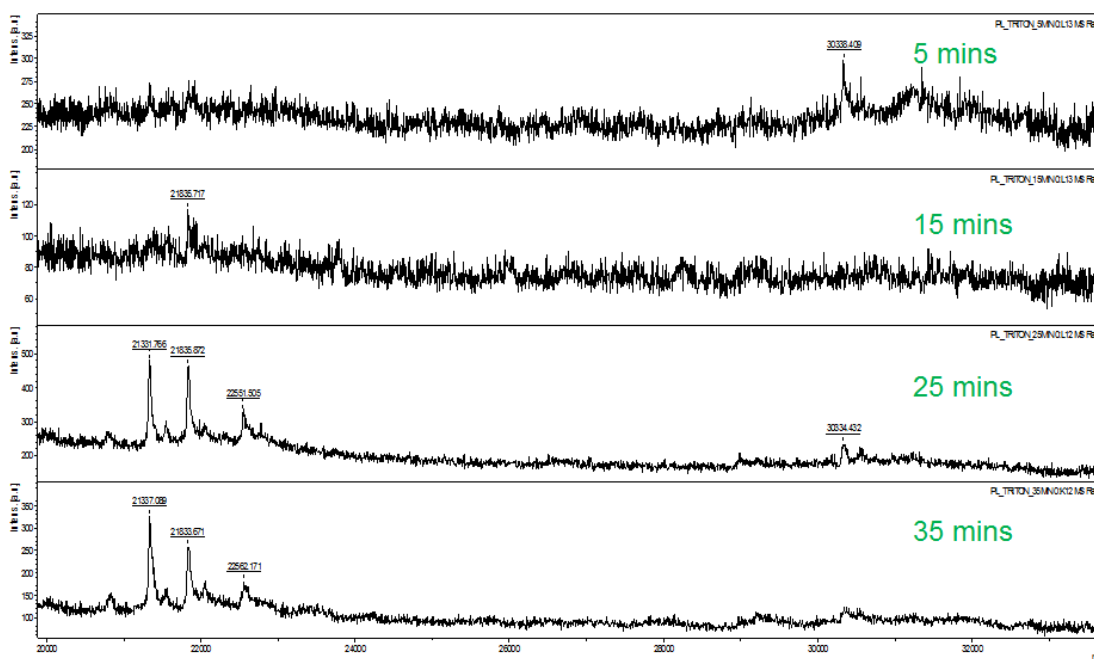


Figura 22: Tessuto placentare, pre-trattamento con soluzione 4.

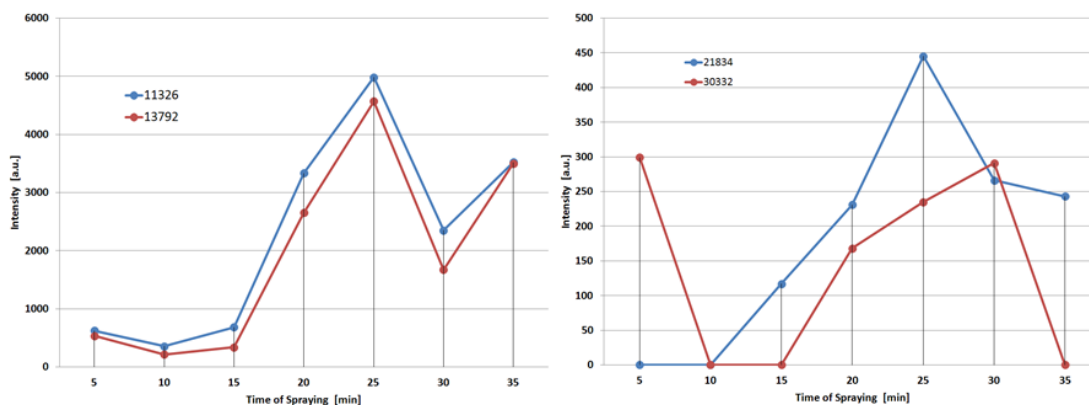


Figura 23: Abbondanza assoluta delle specie ioniche vs. tempo di spruzzatura; campione di placenta trattato con la soluzione 4.

Per il campione di tessuto trattato con propanolo, infine, si ottiene un massimo per il numero di specie presenti nello spettro e per la relativa abbondanza assoluta solo dopo 40 minuti (dati non mostrati).

Gli spettri ottenuti dall'analisi dei 10 campioni di tessuto placentare mostrano ancora una importante presenza dei segnali relativi alle sub-unità α , β e γ dell'emoglobina nell'intervallo 7-17 kDa. Al fine di ottenere delle informazioni più significative relativamente all'espressione proteica nel lato fetale e materno del tessuto in esame si è quindi posta l'attenzione sulle specie ioniche presenti nell'intervallo 20-35 kDa. In Figura 24 si possono osservare gli spettri ottenuti per il lato fetale e materno rispettivamente di campioni di placenta sana e proveniente da gestanti con diabete gestazionale. In questa zona dello spettro di massa si possono osservare delle nette differenze tra i due lati. Il lato materno della placenta mostra la presenza di segnali a m/z 21330, m/z 21835 e m/z 22550, non presenti nel lato fetale, mentre le specie ioniche rivelabili a m/z 45590, m/z 46360 e m/z 47075 (di cui è possibile notare anche gli ioni a doppia carica, rispettivamente a m/z 22800, m/z 23180 e m/z 23540) sono caratteristiche del lato fetale. I segnali a m/z 30385, m/z 31125 e m/z 31880 sono rivelabili su entrambi i versanti del tessuto, ma questi segnali mostrano un'abbondanza significativamente maggiore nella parte fetale.

L'identificazione di queste specie proteiche risulta essere particolarmente complicata, poiché visto il peso molecolare elevato non è possibile effettuare esperimenti MS/MS con la strumentazione disponibile. Inoltre, l'analisi dell'omogenato mediante elettroforesi monodimensionale, descritto in [62], non ha evidenziato proteine in questo intervallo di massa. Una possibile soluzione consiste nella digestione *in situ* della totalità delle proteine espresse dal tessuto e successiva identificazione sfruttando la

caratterizzazione dei relativi prodotti di digestione (*bottom-up proteomics*). Tuttavia in letteratura non sono riportate metodiche robuste per questo tipo di analisi e i lavori reperibili molto spesso mostrano una scarsa resa di digestione e riproducibilità; inoltre l'azione proteolitica è favorita per le specie più concentrate. Pertanto, vista l'elevata concentrazione di emoglobina che caratterizza questa tipologia di campione, la digestione *in situ* non sembra essere l'approccio sperimentale più corretto ed efficace per risolvere il problema, che tutt'oggi rimane irrisolto.

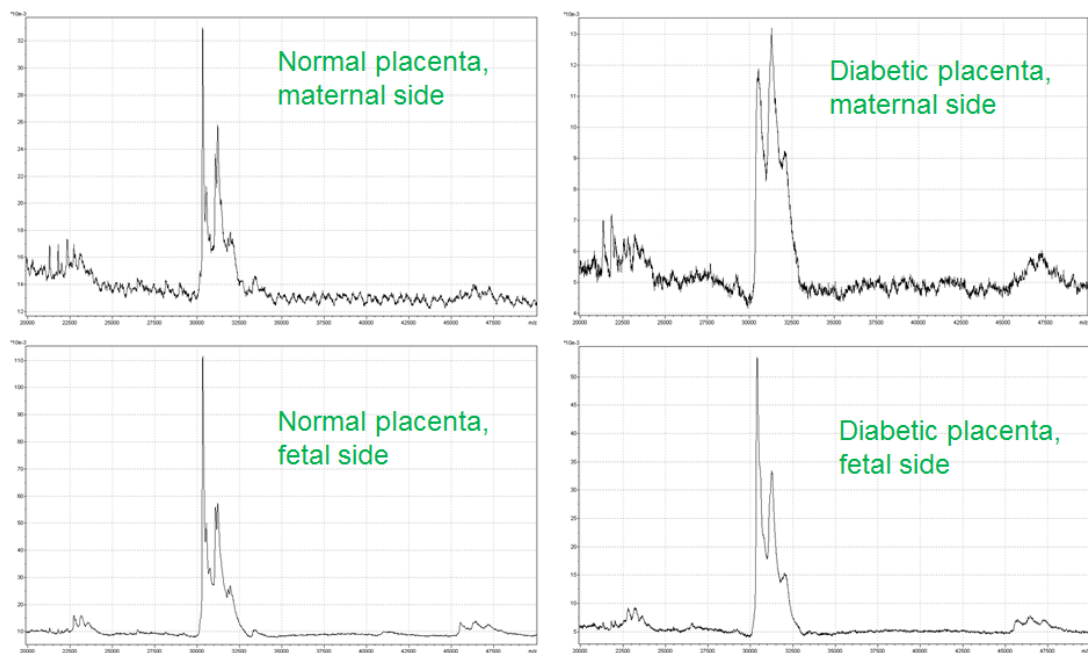


Figura 24: Spettri MALDI (20-35 kDa) del lato fetale e materno di placente sane e diabetiche.

In Figura 25 sono riportati i risultati ottenuti dalle misure di MALDI *ion imaging* per lo ione a m/z 21330; come si nota, questa specie risulta sovra-espressa nel lato materno di placente sane e placente diabetiche. In Figura 26, invece, sono riportate le mappe ioniche ottenute per la specie a m/z 30385; quest'ultima risulta sovra-espressa nel lato fetale dei campioni di placenta. Le informazioni ottenute sono rilevanti, poiché dal punto di vista fisiologico i due versanti del tessuto placentare hanno ruoli e funzioni molto diversi. Non si notano, invece, differenze significative tra tessuto placentare proveniente da gestanti con GDM e gestanti sane.

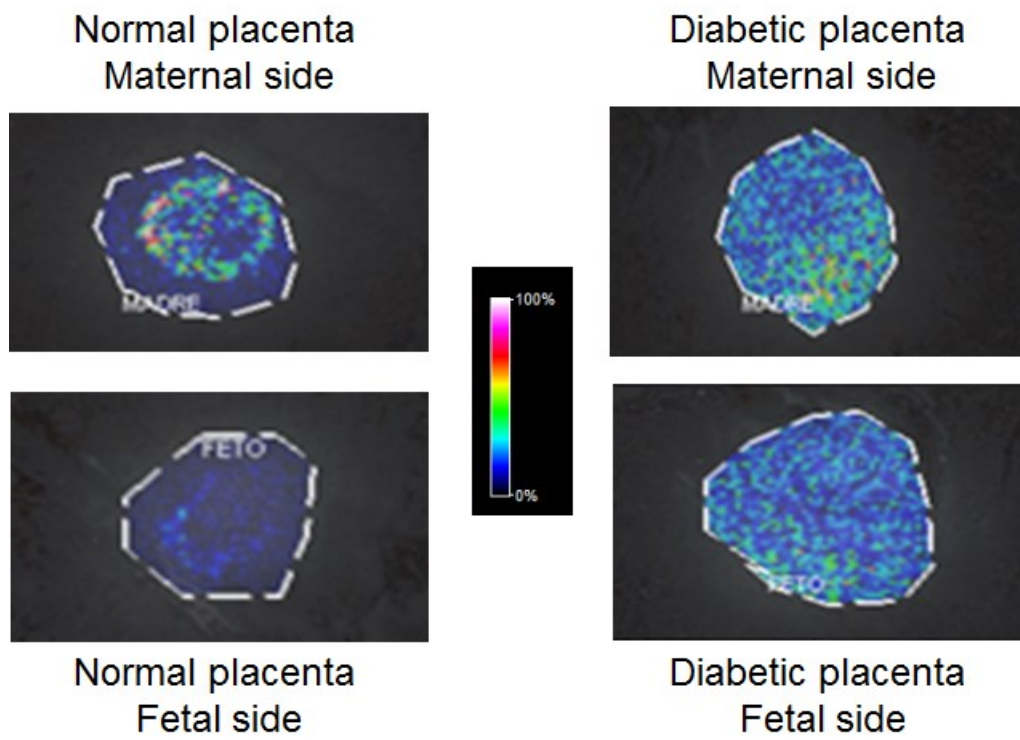


Figura 25: MALDI ion imaging, m/z 21330.

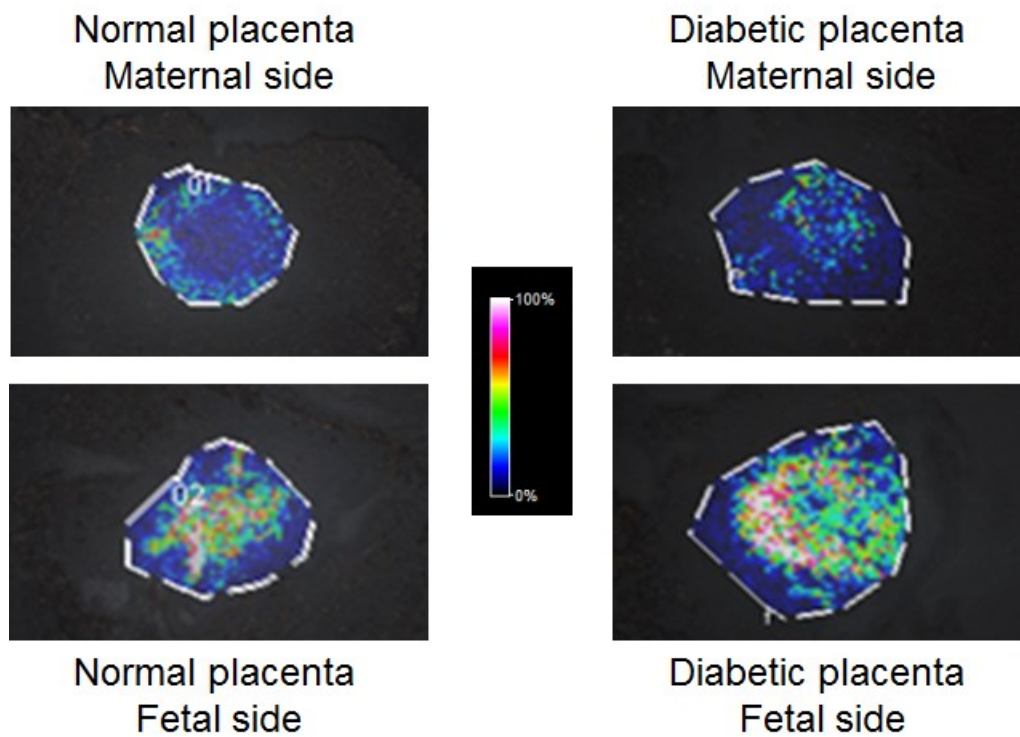


Figura 26: MALDI ion imaging, m/z 30285.

4.3 - Conclusioni

Questo lavoro di ricerca ha permesso di mettere a punto una tecnica robusta e affidabile per la preparazione di campioni di tessuto placentare al fine di eseguire analisi di MALDI *ion imaging*.

I dati ottenuti dimostrano che il pre-trattamento del campione e il metodo di deposizione della matrice sono essenziali in questo tipo di esperimenti e devono essere valutati con cura; da essi dipendono la sensibilità, il numero di specie ioniche rivelabili (in questo caso dovute alla ionizzazione delle proteine tissutali) e la risoluzione spaziale.

Le analisi effettuate sui campioni di placenta hanno permesso di valutare l'espressione proteica nei due versanti, materno e fetale; per alcune specie (es. m/z 21330, m/z 30385 e m/z 45590) è stata determinata una significativa variazione di concentrazione. Al contrario, con questo metodo non è stato possibile riscontrare differenze tra il tessuto placentare sano rispetto a quello proveniente da gravidanze complicate da GDM.

5 – Analisi del proteoma placentare in presenza di GDM

La spettrometria di massa ricopre un ruolo fondamentale nello studio delle proteine; questo è stato possibile grazie all'introduzione di due tecniche di ionizzazione molto sensibili che permettono di analizzare molecole ad alto peso molecolare, quali la ionizzazione electrospray (ESI) e la ionizzazione per desorbimento laser assistita da matrice (MALDI). Oggi, grazie a queste tecniche, è possibile determinare in modo routinario la sequenza amminoacidica di peptidi, la massa di proteine intere, peptidi e complessi proteici, verificare se la struttura primaria di una proteina coincide con quella codificata nel DNA e identificare le possibili modificazioni post-traduzionali. Attualmente, la proteomica basata sulla spettrometria di massa ricorre a due principali approcci sperimentali: la *bottom-up proteomics* e la *top-down proteomics*. Entrambi i metodi permettono di riconoscere le proteine presenti in un campione biologico, percorrendo però, due strade diverse: il primo approccio prevede che la proteina tal quale sia digerita con degli enzimi specifici e identificata basandosi sull'insieme dei peptidi prodotti dalla digestione (*peptide mass fingerprint* - PMF), mentre il secondo approccio prevede il riconoscimento della proteina basandosi sulla misura accurata del peso molecolare ed su esperimenti MS/MS eseguiti sulla specie tal quale. Quest'ultima metodologia permette esclusivamente la caratterizzazione di miscele di proteine semplici (contenenti al massimo due o tre specie), mentre l'approccio *bottom-up* permette l'analisi di campioni contenenti un numero elevato di proteine, anche con concentrazione molto diversa tra loro, in matrici complesse.

Lo scopo di questo studio è la caratterizzazione approfondita del profilo di espressione proteica del tessuto placentare e delle sue possibili variazioni e/o modificazioni in presenza di GDM. Vista la complessità del campione biologico e la strumentazione analitica disponibile si è scelto di eseguire l'analisi con un approccio *bottom-up*, il quale permette di ottenere risultati più robusti e di avere informazioni su un numero maggiore di specie proteiche.

5.1 - Materiali e Metodi

I campioni di placenta umana (10 provenienti da madri sane e 10 provenienti da pazienti affette da GDM) sono stati raccolti subito dopo il secondamento, lavati con soluzione fisiologica (NaCl 9 g/L) e stoccati a -80°C fino al giorno dell'analisi. L'omogenato

è stato ottenuto trattando 1 g di campione di tessuto con 3 mL di buffer di lisi (7 M urea, 2 M tiourea, 3% CHAPS, 20mM Tris, addizionato con gli opportuni inibitori di proteasi) e termostatando il sistema a 0°C. L'omogenato è quindi stato centrifugato (30 minuti a 14000 rpm) per eliminare eventuali residui di tessuto. Il surnatante, contenente le proteine di interesse, è stato quindi trattato con ditiotreitolo e iodoacetamide al fine di ridurre e alchilare i ponti disolfuro tra i residui di cisteina.

Successivamente, le proteine contenute nel surnatante sono state separate per mezzo di elettroforesi bidimensionale. La separazione nella prima dimensione è avvenuta per isoelettrofocalizzazione utilizzando una strip di 17 cm avente un range di pH compreso tra 3 e 10 (ReadyStrip IPG Strip, Biorad) e applicando un prodotto tempo-voltaggio totale di 70000 Vh, usando un sistema Protean i12 IEF System (Biorad). La separazione nella seconda dimensione è avvenuta mediante SDS-PAGE (Protean II XL Cell, Biorad). Il gel elettroforetico è stato quindi sviluppato con Blu di Coomassie colloidale (QC Colloidal Coomassie, Biorad). Per ogni campione, l'analisi è stata eseguita in triplicato.

Ogni gel è stato analizzato con un opportuno software (SameSpot, Progenesis) al fine di allineare gli spot elettroforetici e di valutare statisticamente (t-test, $p < 0.05$) la presenza di differenze nell'espressione proteica tra i campioni provenienti da gestanti sane e i campioni provenienti da pazienti affette da GDM. Gli spot elettroforetici contenenti proteine diversamente espresse sono stati tagliati e sottoposti a digestione triptica. I peptidi ottenuti sono quindi stati separati per mezzo di un sistema UPLC Nano Acquity (Waters Corporation) con a disposizione una colonna cromatografica a fase inversa, modello TRIZAIC nanoTile (Waters Corporation); l'eluizione è avvenuta ad un flusso di 450 nL/min incrementando la concentrazione del solvente B (acetonitrile + 0.1% acido formico) dal 3% al 40% in 30 minuti, usando come solvente A una soluzione di acido formico allo 0.1% in acqua. L'eluato è stato analizzato con uno spettrometro di massa Synapt-MS (Waters Corporation). La configurazione sperimentale prevede una sorgente di ionizzazione nano-ESI e un analizzatore a tempo di volo con reflectron, per la determinazione della massa accurata degli ioni; la frammentazione dei peptidi è stata effettuata in modalità MS^E.

L'identificazione delle proteine di interesse è avvenuta utilizzando i dati acquisiti in modalità MS^E, i quali sono poi stati processati con MASCOT. Sono stati utilizzati i seguenti parametri di ricerca: come database è stato scelto NBCInr (versione luglio 2014), limitando la ricerca alle proteine umane; la specificità enzimatica è stata selezionata sulla tripsina e visto il trattamento del campione è stata impostata come modificazione costante la carbamidometilazione dei residui di cisteina, mentre come modificazione

variabile è stata scelta l'ossidazione dei residui di metionina. Per quanto riguarda i parametri strumentali, invece, è stata impostata una tolleranza massima di 0.2 Da sul valore di massa del precursore e di 0.5 Da per i frammenti.

Per validare e confermare i dati ottenuti con questo metodo, si è scelto di analizzare i campioni di omogenato di tessuto placentare per mezzo di un approccio sperimentale denominato *label-free proteomics*. In questo caso l'omogenato è stato trattato con acetone (-20°C, 2 ore) in proporzione 1:3 al fine di favorire la precipitazione delle proteine in soluzione. Dopo centrifugazione (30 minuti a 14000 rpm), il pellet è stato risolubilizzato con una soluzione di bicarbonato d'ammonio 25 mM e sottoposto a digestione triptica. Il prodotto della digestione è stato analizzato per mezzo di un sistema UPLC Nano Acquity (Waters Corporation) con a disposizione una colonna cromatografica a fase inversa, modello TRIZAIC nanoTile (Waters Corporation) utilizzando le condizioni sperimentali precedentemente descritte; l'eluato è stato analizzato con uno spettrometro di massa Synapt-MS (Waters Corporation). I dati ottenuti sono stati processati nel modo descritto prima, al fine di identificare le specie proteiche contenute nel campione. La determinazione di possibili differenze nell'espressione di una proteina di interesse è stata eseguita valutando l'area dei picchi cromatografici relativi ad almeno tre peptidi provenienti dalla digestione della proteina stessa. Inoltre, se nella miscela proteica si aggiunge una proteina a concentrazione nota, è possibile ottenere informazioni sulla quantità assoluta di una proteina di interesse presente nel campione. L'approccio *label-free* ha il vantaggio di poter lavorare con quantità molto piccole di campione (circa 500 ng di proteina per iniezione cromatografica), non necessita di particolari e costosi marcatori e presenta un intervallo di linearità piuttosto ampio; tuttavia questa metodologia richiede metodi cromatografici robusti e strumentazione costosa, come ad esempio uno spettrometro di massa ad alta risoluzione per la determinazione della massa accurata delle specie ioniche.

5.2 – Risultati e Discussione

L'analisi dell'omogenato di tessuto placentare tramite elettroforesi bidimensionale ha portato a delle mappe proteiche come quella riportata in Figura 27.

L'analisi densitometrica delle immagini acquisite dai gel elettroforetici, ha permesso di identificare diverse specie espresse in modo alterato nel caso di diabete gestazionale. In particolare, considerando come significativa una variazione di un fattore 1.5 (la specie di interesse mostra nel caso del campione proveniente da pazienti con GDM una variazione quantitativa, positiva o negativa, del 50% rispetto alla stessa specie

considerata nel caso di campioni provenienti da soggetti di controllo), sono stati identificati 13 spot elettroforetici sovra-espressi e 16 sotto-espressi nel caso di diabete gestazionale. Le proteine contenute negli spot elettroforetici sono state digerite enzimaticamente e i relativi prodotti sono stati analizzati mediante spettrometria di massa LC-ESI-MS/MS e MALDI-TOF/TOF al fine di identificarle (risultati riportati in Tabella 3 e Tabella 4).

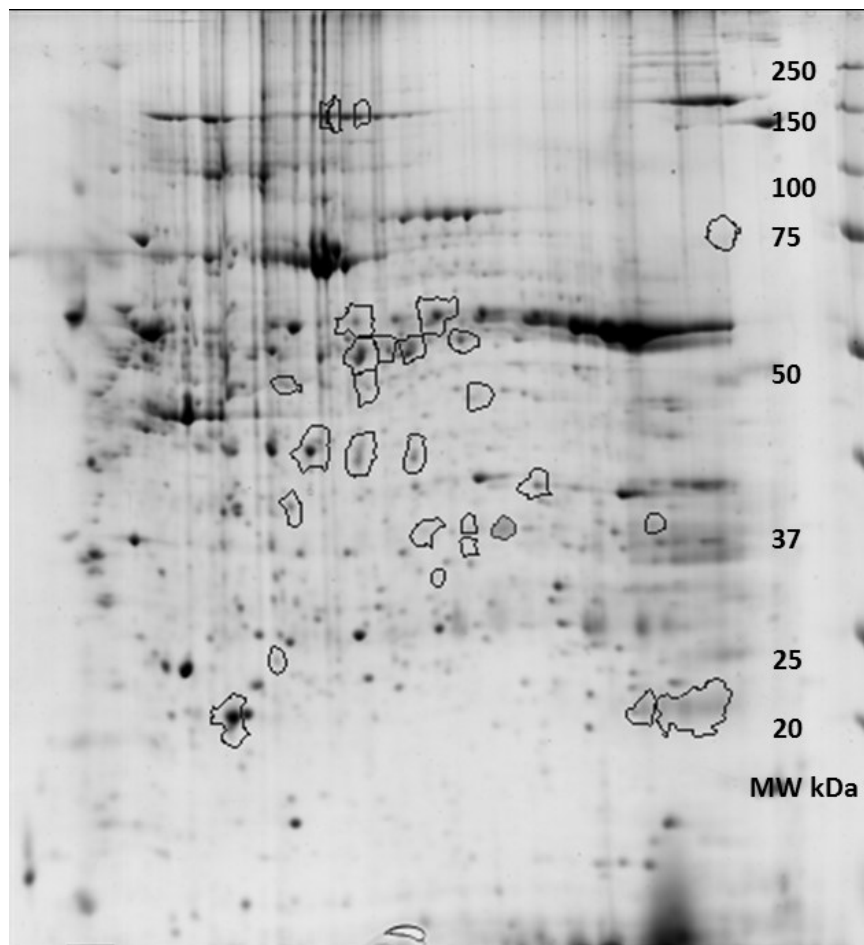


Figura 27: Esempio di gel elettroforetico 2D ottenuto dall'analisi dell'omogenato di placenta.

In uno studio precedente, Liu et. *al* [6] hanno dimostrato grazie alla spettrometria di massa MALDI-TOF/TOF che la catena alfa e beta del fibrinogeno risultano essere sotto-esprese nel tessuto placentare proveniente da gestanti GDM; i dati ottenuti nella presente indagine confermano questi risultati (Figura 28).

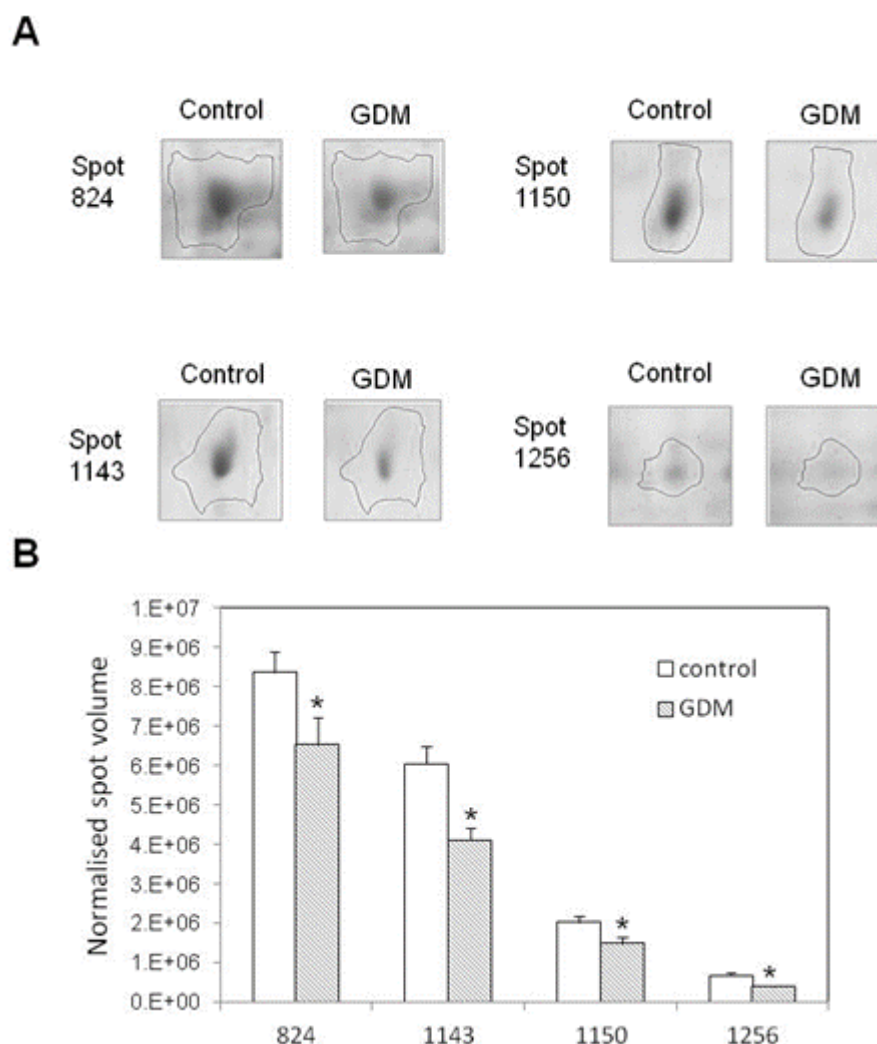


Figura 28: Sotto-espressione della catena beta del fibrinogeno nelle placente GDM. Esempio di spot elettroforetici contenenti la catena beta del fibrinogeno (A) e corrispondente analisi densitometrica (B).

Tuttavia, l'approccio LC-ESI-MS/MS ha permesso di identificare più di una specie proteica all'interno dello stesso spot elettroforetico e di conseguenza risulta difficile stabilire per il singolo spot quale sia la proteina che provoca un'alterazione dell'espressione. In parte, l'indice emPAI (Tabella 3 e Tabella 4), proporzionale al numero di moli di proteina contenuta in una miscela proteica complessa [67], permette di stimare quale sia la proteina con concentrazione maggiore all'interno dello stesso spot elettroforetico; quest'ultima, in principio, dovrebbe essere causa principale dell'alterazione riportata dallo spot elettroforetico, misurata mediante analisi densitometrica. Di conseguenza, considerando l'indice emPAI è possibile formulare delle ipotesi, ma è discutibile l'ottenimento di una misura quantitativa accurata. Attraverso le analisi basate sull'elettroforesi bidimensionale è stato comunque possibile ottenere dei risultati significativi riguardanti proteine quali la catena beta del fibrinogeno, sotto-

espressa in presenza di GDM (Figura 28), e la somatomammotropina corionica, la quale dimostra una concentrazione maggiore nelle placenti diabetiche. Inoltre, la catena beta del fibrinogeno è stata identificata in più di uno spot elettroforetico, probabilmente a causa della presenza di diverse isoforme o di possibili modificazioni dei residui amminoacidici (quest'ultima ipotesi non è stata confermata dai dati di spettrometria di massa).

Tabella 3: Risultati riportanti l'identificazione delle proteine contenute negli spot elettroforetici che mostrano una sotto-espressione nel caso di tessuto placentare GDM rispetto ai controlli, ottenuti per mezzo di LC-ESI-MS/MS e MALDI-MS/MS. (NR: Not Recognised).

#	Fold	Accession*	Protein Description	Mascot Score LC-MS/MS	emPAI	% Coverage LC-MS/MS	% Coverage MALDI-MS	Mascot Score MALDI-MS
824	1.28	P02675	Fibrinogen beta chain	1033	1.66	46.84	49.7	140
886	1.40	P02675	Fibrinogen beta chain	861	2.81	40.94	-	-
		Q9GZM7	Tubulointerstitial nephritis antigen like	95	0.14	10.92		
		Q9NVA2	Septin 11	42	0.34	4.43		
910	1.31	P02675	Fibrinogen beta chain	827	1.93	43.18	31.6	86
		Q9GZM7	Tubulointerstitial nephritis antigen like	264	0.61	33.19	NR	NR
904	1.26	P02675	Fibrinogen beta chain	448	0.92	26.07	32.4	120
		Q9GZM7	Tubulointerstitial nephritis antigen like	173	0.26	9.85	NR	NR
919	1.23	P02675	Fibrinogen beta chain	1212	2.88	43.18	-	-
		Q9GZM7	Tubulointerstitial nephritis antigen like	411	1.04	33.19		
		P36957	Dihydrolipoyllysine residue succinyltransferase component of 2 oxoglutarate dehydrogenase complex	149	0.3	8.17		
		Q13228	Selenium binding protein 1	35	0.2	7.84		
1010	1.26	P02675	Fibrinogen beta chain	803	2.58	42.97	-	-
		P02768	Serum albumin	68	0.32	9.52		
		P02679	Fibrinogen gamma chain	64	0.16	7.50		
1143	1.46	P02675	Fibrinogen beta chain	934	2.28	37.88	-	-
1150	1.35	P02675	Fibrinogen beta chain	541	1.02	25.66	24.4	60
1253	1.49	P02671	Fibrinogen alpha chain	419	0.7	9.24	-	-
		P04083	Annexin A1	149	0.44	15.61		
1256	1.71	P02675	Fibrinogen beta chain	406	0.97	24.24	-	-
1260	1.44	P02675	Fibrinogen beta chain	257	0.66	9.36	NR	NR
		Q15006	Tetrancopeptide repeat protein 35	154	0.36	11.11	NR	NR
1342	1.34	P02675	Fibrinogen beta chain	71	0.12	7.54	NR	NR
		P02768	Serum albumin	49	0.19	7.72	NR	NR
1693	1.38	P02675	Fibrinogen beta chain	363	0.66	25.25	-	-
		P60709	Actin cytoplasmic 1	286	0.57	23.47		
		P62736	Actin aortic smooth muscle	282	0.7	21.75		
1697	1.33	P02675	Fibrinogen beta chain	508	1.08	27.09	31.4	83
1700	1.44	P37802	Transgelin 2	123	1.3	23.12	-	-
		Q01995	Transgelin	61	0.32	16.92		
		P02671	Fibrinogen alpha chain	266	0.4	6.93		
		P02675	Fibrinogen beta chain	158	0.25	7.13		
		P30086	Phosphatidylethanolamine binding protein 1	82	0.55	12.30		
1031	1.31	P02675	Fibrinogen beta chain	330	0.47	16.09	NR	NR
1701	1.42	P02671	Fibrinogen alpha chain	174	0.4	4.85		
		P02675	Fibrinogen beta chain	125	0.18	9.78		
		P30086	Phosphatidylethanolamine binding protein 1	307	1.8	40.11		

Tabella 4: Risultati riportanti l'identificazione delle proteine contenute negli spot elettroforetici che mostrano una sovra-espressione nel caso di tessuto placentare GDM rispetto ai controlli, ottenuti per mezzo di LC-ESI-MS/MS e MALDI-MS/MS. (NR: Not Recognised).

#	Fold	Accession*	Protein Description	Mascot Score LC-MS/MS	emPAI	% Coverage LC-MS/MS	% Coverage MALDI-MS	Mascot Score MALDI-MS
283	1.61	P12110	Collagen alpha 2 VI chain	418	0.42	12.46	21.0	61
282	1.43	P12110	Collagen alpha 2 VI chain	403	0.42	10.89	-	-
		P02768	Serum albumin	245	0.7	20.53		
284	1.50	P12110	Collagen alpha 2 VI chain	394	0.5	11.68	NR	NR
		Q9Y6N6	Laminin subunit gamma 3	84	0.09	3.68	NR	NR
1228	1.49	P07195	L lactate dehydrogenase B chain	359	1.36	30.53	-	-
		O00764	Pyridoxal kinase	177	0.57	13.46		
1283	1.46	O15144	Actin related protein 2 3 complex subunit 2	42	0.1	6.67	-	-
1483	1.20	P28070	Proteasome subunit beta type 4	230	1.08	23.48	28.8	38
		Q9UKL6	Phosphatidylcholine transfer protein	20	0.15	8.88	NR	NR
1695	1.22	P0C0L4	Complement C4 A	149	0.09	2.98	NR	NR

Al fine di eseguire un'analisi più approfondita e di poter confrontare i risultati con quelli ottenuti da Liu et al. [6], alcuni campioni di digerito, provenienti da alcuni degli spot elettroforetici di interesse, sono stati analizzati mediante spettrometria MALDI-TOF, in modo da ottenere i relativi dati PMF (*peptide mass fingerprint*), e alcuni dei peptidi sono stati sottoposti ad analisi MS/MS. L'interpretazione degli spettri mediante il software MASCOT (basato sul database SwissProt, versione Ottobre 2015), ha permesso di confermare l'identità per la maggioranza delle proteine. Per quanto riguarda l'analisi MALDI-MS/MS è stato possibile identificare un'unica specie proteica per spot elettroforetico, invece di più proteine come del caso dell'analisi LC-ESI-MS/MS; risultati simili sono riscontrabili nel lavoro di Liu et al. [6]. E' da notare che i valori di Coverage [%] ottenuti per le analisi LC-ESI-MS/MS e MALDI-MS sono comparabili, mentre i valori di Mascot Score sono solitamente minori nel caso dell'analisi PMF. In effetti la tecnica LC-ESI-MS/MS permette di ottenere un numero maggiore di dati MS/MS rispetto alla tecnica MALDI-MS/MS, dove la qualità degli spettri di frammentazione dipende direttamente dall'abbondanza degli ioni che caratterizzano lo spettro PMF (e quindi da possibili effetti di soppressione della corrente ionica) e dall'efficienza di isolamento degli ioni precursori negli esperimenti MS/MS. Poiché il valore di Mascot Score dipende anche da questi parametri, i metodi LC-MS/MS solitamente permettono di ottenere valori di score più elevati se confrontati con i corrispondenti approcci MALDI-MS/MS. Anche la concentrazione delle specie proteiche all'interno dello spot elettroforetico influisce sulla possibilità di ottenere un'identificazione corretta attraverso la tecnica MALDI-MS/MS. Se si considera il valore dell'emPAI index come una possibile stima della concentrazione in moli di una proteina in uno spot elettroforetico,

si nota che è possibile ottenere un'identificazione corretta e statisticamente significativa solamente per le specie proteiche che hanno un valore di *emPAI index* maggiore di 0.9. In conclusione, i dati ottenuti dall'analisi del tessuto placentare per mezzo di elettroforesi bidimensionale accoppiata a spettrometria di massa LC-ESI-MS/MS e MALDI-MS/MS presentano delle problematiche. In particolare, grazie alla fase cromatografica implementata nell'analisi nanoESI-MS/MS è stato possibile ridurre la complessità del campione iniziale, in confronto alla metodica MALDI-MS/MS che non prevede nessuna separazione cromatografica prima dell'analisi

Per superare le limitazioni dell'approccio *gel-based*, è stato quindi deciso di analizzare l'omogenato di tessuto placentare attraverso un metodo *gel-free*. La quantificazione e identificazione delle proteine si basa sulla digestione enzimatica dell'intero contenuto proteico dell'omogenato, seguita da un'analisi *label-free* per mezzo di spettrometria di massa nanoLC-ESI-MS^E. Questo metodo prevede un'iniziale separazione cromatografica dei prodotti di digestione, seguita dall'analisi per mezzo di spettrometria di massa ad alta risoluzione dei prodotti eluiti. Con questo approccio, l'analisi allo spettrometro di massa è condotta alternando con elevata frequenza l'acquisizione di spettri di massa a bassa e alta energia di collisione, in modo da generare una grande quantità di dati di frammentazione ad elevata accuratezza di massa. Gli ioni precursore sono successivamente correlati agli ioni prodotto, che a loro volta sono utilizzati per l'identificazione delle specie proteiche, mentre i dati provenienti dall'integrazione delle aree dei picchi cromatografici degli ioni precursore sono utilizzati per la quantificazione delle proteine stesse. Questo metodo ha permesso di identificare e quantificare 159 proteine, delle quali 10 risultano sovra-espresse (Tabella 5) nel caso di campioni provenienti da gestanti con diabete gestazionale rispetto ai controlli e 9 risultano sotto-esprese (Tabella 6). Alcune delle proteine identificate con questo metodo, come la catena beta del fibrinogeno e la somatomammotropina corionica, confermano i dati ottenuti con l'approccio *gel-based*. Inoltre, la metodica *gel-free* ha permesso di identificare altre specie proteiche che risultano alterate in presenza di GDM. Quindi, l'approccio *gel-free* fornisce in generale informazioni più complete e significative rispetto al metodo *gel-based*, che risulta essere anche molto più costoso, dispendioso in termini di tempo e assolutamente non automatizzabile.

Tabella 5: Proteine sovra-esprese nel caso di tessuto placentare GDM rispetto ai controlli, identificate mediante LC-MS^E.

Description	Accession	Score ^a	Fold change	Peptide count	Peptides used for quantitation	% Coverage
Periostin	Q15063	22.0807	1.369	4	4	9.20
Ig gamma-2 chain C region	P01859	68.6956	1.342	7	7	31.60
Chorionic somatomammotropin hormone	P01243	83.8715	1.290	8	8	49.74
Moesin	P26038	33.9726	1.266	5	5	8.51
Heat shock-related 70 kDa protein 2	P54652	78.1285	1.245	12	12	21.75
Triosephosphate isomerase	P60174	44.3923	1.235	6	6	36.01
Protein disulfide-isomerase	P07237	122.5778	1.231	15	15	35.03
Galectin-1	P09382	60.7725	1.225	7	7	58.96
Vimentin	P08670	351.3324	1.218	34	34	64.09
14-3-3 protein beta/alpha	P31946	66.0787	1.218	6	6	29.39

Tabella 6: Proteine sotto-esprese nel caso di tessuto placentare GDM rispetto ai controlli, identificate mediante LC-MS^E.

Description	Accession	Score	Fold change	Peptide count	Peptides used for quantitation	% Coverage
Alpha-1-antitrypsin	P01009	215.7	1.26	22	21	49.49
Alpha-2-antiplasmin	P08697	11.5	1.35	2	2	7.97
Apolipoprotein A-I	P02647	116.8	1.13	13	13	54.22
Clusterin	P10909	25	1.35	4	4	14.29
Fibrinogen alpha chain	P02671	384.4	1.39	41	41	37.30
Fibrinogen beta chain	P02675	506	1.32	47	47	76.29
Fibrinogen gamma chain	P02679	442.7	1.37	40	40	73.77
Ig gamma-1 chain C region	P01857	115.1	1.21	10	4	43.64
Tubulointerstitial nephritis antigen-like	Q9GZM7	13.2	1.21	2	2	6.50
Vitronectin	P04004	48.6	1.20	7	7	18.09

5.3 - Biochimica delle proteine placentari

Dal punto di vista biologico e clinico, le proteine che mostrano un'alterata espressione sono specie presenti all'interno delle cellule della placenta, in particolare nel citoplasma e negli organelli (Figura 29A), coinvolte nella comunicazione cellulare, processi catabolici e sviluppo/differenziazione cellulare (Figura 29B).

La periostina, sovra-espressa di un fattore 1.4 nei campioni patologici, è considerata una proteina della matrice cellulare. Le proteine che fanno parte di questa famiglia risultano coinvolte nella regolazione delle funzioni cellulari, delle interazioni cellula-matrice e sono in grado di modulare l'espressione di citochine, proteasi e fattori di crescita [68]. Una delle funzioni imputabili all'azione della periostina è quella di favorire il processo di migrazione e adesione cellulare, tantoché questa specie proteica risulta sovra-espressa in molti tipi di tumori, in particolare durante la fase di metastatizzazione. La periostina è espressa anche durante tutta la gravidanza, sia nel

plasma materno che nel tessuto placentare, poiché favorisce l'impianto della blastocisti e la placentazione. Uno studio condotto su casi di aborto spontaneo durante la dodicesima settimana gestazionale ha infatti evidenziato una diminuzione della periostina plasmatica nelle pazienti rispetto ai casi di gravidanza non complicata [69]. A termine gravidanza, una sovra-espressione della periostina è stata riscontrata in pazienti obese, in gestanti affette da preeclampsia [70] e nei casi di insufficienza placentare materna (ovvero quando si verifica un ridotto scambio di sostanze nutritive, gas e altre molecole tra la parte materna e fetale della placenta) [71]. Per quanto riguarda il diabete gestazionale non era mai stata evidenziata una sovra-espressione di questa specie proteica; si può comunque ipotizzare che la sovra-espressione della periostina sia riconducibile ad un'alterazione della funzionalità della placenta, in particolare durante l'ultimo trimestre di gravidanza.

La somatomammotropina corionica od ormone lattogeno placentare (HPL) è un ormone prodotto dalla placenta durante tutta la gravidanza. Nell'ultimo trimestre, valori ematici o urinari elevati di questa proteina sono indice di GDM o diabete mellito di tipo 2. L'HPL, infatti, stimola la lipolisi dei trigliceridi, causa a sua volta di un aumento della concentrazione plasmatica di acidi grassi liberi; questi ultimi interferiscono con l'azione dell'insulina. Questo comporta un aumento della resistenza all'insulina e nel caso l'HPL sia in concentrazioni maggiori di quelle fisiologiche, si ha l'insorgenza di intolleranza ai carboidrati e nei casi più severi sviluppo di GDM [72].

Galectin-1 è una proteina della matrice cellulare coinvolta nei processi di apoptosi, proliferazione cellulare e differenziazione; la sua disregolazione è già nota comportare aborti spontanei e preeclampsia. Recentemente è stata studiata la sua distribuzione sul tessuto placentare in presenza di diabete gestazionale con tecniche di immunofluorescenza. Le indagini hanno evidenziato un accumulo della specie proteica nella placenta, in presenza di GDM, e una diminuzione della sua concentrazione plasmatica [73]. L'elettroforesi bidimensionale e l'approccio *label-free* confermano la sovra-espressione di questa specie, della quale, però, è ancora necessario capire con precisione i meccanismi molecolari in cui è coinvolta e la relazione specifica con il diabete gestazionale.

Dai dati ottenuti per il tessuto placentare si evince, inoltre, una riduzione della concentrazione di fibrinogeno e di alfa-2-antiplasmina (inibitore della fibrinolisi) e pertanto il processo di fibrinolisi risulta aumentato, probabilmente in modo da

58

controbilanciare lo stato pro-trombotico riscontrabile a carico del sistema circolatorio in caso di GDM.

Conclusioni circa lo stato infiammatorio tipico del GDM, invece, sono più difficili da valutare; in effetti, l'aumento della concentrazione di *Galectin-1* (proteina tra le cui funzioni è presente la riduzione dell'infiammazione) e di selenio (dato ottenuto grazie alle analisi di metallomica, Capitolo 7) farebbero pensare che nella placenta diabetica si instaurino dei meccanismi atti alla riduzione dell'infiammazione; tuttavia questa ipotesi non è del tutto confermata a causa della diminuzione dei livelli di alfa-1-antitripsina (con funzione anti-infiammatoria e immunomodulatrice) e dell'aumento della concentrazione di *14-3-3 protein beta/alpha* (proteina tra le cui funzioni è riportata la traslocazione di BAD (*Bcl-2-associated death promoter*) nei mitocondri, per favorire quindi l'apoptosi, ma anche la traslocazione di GLUT4 (*glucose transporter type 4*) sulla membrana plasmatica per l'internalizzazione del glucosio).

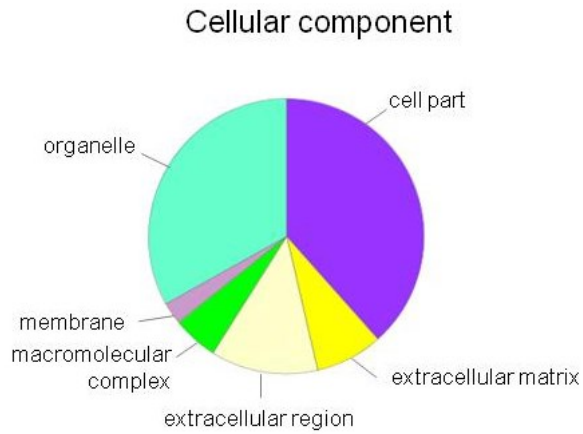
Quindi, considerando anche la variazione di espressione delle altre proteine identificate mediante LC-MS^E si può ipotizzare che la placenta sia in grado di attivare dei processi molecolari che permettano di compensare le alterazioni metaboliche provocate dal GDM nella madre, quali lo stato pro-trombotico, l'aumento dello stato infiammatorio e l'aumento dei livelli di glicemia. Inoltre, le analisi effettuate hanno permesso di identificare due proteine, la catena beta del fibrinogeno e la somatomammotropina corionica (prodotta dai sinciziotrofoblasti placentari e responsabile della diminuzione della sensibilità all'insulina e dell'aumento della lipolisi nella madre), come possibili biomarcatori per il GDM in future applicazioni cliniche.

5.4 - Conclusioni

Lo studio di proteomica effettuato sul tessuto placentare ha permesso di evidenziare delle specie proteiche sovra-esprese e sotto-esprese nel caso in cui la gravidanza sia complicata da GDM. Le proteine di interesse sono coinvolte in importanti processi di regolazione delle funzioni cellulari, come ad esempio l'apoptosi. Per molte di queste specie è necessario approfondire la loro funzione e come questa sia relazionabile con i processi biologici che favoriscono lo sviluppo del GDM e con gli effetti avversi sulla salute della madre e del bimbo causati dallo stato iperglicemico in gravidanza (ad esempio si deve capire se c'è una relazione tra l'espressione di queste proteine con l'insorgere di malattie cardiovascolari o metaboliche). Inoltre, è in corso un'indagine analoga su cellule epiteliali provenienti da cordone ombelicale, al fine di valutare se i

cambiamenti a livello proteico notati nella placenta sono riscontrabili anche nella circolazione sanguigna fetale.

A



B

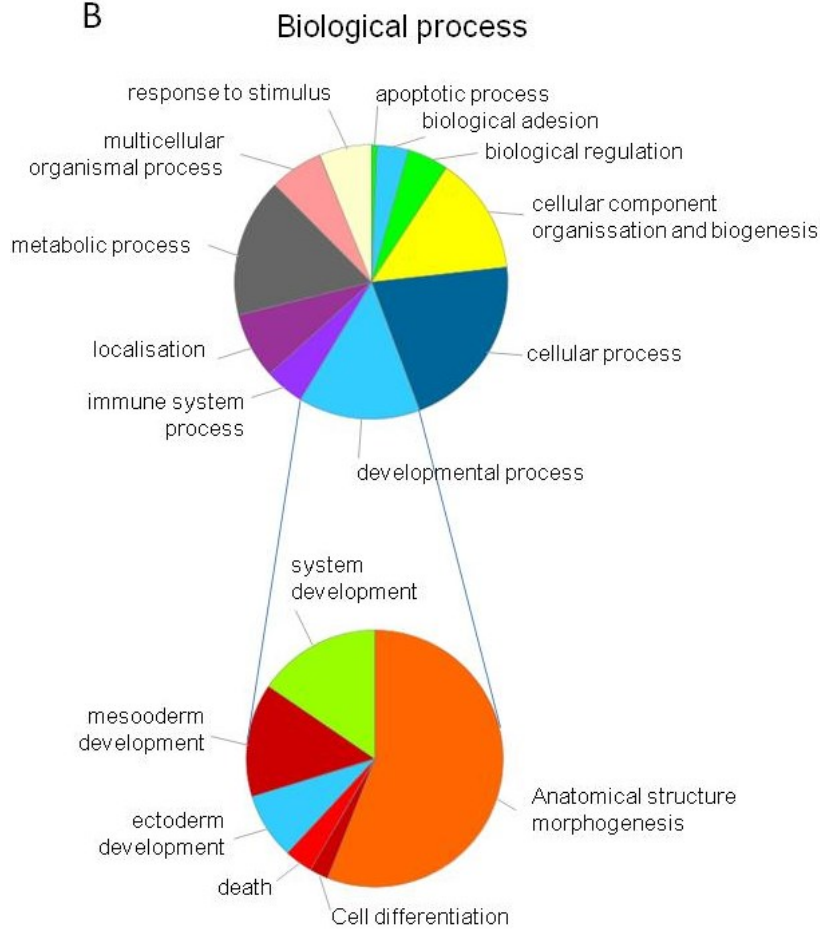


Figura 29: Analisi GO (*Gene Ontology*) delle proteine identificate nel tessuto placentare per mezzo di LC-MSE, classificate in base al sito cellulare in cui sono espresse (A) e in base alla relativa funzione biologica (B).

6 – Analisi del profilo peptico e proteico di linfociti da sangue cordonale in presenza di GDM

Studi di proteomica sulla placenta umana hanno chiaramente evidenziato delle alterazioni significative nell'espressione di alcune proteine in presenza di diabete gestazionale. Le specie proteiche di interesse sono coinvolte in importanti processi biologici, quali la coagulazione e la fibrinolisi, l'infiammazione, l'apoptosi e il trasporto di glucosio. Sebbene la placenta sia un organo prettamente fetale, risulta di interesse valutare eventuali modificazioni biochimiche anche a livello del feto, in modo da evidenziare quali siano i processi biologici fetali alterati in caso di GDM e quale sia la relazione con lo stato iperglicemico materno.

Il presente studio ha lo scopo di determinare possibili variazioni a livello proteico e peptidico in linfociti estratti da sangue cordonale in presenza di GDM e di evidenziare la presenza di bio-marcatore pro-apoptotici. Vista la difficoltà nel reperire campioni biologici fetali, si è deciso di concentrare la propria attenzione sui linfociti, che risultano essere facilmente estraibili da sangue intero cordonale, raccolto subito dopo il parto, senza provocare dolore al neonato e senza utilizzare metodi invasivi. I linfociti, comunque, sono cellule che potenzialmente contengono molte informazioni e sono sensibili allo stato fisio-patologico del donatore, come già dimostrato da altri studi sul diabete in gravidanza e su patologie metaboliche e neurologiche [74].

6.1 - Materiali e Metodi

Il presente studio ha coinvolto 20 gestanti sane e 20 gestanti affette da diabete gestazionale. Tutte le partecipanti avevano un'età compresa tra i 18 e i 45 anni, non fumatrici e non presentavano sintomi di ipertensione o di insufficienza renale. La diagnosi di diabete gestazionale è stata effettuata mediante un test OGTT (oral glucose tolerance test) con 75 g di glucosio tenendo in considerazione, come valori di riferimento, quelli riportati nelle Linee Guida Nazionali [22].

I campioni di sangue intero cordonale, necessari per il recupero delle cellule linfocitarie, sono stati ottenuti subito dopo il secondamento mediante prelievo venoso dal funicolo ombelicale e raccolti in provette contenenti EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) come anticoagulante. I campioni raccolti sono stati stoccati

a -80°C fino al giorno del processamento. Il giorno dell'analisi, i campioni di sangue intero sono stati diluiti con soluzione salina (PBS), contenente EDTA in concentrazione 2 mM, e sottoposti a centrifugazione in gradiente di densità (800g, 20 min) utilizzando il mezzo Lympholyte (Cedarlane). I linfociti ottenuti sono stati quindi lavati con PBS e risospesi (10^7 cellule/mL) nel buffer di lisi, composto da 10 mM sodio fosfato, 0.1% Triton, 1 mM PMSF (*phenylmethanesulfonyl fluoride*). I campioni sono stati sonicati due volte per 10 min a 0°C e centrifugati a 13000g per 5 minuti, recuperando poi il surnatante. Le proteine contenute nel surnatante sono state quindi fatte precipitare con acetone freddo (200 μ L di surnatante e 800 μ L di acetone) per 4 ore a -20°C; quindi si centrifuga a 13000g per 5 min e si recupera il pellet.

Per l'analisi MALDI-MS, il pellet è stato risospeso in 50 μ L di H₂O + 0.1% TFA e diluito 1:1 con una soluzione 50 mM di ammonio bicarbonato. La soluzione così ottenuta è addizionata alla soluzione di matrice. In particolare, per analizzare i peptidi si utilizza HCCA (acido α -ciano-4-idrossicinnamico), mentre per analizzare specie proteiche a più alto peso molecolare si usa come matrice l'acido sinapinico.

L'analisi elettroforetica del lisato cellulare è avvenuta mediante SDS-PAGE (su gel al 10% di acrilammide) (Mini-PROTEAN Tetra Cell System, Biorad). Il gel elettroforetico è stato quindi sviluppato con Blu di Coomassie colloidale (QC Colloidal Coomassie, Biorad). Per ogni campione, l'analisi è stata eseguita in triplicato. Ogni gel è stato analizzato con un opportuno software (GelAnalyzer, versione 2010a) al fine di allineare le bande elettroforetiche e di valutare statisticamente (t-test, $p < 0.05$) la presenza di differenze nell'espressione proteica tra i campioni provenienti da soggetti di controllo e campioni provenienti da pazienti affetti da GDM. Le bande elettroforetiche contenenti proteine diversamente espresse sono state tagliate e sottoposte a digestione triptica; in breve le specie proteiche presenti nella banda elettroforetica sono state ridotte con ditiotreitolo, alchilate con iodoacetamide e digerite con tripsina per 24 ore. I prodotti della digestione sono quindi stati analizzati con lo spettrometro MALDI usando come matrice HCCA (10 mg/mL in H₂O/ACN 50:50 + 0.1% TFA); la sequenza amminoacidica dei peptidi è stata ottenuta per mezzo di esperimenti collisionali (MS/MS). I dati PMF e quelli acquisiti in modalità MS/MS sono stati processati con il software MASCOT, utilizzando i seguenti parametri: come database è stato scelto SwissProt (versione luglio 2015), limitando la ricerca alle proteine umane; la specificità enzimatica è stata selezionata sulla tripsina e visto il trattamento del campione è stata impostata come modificazione costante la carbamidometilazione dei residui di cisteina, mentre come modificazione variabile è stata scelta l'ossidazione dei residui di metionina. Per quanto

riguarda i parametri strumentali, invece, è stata impostata una tolleranza massima di 0.2 Da sul valore di massa del precursore e di 1.0 Da per i frammenti.

6.2 - Risultati e Discussione

Le analisi del lisato per mezzo di spettrometria di massa MALDI-MS hanno permesso di ottenere i profili peptidi e proteici dei linfociti estratti da sangue cordonale, mentre l'analisi statistica effettuata sui relativi dati ha evidenziato le specie molecolari con alterata espressione nel caso di campioni provenienti da neonati con madre affetta da GDM.

In Figura 30 è riportato un confronto tra gli spettri di massa MALDI-TOF, acquisiti nell'intervallo di m/z 1200-6000, della frazione peptidica del lisato di cellule linfocitarie provenienti da un campione di controllo e da un campione GDM, come esempio.

I campioni in esame sono stati analizzati singolarmente in triplicato. Dagli spettri di massa sono stati estratti, per ogni singolo valore di m/z , l'intensità del relativo picco ed è stata calcolata l'abbondanza assoluta. Quindi, sono state calcolate le medie e le relative deviazioni standard per ogni valore di m/z considerando due gruppi, quello dei campioni di controllo e quello dei campioni provenienti da neonati con madre affetta da GDM. In Figura 31 sono riportati i risultati ottenuti, limitatamente a quei valori di m/z che mostravano una differenza significativa ($p < 0.05$) tra i due gruppi. In particolare le specie peptidiche con valori di m/z 1345.8 e 4961.8 risultano sovra-esprese nei campioni patologici, mentre le specie con m/z 1275.7, 1388.8, 1502.8, 2529.2, 2763.4 risultano sotto-esprese.

Per caratterizzare la sequenza amminoacidica di questi peptidi, sono stati eseguiti degli esperimenti di frammentazione MALDI-TOF/TOF. A causa dell'alto contenuto di sali e dell'intensità non adeguata di alcune delle specie analizzate, l'unico spettro di frammentazione che ha permesso l'identificazione del peptide di provenienza è quello relativo al valore di m/z 4961.8. Il peptide in questione risulta essere un frammento proteolitico originatosi *in vivo* della specie proteica identificata come Semaforina 4G, la quale risulta essere coinvolta nei meccanismi di proliferazione cellulare.

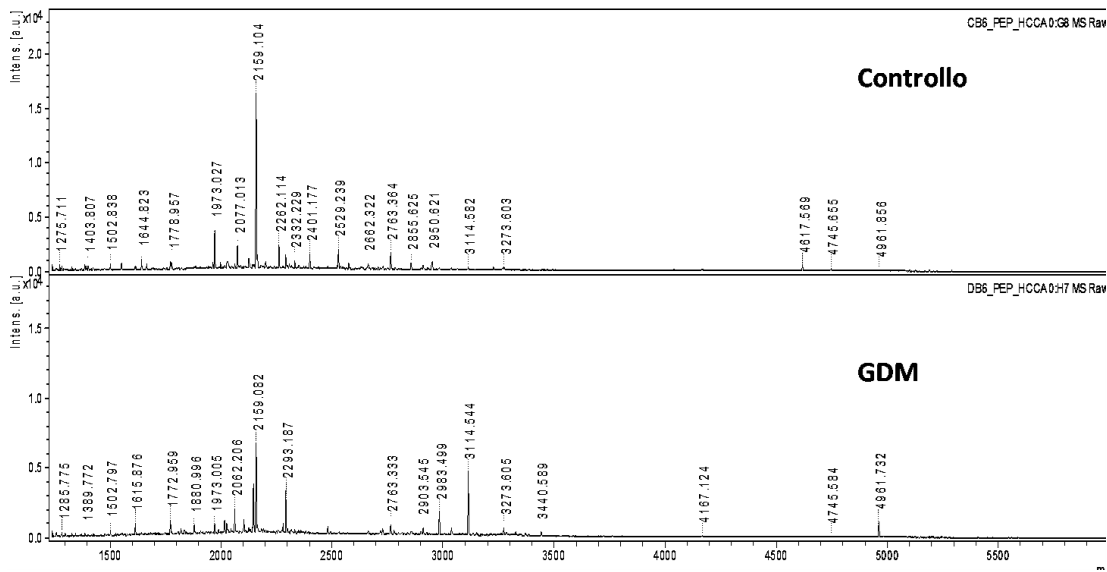


Figura 30: Confronto tra gli spettri di massa MALDI-TOF della frazione peptidica ottenuti da campioni di controllo e campioni GDM.

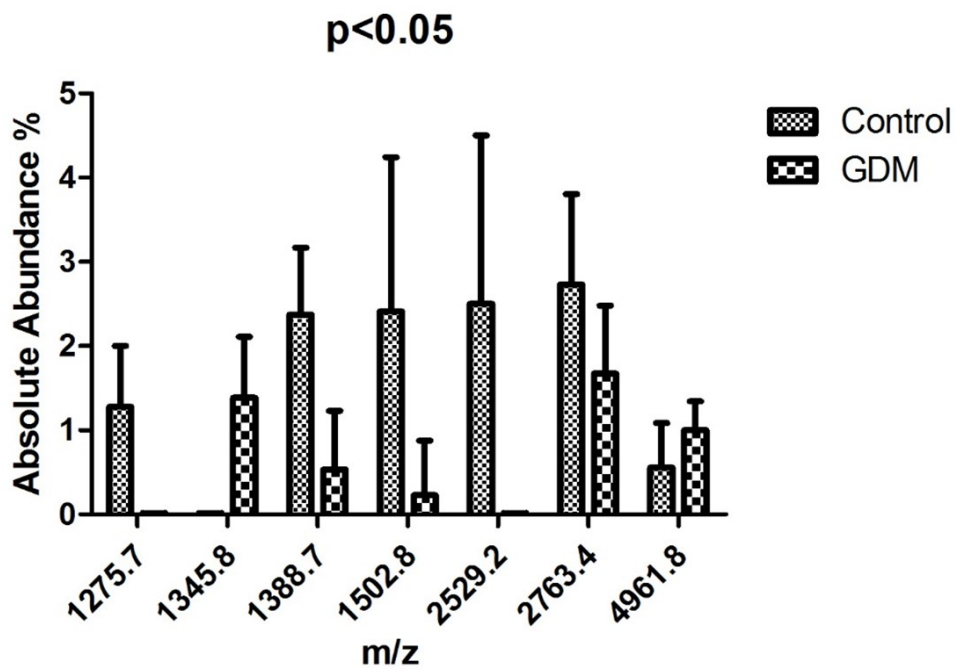


Figura 31: In istogramma, per ogni valore di m/z si riporta la media dell'abbondanza assoluta con la relativa deviazione standard, ottenuta per il gruppo dei campioni di controllo e il gruppo dei campioni provenienti da pazienti con GDM. Sono riportate solo le specie che mostravano una differenza significativa (p value < 0.05).

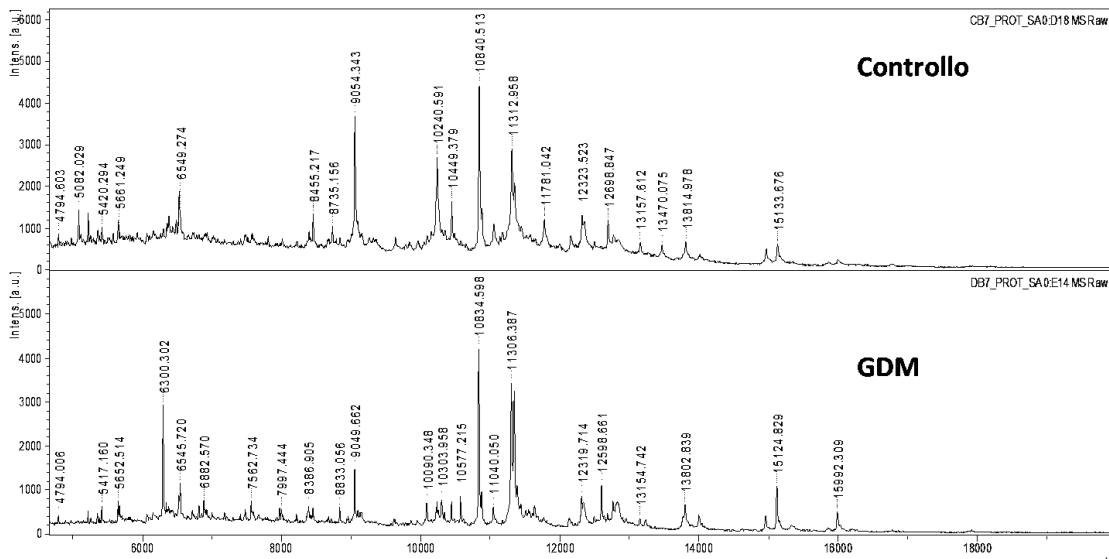


Figura 32: Confronto tra gli spettri di massa MALDI-TOF della frazione proteica ottenuti da campioni di controllo e campioni GDM.

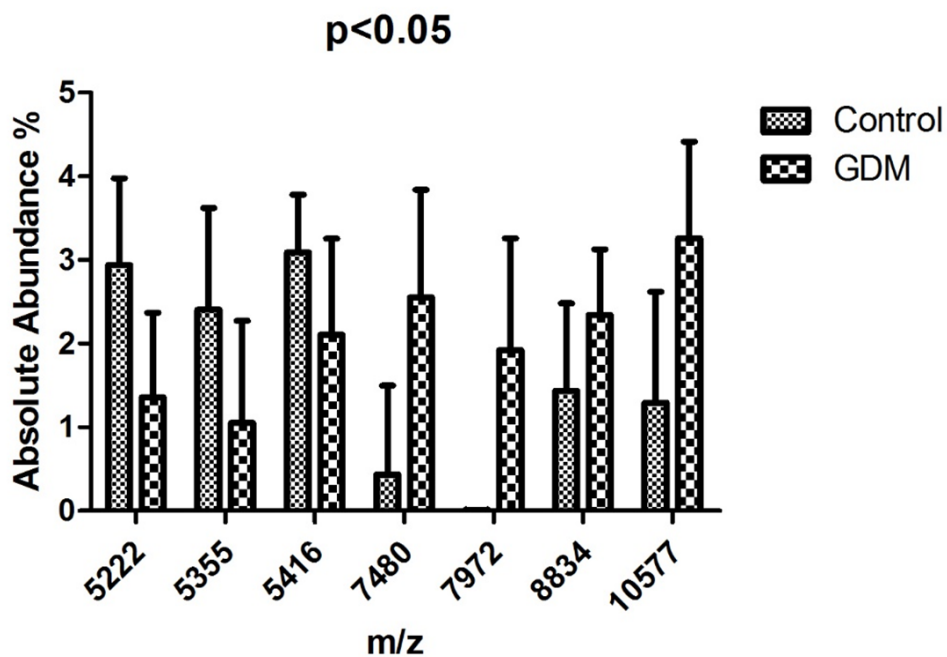


Figura 33: In istogramma, per ogni valore di m/z si riporta la media dell'abbondanza assoluta con la relativa deviazione standard, ottenuta per il gruppo dei campioni di controllo e il gruppo dei campioni provenienti da pazienti con GDM. Sono riportate solo le specie che mostravano una differenza significativa (p value < 0.05).

Inoltre, in Figura 32 è riportato il confronto tra gli spettri di massa MALDI-TOF, acquisiti nell'intervallo di m/z 4500-20000, della frazione proteica del lisato di cellule linfocitarie provenienti da un campione di controllo e da un campione GDM, come esempio.

Anche in questo caso, l'analisi statistica riportata in Figura 33, ha messo in evidenza delle specie molecolari con alterata espressione, in particolare risultano sovra-esprese le specie con m/z 7480, 7972, 8834 e 10577, mentre le specie con m/z 5222, 5355 e 5416 sono sotto-esprese nei campioni provenienti da soggetti affetti da GDM.

Un'ulteriore analisi statistica dei dati è stata ottenuta attraverso PCA (*Principal Component Analysis*), i cui risultati sono schematizzati in Figura 34. Come si può notare, sia per l'analisi dei peptidi (Figura 34A) che per le specie proteiche (Figura 34B) risultano presenti due gruppi ben distinti, costituiti solamente da pazienti GDM o controlli; pertanto è possibile ricavare le variabili (ovvero i valori di m/z) che sono discriminanti nell'identificazione dei campioni di cellule linfocitarie provenienti da neonati con madre affetta da GDM o da neonati sani. Per l'analisi dei peptidi i valori di m/z discriminanti sono 1275.7, 1345.8, 1388.7, 1502.8, 2529.2, 2062.2 e 4961.8, mentre per l'analisi della frazione proteica i valori di m/z che mostrano un'alterazione significativa tra i due gruppi sono 5082, 5222, 5356, 7480, 7973, 10577.

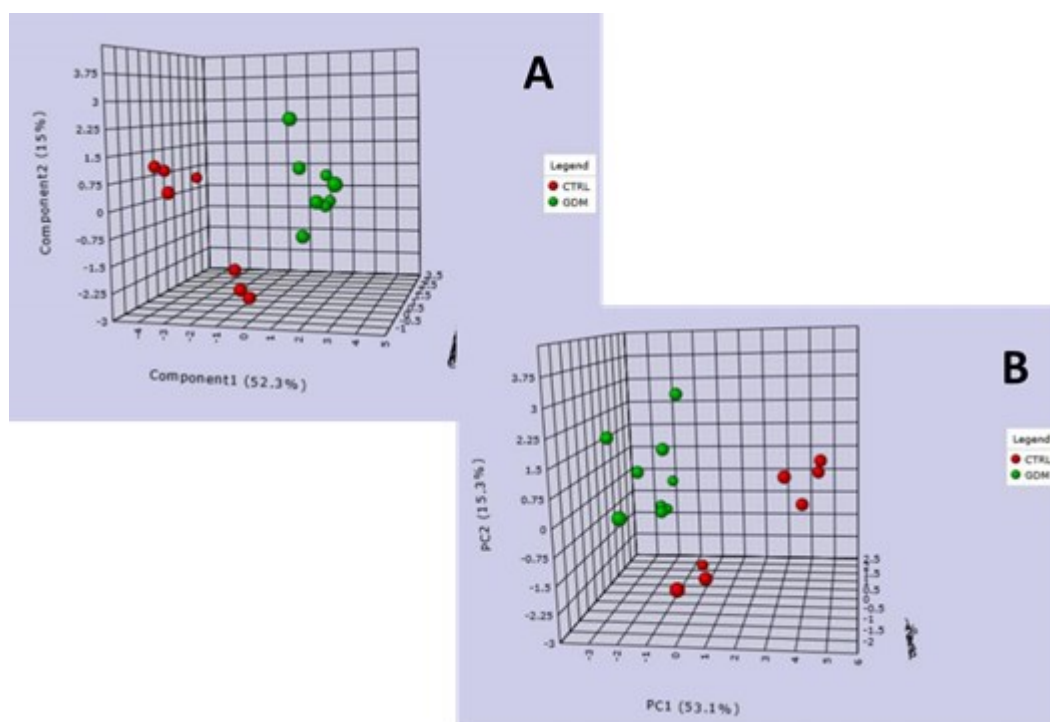


Figura 34: Rappresentazione 3D dei risultati della PCA, ottenuta dall'elaborazione congiunta dei dati derivanti dal profilo proteico e peptidico.

Inoltre, dal Biplot delle variabili PCA riportato in Figura 35, si evince il comportamento delle singole specie ioniche:

- vettori opposti indicano un andamento inversamente proporzionale dell'abbondanza assoluta delle specie prese in considerazione;
- se l'angolo tra i vettori è di 90° non c'è correlazione;
- se l'angolo tra i vettori è acuto si ha una correlazione diretta tra le variabili considerate.

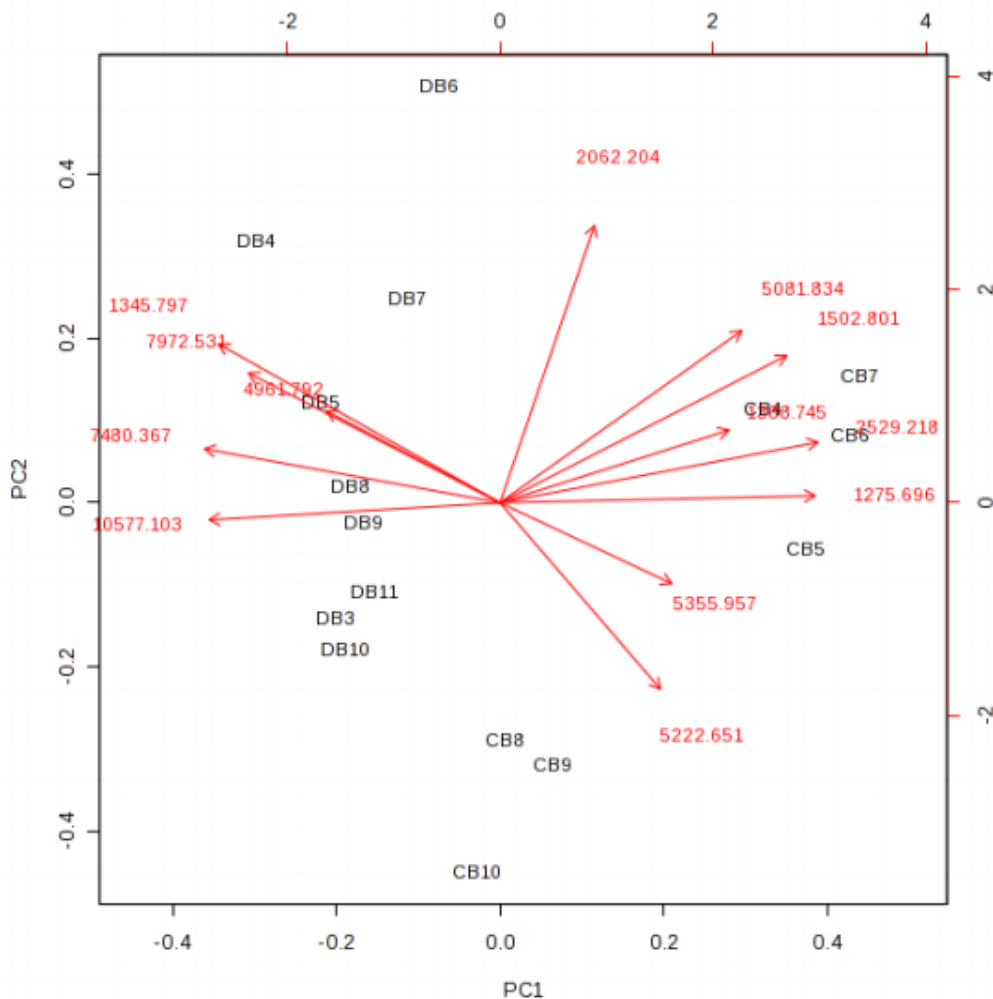


Figura 35: Biplot delle variabili della PCA, da cui si evince il comportamento delle singole specie ioniche.

Al fine di completare l'analisi, i campioni di lisato di cellule linfocitarie sono stati analizzati anche per mezzo di elettroforesi monodimensionale su gel di poliaccrilammide. Un esempio dei gel ottenuti è riportato in Figura 36.

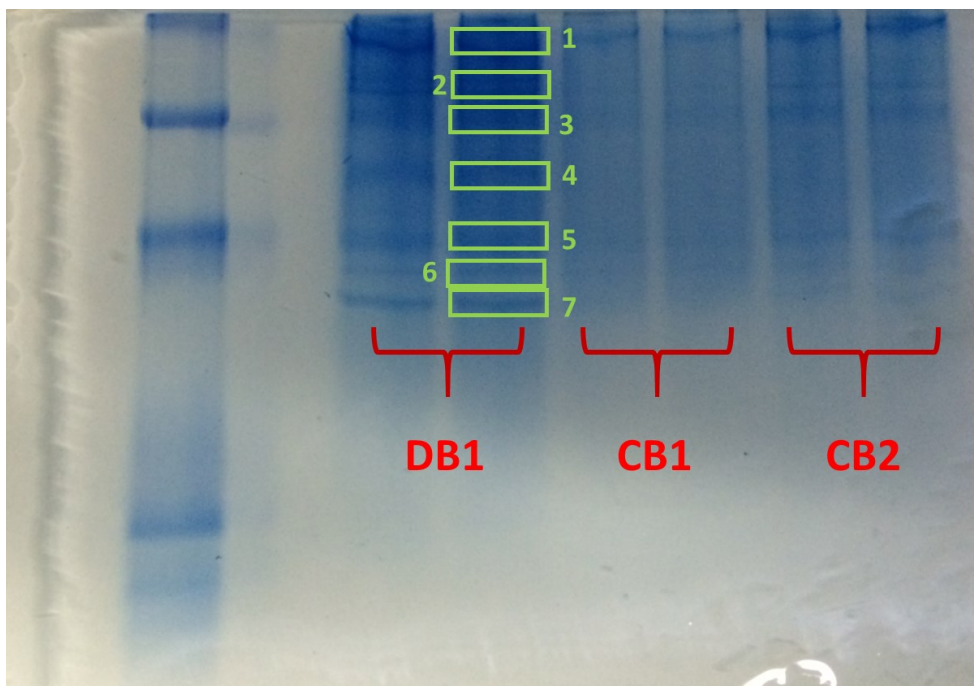


Figura 36: Esempio di gel elettroforetico monodimensionale ottenuto dall'analisi del lisato ottenuto da linfociti estratti da sangue cordonale.

Dall'analisi densitometrica delle bande presenti sul gel si evince che l'unica banda che mostra un'alterazione significativa tra i due gruppi è la numero 7, sovra-espressa nei campioni provenienti da pazienti GDM. Questa banda, quindi, è stata tagliata, sottoposta a digestione enzimatica e analisi MALDI-TOF/TOF per identificare la specie proteica contenuta. L'analisi PMF, confermata dagli spettri di frammentazione di alcuni peptidi ottenuti dalla digestione, ha permesso di evidenziare la presenza della proteina *14-3-3 protein zeta/delta* (*Protein kinase C inhibitor protein 1*, gene name: *YWHAZ*). Questa specie risulta coinvolta in vari processi fisiologici ed è specializzata nel signalling intracellulare. Inoltre, essa risulta coinvolta nel pathway dell'apoptosi: in condizioni di stress cellulare, infatti, *14-3-3 protein zeta/delta* è fosforilata da MAPK8, così da promuovere la traslocazione di BAX (proteina pro-apoptotica) all'interno dei mitocondri.

6.3 - Conclusioni

Le analisi effettuate su linfociti estratti da sangue cordonale hanno permesso di determinare delle specie peptidiche e proteiche in grado di discriminare i campioni di controllo dai campioni provenienti da neonati con madre affetta da diabete gestazionale. Inoltre, è stata messa in evidenza un'alterazione della proteina *14-3-3 protein zeta/delta*, pro-apoptotica, sovra-espressa nei linfociti cordonali provenienti da pazienti affetti da

GDM. Risultati simili erano già stati ottenuti in altri lavori [74], basati su metodi immunoenzimatici, per Caspase-3 e PARP-1. Pertanto, sebbene gli interventi medici siano rivolti all'ottenimento di un controllo glicemico ottimale nelle gestanti GDM, a livello fetale sono comunque attivi degli stimoli apoptotici in grado di alterare l'omeostasi del feto.

Al momento, è in corso la raccolta di ulteriori campioni di linfociti da sangue cordonale in modo da poter eseguire altre analisi per confermare i dati statistici ottenuti e per procedere successivamente ad una identificazione più completa ed accurata delle proteine e dei peptidi che mostrano avere una significativa modificazione dei livelli di espressione.

7 – Analisi del metalloma placentare in presenza di GDM

La metallomica (determinazione quantitativa dei metalli e dei metalloidi presenti in un tessuto o in un organo) della placenta, sia sana che proveniente da pazienti con GDM, è ancora un campo di indagine sconosciuto. In letteratura sono presenti alcuni lavori, ma non sono esaustivi poiché riportano dati su un numero limitato di elementi. Lo scopo di questo studio è quello di effettuare uno screening di tutti gli elementi presenti nel tessuto placentare e di evidenziare differenze statisticamente significative tra la composizione della placenta sana e placenta proveniente da gestanti con GDM. Inoltre, poiché il lato materno e fetale della placenta presentano morfologia e funzioni diverse, si vuole studiare la composizione elementare del tessuto nei due casi. La tecnica analitica impiegata in questo studio è l'ICP-MS che tutt'oggi rappresenta il più potente metodo disponibile per l'analisi elementare potendo determinare contemporaneamente quasi tutti gli elementi della tavola periodica con buona accuratezza e precisione, e con limiti di rilevabilità bassi. I confronti statistici sono stati compiuti attraverso procedure ben note, che comprendono test statistici parametrici e non parametrici, e analisi delle componenti principali (PCA).

7.1 - Materiali e metodi

Lo studio per la determinazione del metalloma placentare è stato condotto su 47 gestanti (19 controlli e 28 pazienti affette da GDM). I campioni di placenta e quindi i pazienti coinvolti nell'indagine corrispondono con quelli analizzati nello studio descritto precedentemente (Sezione 5). La medesima considerazione va fatta per il protocollo di campionamento e stoccaggio.

Tabella 7: parametri clinici e metabolici dei soggetti analizzati (BMI = Body Mass Index; *p<0.05 vs GDM).

	GDM	Control
Age (years)	33.7 ± 5.0	33.6 ± 4.9
Pre-pregnancy BMI (kg/m²)	24.5 ± 4.0	23.0 ± 4.0*
Gestational week of GDM diagnosis	24.0 ± 4.0	-
Gestational week of delivery	37.9 ± 1.6	39.0 ± 1.0
Fasting plasma glucose (mmol/L)	4.90 ± 0.63	4.20 ± 0.18*
HbA1c (%)	5.44 ± 0.32	5.00 ± 0.20*
Birth weight (g)	3220 ± 610	3290 ± 500

In Tabella 7 sono riportati i parametri clinici e metabolici per le gestanti delle quali è stato analizzato il tessuto placentare.

Il giorno dell'analisi, la parte fetale e materna del campione di placenta sono state separate e liofilizzate per circa 24 ore. Per la digestione acida, 200 mg di tessuto liofilizzato sono stati addizionati a 3 mL di acido nitrico concentrato (69%). Il processo di digestione è avvenuto in un reattore a microonde (CEM Discover SP-D), operante nelle successive condizioni sperimentali: temperatura massima 200°C, rampa di temperatura 4 min, pressione massima 400 psi, potenza 300 W, velocità di mescolamento media e numero di sfiati 5. Dopo la digestione, i campioni sono stati diluiti con acqua milliQ fino ad un volume di 50 mL, al fine di ottenere una concentrazione di acido nitrico finale del 4% (come per le soluzioni di standard). L'analisi ICP-MS è stata eseguita con lo strumento ICP-MS modello 7700x prodotto da Agilent Technologies. Le condizioni strumentali usate sono le seguenti: radiofrequency power 1550 W, RF matching 1.8 V, plasma gas (Ar) flow rate 15 L/min, carrier gas (Ar) flow rate 1.05 L/min, He gas flow rate 4.3 mL/min, CeO⁺/Ce⁺ = 0.90 %, nebulizer type: microflow PFA, spray chamber type: scott double-pass type at 2 °C, sample introduction speed 0.1 mL/min, internal diameter of nickel cone 1.0 mm, internal diameter of skimmer cone 0.5 mm, sampling depth 8.5 mm, dwell time/mass = 100. Gli isotopi ⁶Li, ⁴⁵Sc, ⁷²Ge, ¹⁰³Rh, ¹¹⁵In, ¹⁵⁹Tb, ¹⁷⁵Lu e ²⁰⁹Bi sono stati usati per monitorare la deriva sperimentale. La calibrazione dello strumento è stata effettuata utilizzando le seguenti soluzioni standard multielemento: a) CLPP-CAL-1, "INORGANIC VENTURES" contenente Ca, K, Mg, Na 5000 µg/mL, Al, Ba 2000 µg/mL, Fe 1000 µg/mL, Co, Mn, Ni, V, Zn 500 µg/mL, Ag, Cu 250 µg/mL, Cr 200 µg/mL, Be 50 µg/mL, in HNO₃ 5% (v/v), b) CCS-5, "INORGANIC VENTURES" contenente B, Ge, Hf, Mo, Nb, P, Re, S, Sb, Si, Sn, Ta, Ti, W, Zr 100 µg/mL, in HF 1.0 % (v/v) and HNO₃ 7.14 % (v/v), c) IV-ICPMS-71A, "INORGANIC VENTURES" contenente Ag, Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Ga, Gd, Ho, K, La, Lu, Mg, Mn, Na, Nd, Ni, P, Pb, Pr, Rb, S, Se, Sm, Sr, Th, Tl, Tm, U, V, Yb, Zn 10 µg/mL, in HNO₃ 3.0 % (v/v), d) Agilent Technologies Multielement Calibration Standard, contenente B, Ge, Mo, Nb, P, Re, S, Si, Ta, Ti, W, Zr, Sr 10 µg/mL, in acqua con tracce di HF e HNO₃, e) Agilent Technologies Multielement Calibration Standard 3, contenente Au, Hf, Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Sn, Te 10 µg/mL, in HCl 10 % + HNO₃ 1%, f) Agilent Technologies Multielement Calibration Standard 1, contenente Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sc, Sm, Tb, Th, Tm, Y, Yb 10 µg/mL, in HNO₃ 5%.

L'analisi elementare per la determinazione di C, H, N ed S è stata effettuata su un analizzatore Perkin-Elmer 2400.

Ogni campione di tessuto placentare è stato analizzato 5 volte; le concentrazioni sono riportate come µg di elemento per g di placenta liofilizzata (ppm).

Il metodo analitico è stato validato calcolando il limite di rivelabilità, il limite di quantificazione e il recupero per tutti gli elementi considerati nell'analisi.

Il confronto dei dati ottenuti per il lato materno e fetale della placenta è stato effettuato con il test *Pair Data* (dependent) Comparison, mentre le differenze tra la composizione elementare dei campioni di controllo e dei campioni patologici è stata effettuata con i test *t-Student* ($p < 0.05$) e *Mann Whitney*. E' stata effettuata anche un'analisi delle componenti principali (PCA).

7.2 – Risultati e Discussione

La Tabella 8 riporta i risultati (media e mediana) di tutte le analisi effettuate sulle placente di controllo. I valori ottenuti per C, H, N e S sono riportati come percentuali e sono stati ottenuti dall'analisi elementare. Per alcuni elementi (Br, Cl, Hg, Sc, e la maggior parte dei lantanidi) sono stati riportati i dati di letteratura, poiché non è stato possibile ottenere i relativi valori dalle analisi effettuate.

Tabella 8: Composizione elementare della placenta.

elem.	side	d.w. concentration interval [ppm]	Mean	Median
C			47.06 %	
Cl ^(G)		0.16-0.26 %	0.2 %	
H			7.25 %	
N			12.79 %	
S			0.58 %	
Al	fetal	1.5-1400	37	4.2
	maternal	1.4-530	23	4.6
As	fetal	0.0063-0.36	0.049	0.014
	maternal	0.0072-0.27	0.048	0.017
Ba	fetal	0.43-0.43	0.43	0.43
	maternal	0.035-0.28	0.21	0.26
Br ^(G)		2.8-13.2	4.74	
Ca	fetal	520-82000	4400	1300
	maternal	470-16000	3200	1300
Cd	fetal	0.013-0.18	0.051	0.032
	maternal	0.012-0.20	0.060	0.041
Ce	fetal	0.0023-0.067	0.020	0.0042
	maternal	0.0025-0.027	0.015	0.016
Cl		1.8-5.1	3.2	3.2
Co	fetal	0.0079-0.36	0.042	0.017

	maternal	0.0074-1.2	0.13	0.017
Cr	fetal	0.015-1.89	0.30	0.13
	maternal	0.020-11	0.61	0.13
Cs	fetal	0.015-0.12	0.045	0.032
	maternal	0.019-0.13	0.047	0.035
Cu	fetal	3.7-31	5.7	5.0
	maternal	3.6-10	5.2	5.0
Dy ^(K)		<0.002		
Er ^(K)		<0.001		
Eu ^(K)		<0.0008		
Fe	fetal	13-860	410	400
	maternal	78-1200	470	480
Ga	fetal	0.018-0.10	0.057	0.051
	maternal	0.041-0.058	0.048	0.045
Gd	fetal	0.027-0.11	0.078	0.091
	maternal	0.058-0.086	0.072	0.070
Hg ^(G)		0.0003-0.052	0.0073	
Ho ^(K)		<0.0006		
K	fetal	4300-15000	11000	10000
	maternal	7900-17000	12000	11000
La	fetal	0.0015-0.0035	0.0023	0.0017
	maternal	0.0013-0.015	0.0045	0.0019
Lu ^(K)		<0.0006		
Mg	fetal	190-1400	440	420
	maternal	280-720	470	450
Mn	fetal	0.074-5.0	0.432	0.33
	maternal	0.092-2.0	0.40	0.35
Mo	fetal	0.013-0.023	0.017	0.015
	maternal	0.011-0.044	0.022	0.021
Na	fetal	8000-19000	13000	13000
	maternal	9000-18000	14000	13000
Nd ^(K)		<0.002-0.030		0.002
Ni	fetal	0.26-11	5.8	5.8
	maternal	1.0-1.0	1.0	1.0
P	fetal	3400-49000	10000	9400
	maternal	6900-19000	11000	11000
Pb	fetal	0.016-0.21	0.092	0.068
	maternal	0.013-0.16	0.079	0.065
Pr ^(K)		<0.0004-0.010		0.0006
Rb	fetal	7.8-19	13	13
	maternal	9.9-22	14	14
Sb	fetal	1.2-3.8	2.5	2.5
	maternal	0.24-0.25	0.24	0.25
Sc ^(K)		0.005-0.150		0.020
Se	fetal	0.35-0.95	0.64	0.63

	maternal	0.38-1.0	0.67	0.65
Sm ^(K)		<0.002		
Sn	fetal	0.030-0.21	0.089	0.059
	maternal	0.031-0.81	0.23	0.036
Sr	fetal	0.12-10	0.82	0.32
	maternal	0.088-8.37	0.95	0.32
Ta	fetal	0.19-0.19	0.19	0.19
	maternal	0.11-0.34	0.22	0.22
Tb ^(K)		<0.001		
Ti	fetal	0.19-1.5	0.68	0.66
	maternal	0.29-6.6	0.88	0.74
Tm ^(K)		<0.0005		
V	fetal	0.017-0.20	0.069	0.046
	maternal	0.0090-0.34	0.095	0.044
Yb ^(K)		<0.001		
Zn	fetal	9.2-100	51	51
	maternal	27-76	53	52
Zr	fetal	0.035-0.55	0.080	0.052
	maternal	0.028-0.80	0.086	0.052

La prova di recupero ha permesso di dimostrare l'efficacia del metodo utilizzato; oltre che dallo strumento, il recupero di un certo elemento dipende dalla procedura utilizzata per la preparazione dei campioni (pesata, digestione, diluizione). In questo caso, le percentuali di recupero si discostano poco rispetto al 100% per la maggior parte degli elementi e quindi il metodo di preparazione utilizzato comporta perdite minime nei diversi passaggi; il tessuto placentare, inoltre, non influenza la quantificazione degli elementi e quindi l'effetto della matrice biologica è trascurabile. Due eccezioni sono rappresentate da P e Cd per i quali si ottengono percentuali di recupero molto diverse da 100. P, cui è associata una percentuale di recupero pari al 390%, è considerato un elemento difficilmente analizzabile con la tecnica ICP-MS [75]. Al contrario la bassa percentuale di recupero ottenuta per Cd, pari al 15%, può essere giustificata dalla presenza di alte concentrazioni di cloruri nel tessuto placentare. Si è ipotizzato che questi possano formare dei complessi neutri con il Cd che vengono persi durante la fase di digestione.

I dati riportati in Tabella 8 rappresentano il quadro più completo della composizione elementare della placenta sana disponibile in letteratura. In generale, se si considerano i valori mediani, gli elementi presenti nel tessuto placentare possono essere classificati in sei gruppi:

- a) elementi con concentrazione > 1000 ppm (d.w.): C, Ca, H, K, N, Na, e P.

- b) elementi con concentrazione di circa 102 ppm: Cl, Mg, Fe, S, e Zn.
- c) elementi con concentrazione di circa 101 ppm: Br e Rb.
- d) elementi con concentrazione di circa 1 ppm: Al, Cu, Ni, Se, e Ti.
- e) elementi con concentrazione di circa 0,1 ppm: Ba, Cr, Ga, Mn, Pb, Sb, Sr, Ta, e Zr.
- f) gli elementi con concentrazione intorno a 10-2 ppm o minore: As, Cd, Co, Cs, Hg, tutti i lantanidi, Mo, Sc, Sn, e V.

A questo punto può essere utile confrontare i risultati ottenuti con quelli disponibili in letteratura.

Odland et al. [76] hanno rilevato nel tessuto placentare Ba, Ca, Fe, K, Na, Ni, P, Pb, e Sr; i valori di concentrazione riportati sono generalmente dello stesso ordine di grandezza di quelli riportati in Tabella 8. L'unica eccezione è Ni, per cui hanno trovato una concentrazione circa 50 volte minore.

Kippler et al. [77] hanno determinato As, Cd, Cu, Mg, Mn, Se e Zn nella placenta. L'unica differenza significativa tra i loro valori e quelli del presente lavoro è relativa alla concentrazione di As, che risulta essere circa 10 volte più concentrato nei campioni di Kippler.

Grant et al. [78] hanno determinato Br, Cl, Hg, e Rb. I valori riportati per Rb sono in accordo con quelli ottenuti nel presente lavoro. Inoltre, l'analisi eseguita non permette di quantificare Br, Cl, Hg e pertanto i valori proposti da Grant sono gli unici finora disponibili in letteratura e sono stati inclusi in Tabella 8.

Kruger et al. [79, 80] hanno studiato Al e i lantanidi; in questo lavoro, Al risulta circa 10 volte meno concentrato, mentre i lantanidi mostrano un andamento coerente a quello trovato nei campioni analizzati.

Serafim et al. [81] hanno analizzato il Cr, per il quale sono stati rilevati livelli leggermente inferiori a quelli riportati in Tabella 8.

Osman et al. [82] hanno analizzato Co e Mo, le concentrazioni trovate coincidono con quelle riportate nella presente indagine.

I risultati dei test statistici effettuati per confrontare le concentrazioni degli elementi presenti nel lato materno e fetale della placenta non hanno evidenziato nessuna differenza significativa.

I risultati dei test statistici effettuati per confrontare le concentrazioni degli elementi tra la placenta sana e la placenta affetta da GDM sono riassunti in Tabella 9. Sono state osservate differenze significative per Cd e Se; il Cd risulta essere più concentrato nel gruppo di controllo, mentre Se è più concentrato nelle pazienti affette da GDM.

Tabella 9: Risultati dei test statistici relativi al confronto tra placente sane e GDM.

Element	Analisi				
	1	2	3	4	5
Na					
Mg			test M. W.		test t
Al	////////////////		test M. W.	test M. W.	test M. W.
P			test M. W.		
K			both tests		
Ca	////////////////				
Ti	////////////////				
V	////////////////		////////////////	////////////////	////////////////
Cr	test t		test M. W.		////////////////
Mn	////////////////				
Fe	both tests				
Co	////////////////		both tests	////////////////	////////////////
Ni	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////
Cu				test t	
Zn			test M. W.		test t
Ga	////////////////	////////////////			////////////////
As	////////////////				////////////////
Se	both tests	test M. W.			both tests
Rb		both tests	test M. W.	test M. W.	
Sr	////////////////			test t	test t
Zr	////////////////				
Mo	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////
Cd	test M. W.	test M. W.	test t	test t	
Sn	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////
Cs	both tests			test M. W.	test M. W.
Ba	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////
La	////////////////	////////////////	////////////////		////////////////
Ce	////////////////	////////////////	////////////////		////////////////
Gd	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////
Ta	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////
Tl	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////
Pb	////////////////	both tests			////////////////

I risultati dell'analisi delle componenti principali sono riportati in Figura 37 e Figura 38. In Figura 38, in rosso sono evidenziati gli oggetti riferiti alle gestanti che hanno sviluppato il diabete gestazionale, in nero quelli riferiti ai controlli, in azzurro i dati relativi alle prove ripetute della stessa soluzione (errore strumentale), in blu quelli riferiti alle prove ripetute su soluzioni provenienti da diverse digestioni di un campione omogeneizzato (errore sulla procedura) e in verde quelli relativi alle prove ripetute su diversi campioni della stessa paziente (errore sulla procedura e sul campionamento).

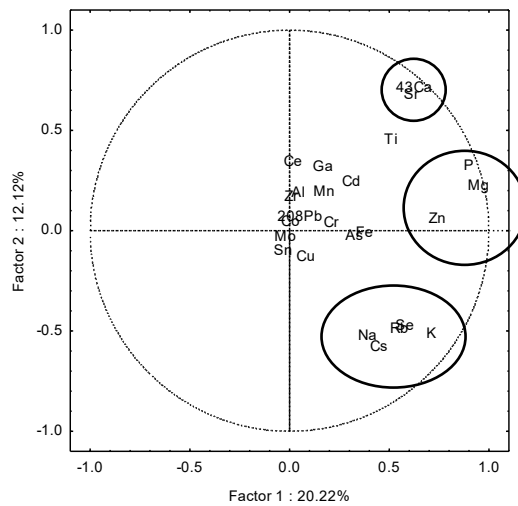


Figura 37: risultati PCA: grafico dei *Loadings*.

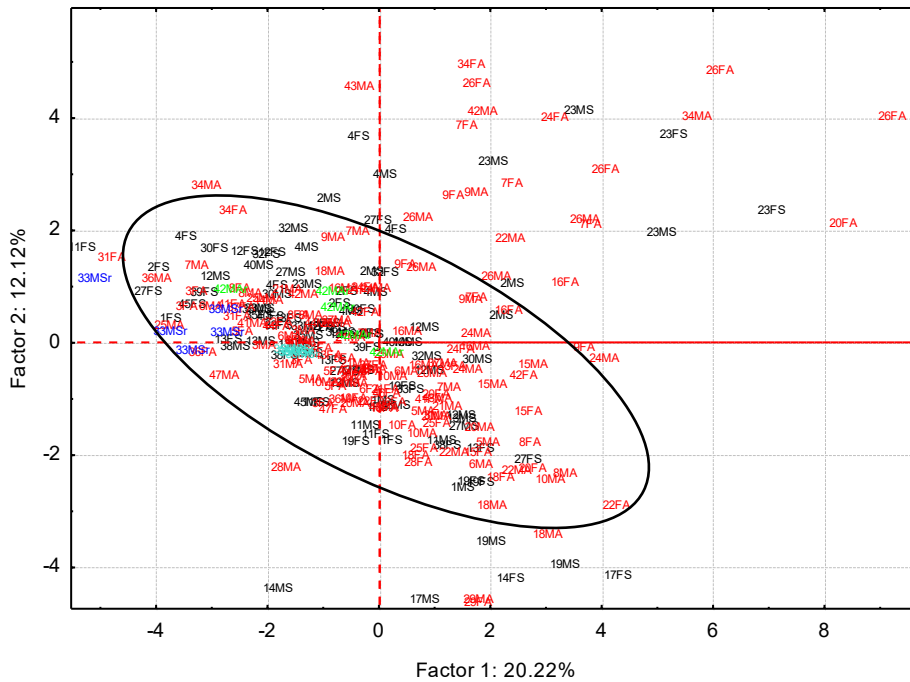


Figura 38: risultati PCA: grafico degli *Scores*.

Il grafico dei Loadings riportato in Figura 37 mostra tre gruppi di variabili correlate. Mg-P-Zn (gruppo A) sono rappresentativi della componente Factor 1, mentre Ca-Sr (gruppo B) e Cs-K-Na-Rb-Se (gruppo C) sono rappresentative di entrambe le componenti. I vettori che collegano il centro dell'asse al gruppo B e C sono ortogonali: ciò indica che i due gruppi non sono correlati. Al contrario, le coppie di elementi Rb-Se e Ca-Sr sono molto correlate perché sovrapposte. Il grafico degli Scores in Figura 38 non mostra differenze significative tra casi e controlli. Un cluster nella zona centrale, di forma

ellittica, si sviluppa nella direzione del vettore associato alle variabili Cs, K, Na, Rb e Se, presenti nel quarto quadrante.

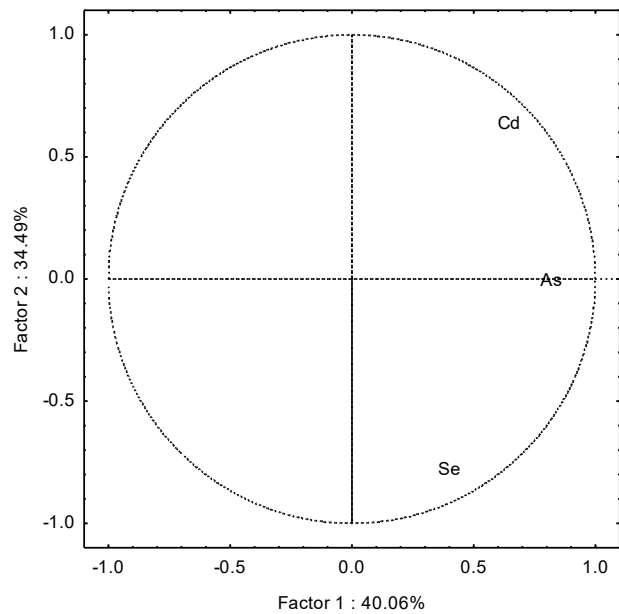


Figura 39: risultati PCA: grafico dei *Loadings* limitato a Se, Cd e As.

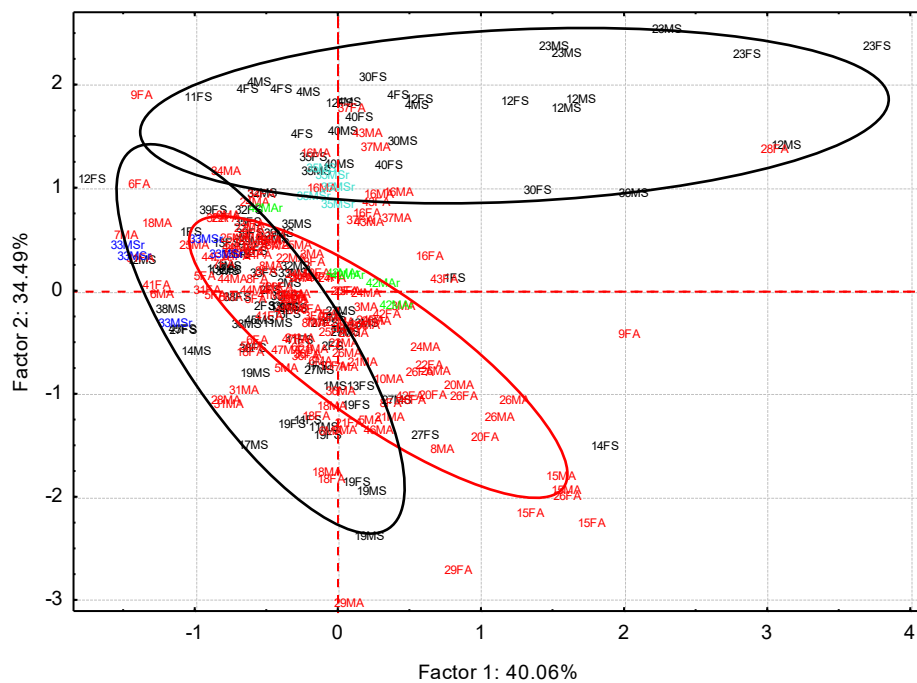


Figura 40: risultati PCA: grafico degli *Scores* limitato a Se, Cd e As.

Al fine di semplificarne l'aspetto, i grafici in Figura 39 e Figura 40 riportano solo i valori ottenuti per As, Cd e Se; l'arsenico è stato incluso come esempio di elemento che non dimostra correlazione con la patologia. Se si considera la direzione ed il modulo del

vettore che collega l'origine degli assi alla posizione della variabile è possibile ottenere informazioni importanti: il verso di ogni vettore fornisce indicazioni riguardo la zona in cui quella determinata variabile aumenta di concentrazione; la direzione del vettore esprime la correlazione con le due componenti riportate sugli assi; il modulo del vettore è indice della significatività di quella variabile all'interno del piano. Si deduce che gli elementi al centro del grafico non sono significativi per nessuno dei due fattori.

Il grafico dei *Loadings* (Figura 39) indica che le variabili Cd e Se sono indipendenti perché i loro vettori sono ortogonali. Il grafico degli *Scores* (Figura 40) mostra che gli oggetti relativi ai pazienti diabetici sono concentrati principalmente in un cluster, all'interno dell'ellisse sviluppata nella direzione del vettore associato a Se (cerchio rosso in Figura 40). Questo elemento separa quindi i due gruppi di pazienti. Nel quarto quadrante (destra e verso il basso), ovvero la zona associata ad elevate concentrazioni di Se, si può osservare un numero maggiore di oggetti rappresentanti pazienti con GDM (rosso) rispetto a quelli caratteristici dei controlli (nero). Nel primo quadrante (sinistra e destra), associato ad un maggiore contenuto di Cd, si può osservare che i controlli (nero) sono presenti in numero maggiore rispetto ai pazienti diabetici (in rosso). I grafici PCA, pertanto, indicano che Se e Cd sono due elementi fondamentali per la separazione dei pazienti GDM dal gruppo dei controlli. Queste evidenze sono in accordo con i risultati provenienti dall'analisi statistica.

I risultati dell'analisi statistica sono stati ulteriormente interpretati considerando la biochimica degli elementi di interesse, relazionandoli alla gravidanza e al diabete gestazionale o diabete mellito in generale.

Il selenio è un oligoelemento fondamentale per il mantenimento dei processi fisiologici dell'organismo umano e di un buon stato di salute. Il selenio è coinvolto nei meccanismi di crescita e riproduzione animale e umana, nella protezione contro i metalli pesanti e nella regolazione del sistema immunitario [83]. Studi epidemiologici hanno dimostrato che la carenza di Se può contribuire ad un aumento del rischio di sviluppare patologie cardiovascolari, ossee e nervose [84]. E' stato anche ipotizzato che il Se possa avere una funzione "anti-diabetica" viste le sue caratteristiche di insulino-somiglianza; inoltre, recenti studi recensiti da Steinbrenner et al. [85] hanno dimostrato una forte correlazione tra diabete mellito di tipo 2, iperglicemia e dislipidemia con i livelli di concentrazione plasmatica di Se. Inoltre, alterazioni dell'omeostasi del Se possono essere causate da una compromissione del metabolismo dei carboidrati.

Le seleno-proteine, con funzione antiossidante, sono fondamentali per la riproduzione e la gravidanza. Ad esempio, la famiglia proteica delle glutatione-

perossidasi ha un ruolo fondamentale nella riduzione enzimatica del perossido d'idrogeno e dei lipidi perossidati, al fine di produrre specie chimiche innocue (acqua, alcoli) ed evitando così la propagazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) [86]. In letteratura sono reperibili diversi studi per quanto riguarda la concentrazione di Se relativamente ad alcune patologie ostetriche, come la preeclampsia, ritardo di crescita intrauterino, aborti, parto prematuro e colestasi ostetrica, ma i risultati sono discordanti [83]. La recente meta-analisi di Askari *et al.* [87] ha evidenziato una riduzione sistematica dei livelli di selenio nel sangue nel caso di gravidanza complicata da GDM. Una possibile interpretazione di questi risultati risiede nella correlazione tra l'incremento dei livelli ematici di glucosio in gravidanze complicate da diabete gestazionale e concomitante aumento dello stress ossidativo; le pazienti affette da GDM o intolleranza al glucosio, infatti, sono più predisposte a condizioni di stress ossidativo a causa del loro stato iperglicemico e al manifestarsi dell'insulino-resistenza [88]. Questo comporta un aumento di concentrazione dei lipidi perossidati e un conseguente aumento dell'attività degli enzimi antiossidanti, la quale può causare una deplezione dei livelli materni di Se, in particolare verso la fine della gravidanza. Allo stesso tempo, la placenta e il feto risentono di questa condizione di stress ossidativo e attivano una serie di meccanismi per integrare il fabbisogno crescente di Se. Sistematicamente, si riscontrano concentrazioni di Se più elevate nel sangue cordonale rispetto che nel sangue materno [89] e quindi è possibile ammettere un trasporto attivo di questo elemento al feto attraverso la placenta. Altri risultati hanno indicato che i meccanismi di trasporto delle seleno-proteine sono in grado di assicurare il trasferimento di Se al feto, anche in condizioni di carenza del Se disponibile [90]. Pertanto, si può ipotizzare che in presenza di GDM si abbia un aumento della concentrazione del Se placentare, come riscontrato dalle analisi effettuate, sebbene i livelli di selenio nel sangue materno risultino essere più bassi.

Il cadmio è un noto oligoelemento altamente tossico, responsabile di una serie di patologie ed effetti negativi per la salute umana. Il Cd provoca un aumento della produzione intracellulare di ROS e induce un malfunzionamento dei mitocondri (perdita del potenziale della membrana mitocondriale e aumento della produzione di citocromo-C). Inoltre, il Cd si accumula negli spazi intracellulari poiché è in grado di competere con altri ioni metallici per quanto riguarda l'attraversamento della membrana cellulare [91]. Il Cd è assorbito dall'organismo principalmente da fonti alimentari e con il fumo di sigaretta; oltre ad avere effetti negativi sul sistema di regolazione endocrina e sull'apparato riproduttivo, il Cd è nefrotossico, neurotossico, genotossico e teratogeno [92]. Inoltre, il Cd provoca una riduzione della dimensione degli adipociti e

un'alterazione dell'espressione delle adipochine, causando uno squilibrio tra la sintesi dei lipidi e la lipolisi e accelerando, così, il rischio di sviluppare insulino-resistenza e diabete di tipo 2.

Recentemente, si è osservato che il Se ha la capacità di conferire un certo grado di tolleranza per quanto riguarda l'esposizione a metalli tossici come il cadmio, probabilmente formando complessi Cd-Se e modulando l'espressione delle selenoproteine [93]. Recenti studi in vivo hanno anche dimostrato una correlazione negativa tra Se e Cd: animali trattati con Se hanno mostrato una diminuzione della concentrazione tissutale di Cd e dello stress ossidativo Cd-indotto se confrontati con animali non trattati [94]. L'esistenza di una correlazione negativa tra Cd e Se è supportata anche dal fatto che solitamente nei campioni ematici di pazienti affetti da diabete mellito si riscontrano concentrazioni di Cd maggiori e concentrazioni di Se minori rispetto ai campioni provenienti da soggetti sani. I risultati del presente lavoro hanno dimostrato una diminuzione della concentrazione del Cd placentare in presenza di GDM. Questo potrebbe essere spiegato prendendo in considerazione l'ipotesi di una correlazione negativa Cd-Se: pertanto, visto l'aumento dei livelli placentari di Se in presenza di GDM, si ha una conseguente riduzione della relativa concentrazione di Cd.

7.4 - Conclusioni

In questo studio, è stato utilizzato un approccio metallomico per la determinazione degli elementi chimici presenti nel tessuto placentare e per evidenziare possibili differenze di concentrazione tra le specie presenti nella placenta sana e in quella proveniente da gestanti affette da GDM. La tecnica analitica utilizzata, ICP-MS, ha dato la possibilità di analizzare praticamente tutti gli elementi della tavola periodica. Valori di concentrazione superiori ai limiti di rivelabilità sono stati determinati per 32 elementi: Al, As, Ba, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Gd, K, La, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Rb, Sb, Se, Sn, Sr, Ta, Ti, V, Zn, Zr.

I test statistici e l'analisi delle componenti principali non hanno evidenziato differenze significative tra gli elementi presenti nel lato fetale e materno della placenta. Al contrario, differenze statisticamente significative sono state evidenziate per Cd e Se, che risultano avere rispettivamente concentrazioni inferiori e superiori nel tessuto placentare affetto da GDM rispetto al gruppo di controllo. I risultati ottenuti sono specifici per il diabete gestazionale in relazione al tessuto placentare e sono difficilmente traslabili su altre patologie o su altri tipi di organi/tessuti.

8 – Analisi del metalloma placentare in presenza di GDM, parte 2

Lo studio di metallomica riportato nel Paragrafo 7 ha permesso di evidenziare due metalli, il selenio e il cadmio, che risultano essere espressi in modo alterato nel tessuto placentare di gestanti affette da diabete gestazionale se confrontato con placentate provenienti da donne sane. I risultati ottenuti sono interessanti e presuppongono che entrambi i metalli possano essere valutati in studi futuri come possibili bio-marcatori per il diabete gestazionale.

Tuttavia, lo studio precedente ha alcune limitazioni, la principale delle quali risulta essere il numero abbastanza modesto di campioni analizzati. Inoltre, non è stata presa in considerazione la possibile correlazione tra i dati sperimentali ottenuti e altri parametri clinici e comportamentali, come il peso, l'età, l'etnia, lo stile di vita, etc.

Lo scopo di quest'ultima parte di lavoro è quello di effettuare una serie di ulteriori analisi ICP-MS su nuovi campioni di placenta (sana e diabetica), in modo da perfezionare, chiarire e implementare i dati ottenuti nello studio precedente. In particolare, poiché non sono state evidenziate differenze significative tra il lato fetale e materno della placenta, si vuole sviluppare un diverso approccio per la raccolta dei campioni, escludendo i campionamenti trasversali, ma implementando campionamenti multipli di tessuto in zone diverse dell'organo stesso, al fine di valutare diverse concentrazioni delle specie metalliche tra la zona centrale della placenta (nella quale è inserito il funicolo ombelicale) e le zone periferiche, meno irrorate. Inoltre, al fine di ottenere analisi statistiche più complete e affidabili, si vogliono integrare i dati analitici sperimentali con le informazioni clinico-comportamentali dei pazienti reclutati per lo studio.

8.1 Materiali e Metodi

La raccolta del campione è uno dei passaggi fondamentali per quanto riguarda gli studi basati su approcci "omici." Disporre di una serie di campioni raccolti in modo corretto è di essenziale importanza per l'ottenimento di dati sperimentali robusti e riproducibili, sui quali è poi possibile effettuare ulteriori indagini statistiche.

I campioni utilizzati per questo studio sono stati raccolti presso il Dipartimento di Salute della donna e del bambino afferente all'Università di Padova. Per ogni paziente, subito dopo il secondamento, sono stati raccolti i seguenti campioni:

- Una provetta (Vacutainer K2EDTA) di sangue venoso materno;
- Una provetta (Vacutainer K2EDTA) di sangue venoso cordonale;
- 6 campioni di placenta, prelevati da posizioni differenti e ben definite dell'organo, come indicato in Figura 41 (A1 e A2 sono stati prelevati nella zona centrale, nei pressi del funicolo; B1 e B2 sono stati campionati nella zona intermedia; C1 e C2 provengono dalla zona periferica della placenta).

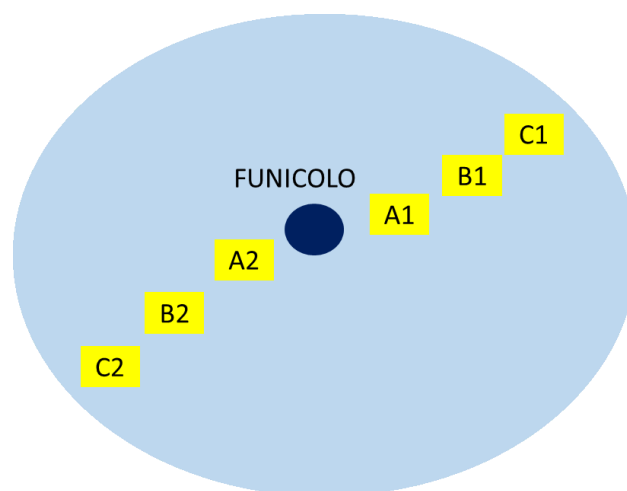


Figura 41: Schema di campionamento della placenta.

I campioni di placenta sono stati immediatamente lavati con una soluzione 0.7 g/L di cloruro di sodio in modo da eliminare, nel modo più quantitativo possibile, il tessuto ematico dal tessuto placentare. Successivamente, i campioni sono stati congelati a -80°C fino al momento della liofilizzazione. I campioni di sangue materno e fetale raccolti non sono oggetto di questo studio. Al momento (Marzo 2016) sono stati raccolti 30 set completi di campioni; il campionamento sarà continuato fino al raggiungimento di 200 set completi di campioni (100 da pazienti con GDM e 100 da controlli).

In Appendice è riportato il questionario somministrato alle paziente arruolate che ha permesso di raccogliere i dati relativi allo stile di vita e i dati clinici necessari.

In Tabella 10 sono riportati alcuni dei dati raccolti, in particolare etnia, età, peso, patologia (con relativo intervento curativo) e abitudine al fumo.

Tabella 10: Caratteristiche delle pazienti oggetto dello studio.

Gestante n°	GDM	Etnia	Età	Peso (kg)	ABITUDINE AL FUMO
1	No	ITALIA	33	72	?
2	Si (dieta)	ROMANIA	38	63	si
3	Si (Insulina)	NIGERIA	31	62	no
4	No	MAROCCO	29	109	no
5	Si	ITALIA	42	63	no
6	No	ITALIA	34	66	no
7	No	ITALIA	33	58	no
8	No	ITALIA	33	72	?
9	Si	SPAGNA	32	93	no
10	Si	MAROCCO	25	74	no
11	No	ITALIA	27	71	si
12	No	ITALIA	43	63	no
13	No	ROMANIA	23	68	si
14	Si (Alterato a digiuno)	ALBANIA	29	69	no
15	No	ROMANIA	30	64	no
16	No	ITALIA	47	53	no
17	No	ITALIA	30	72	no
18	Si(dieta)	MAROCCO	37	82	no
19	Si	ALBANIA	37	72	no
20	No	ITALIA	37	69	no
21	Si	NIGERIA	32	72	no
22	Si(dieta)	ITALIA	38	73	no
23	Si(Insulina)	ROMANIA	36	94	no
24	No	BANGLADESH	26	69	no
25	Si(alterato a 60')	ROMANIA	24	72	no
26	No	ITALIA	42	71	no
27	Si (Insulina)	NIGERIA	25	65	no
28	Si (Insulina)	BURKINA FASO	32	85	no
29	No	ITALIA	35	60	no
30	SI	ITALIA	33	72	?

Per quanto riguarda la liofilizzazione, mineralizzazione e analisi del campione tramite ICP-MS, si rimanda alla Sezione 7.1 del presente lavoro di tesi, poiché non sono state introdotte sostanziali modifiche. Si riportano, comunque, i parametri ottenuti per la calibrazione dello strumento (Tabella 11).

In Tabella 11, il valore LC rappresenta il livello critico, LOD il livello di determinazione, e LOQ quello di quantificazione. LC è il limite sopra al quale la probabilità di ottenere un risultato falso positivo è inferiore al 5%: rappresenta il livello del segnale oltre al quale si decide di attribuire lo stesso all'analita e non al bianco, commettendo un errore del 1° tipo (α) del 5%. Il valore di LC è calcolato essere 1.68 volte maggiore del rumore. Il LOD è la minima concentrazione che fornisce un segnale diverso da quello del bianco, e quindi risulta essere la minima concentrazione significativa. Espresso in unità di concentrazione, si ricava dal segnale significativo (vicino a quello del

bianco ma ad esso differente) mediante la retta di calibrazione. Il LOQ è il livello di quantificazione, che indica il limite fino al quale è possibile ottenere strumentalmente una misura di tipo quantitativo con precisione e accuratezza. È calcolato come $S_b + 10 s_b$, dove S_b rappresenta il segnale del bianco ed s_b la relativa deviazione standard.

Tabella 11: Parametri delle rette di calibrazione ICP-MS ($y = a + bx$) per i diversi elementi; sono dati l'intercetta (a), la pendenza (b), il limite critico (LC), il limite di rivelabilità (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) degli elementi nelle placente. E' stato ottenuto un coefficiente di regressione lineare $R^2 > 0.999$ per ogni elemento in calibrazione.

Elemento	a	b	LC	LOD	LOQ
7 Li [NoGas]	8947	17362	115	155	310
11 B [NoGas]	11601	3192	833	1121	2272
23 Na [He]	3804	1462	1451	2512	6756
24 Mg [He]	2454	644	913	1255	2620
27 Al [He]	838	254	645	796	1396
28 Si [He]	4774	222	10734	18241	48266
31 P [HeHe]	184	11	4234	5945	12793
34 S [HeHe]	452	1	83380	95034	141650
39 K [He]	20870	745	4959	5717	8750
43 Ca [He]	23	19	603	1029	2733
47 Ti [He]	108	301	55	57	64
52 Cr [He]	566	11358	52	96	273
55 Mn [He]	648	6836	40	67	171
56 Fe [He]	26407	9307	787	1148	2594
59 Co [He]	-445	19337	16	38	120
60 Ni [He]	6814	4960	224	244	320
63 Cu [He]	7638	13779	142	201	437
66 Zn [He]	5815	2062	895	1367	3254
69 Ga [He]	288	6464	37	68	191
78 Se [He]	158	71	691	1046	2466
79 Br [He]	405	85	794	876	1201
85 Rb [He]	-258	8366	13	30	99
88 Sr [He]	480	11285	47	87	249
90 Zr [He]	2737	18061	41	59	132
95 Mo [He]	-259	8992	51	84	214
107 Cd [He]	-3437	30992	41	100	332
114 Ag [NoGas]	2907	38840	21	30	68
118 Sn [He]	1315	11946	24	32	62
121 Sb [He]	231	12390	5	7	15
127 I [He]	10912	2856	649	724	1026
137 Ba [He]	2099	5335	106	152	339
182 W [He]	274	33056	1	1	2
195 Pt [He]	582	20417	6	9	17
201Hg [NoGas]	150	55	1091	2727	8182
208 Pb [NoGas]	16560	177853	36	59	149

8.2 Risultati e Discussione

In Tabella 12 sono riassunti gli elementi rivelati nelle placente e classificati in tre gruppi, separati da una riga ed identificati da colori diversi; la suddivisione è basata sul confronto tra i valori di concentrazione mediamente riscontrati per quell'elemento nel tessuto placentare e i relativi valori di LOD e LOQ. In nero sono riportati gli elementi con concentrazione maggiore del relativo valore di LOQ, in azzurro gli elementi che hanno una concentrazione tissutale compresa tra i relativi valori di LOD e LOQ e in rosso gli elementi che mostrano una concentrazione compresa tra i relativi valori di LOD e LC. Gli elementi in nero possono essere quantificati con buona affidabilità e accuratezza, gli elementi in azzurro sono quantificabili ma con accuratezza minore, mentre la quantificazione degli elementi in rosso deve essere valutata attentamente e, poiché i relativi valori non presentano una distribuzione normale, essi non possono essere trattati statisticamente con approcci parametrici.

Tabella 12: Suddivisione degli elementi presenti nella placenta: nero = elementi con concentrazioni medie maggiori del LOQ; azzurro = elementi con concentrazioni medie compresi tra LOD e LOQ; rosso= elementi con concentrazioni medie compresi tra LC e LOD.

B	Na	Mg	Al	Si	P
S	K	Ca	Ti	Cr	Mn
Fe	Co	Cu	Zn	Br	Rb
Sr	Mo	Sn	W	Pb	
Se	Zr	Sb	I	Pt	Hg
Li	Ni	Ga	Cd	Ag	Ba

La Tabella 13 mostra la media dei valori assoluti (concentrazione in ppb) degli elementi presenti nei sei campioni analizzati di ogni placenta.

Tabella 13: Concentrazioni medie (in ppb = ng di elemento per g di placenta liofilizzata) degli elementi nei sei campioni di ogni placenta; n = numero del campione, r = placenta omogeneizzata, 0 = valore inferiore a LC. Le celle vuote indicano valori assoluti anomali.

<u>n</u>	<u>Li</u>	<u>B</u>	<u>Na</u>	<u>Mg</u>	<u>Al</u>	<u>Si</u>	<u>P</u>
r	0	2659	5881489	471739	2533	54743	12480324
r	0	3412	6176112	478847	2494	69881	12318805
r	0	7557	6333826	488132	4688	86587	12748942
r	0	14123	6155664	484564	5598	109205	12744980
r	0	6338	6032183	466053	3406	62461	12300377
r	0	7981	6115464	460185	4601	86493	11902654
r	0	15055	6026955	472971	4305	77960	12051419
1	151	34935	7092477	396972	2587	49864	8937000
2	92	15087	7778301	513737	4305	85351	11144627

3		24384	7206851	452473	5193	82291	9971239
4	90	19108	6706173	461995	3784	76062	9655527
5		25975	6625488	474449	4963	669476	10866676
6	69	13169	7359605	459582	3455	114374	10517656
7	92	12181	7276902	639083	4460	96051	15026719
8	47	13612	7864346	540575	7728	99681	11532615
9	7	3885	7630656	524572	2532	75327	10280554
10	36	10044	7269736	432953	4043	91812	9735162
11	54	15183	7658941	552523	4132	108016	12102772
12	46	11673	7172549	463566	6243	91935	10447473
13	61	12265	9308402	706886	4901	189563	16292195
14	59	13452	6558980	578792	4646	123670	15256983
15	21	9186	7972094	538821	3788	121102	11565784
16	77	13961	6345165	518489	3993	103306	12274437
17	41	7962	6890155	415710	2826	76038	9594378
18	53	15050	6226750	580030	6237	129408	14086625
19	46	15774	6762803	465060	5494	112408	10306500
20	15	11084	7033289	450372	5869	102496	10467595
21	30	11649	7834685	443613	4560	110268	10055456
22	15	11442	7095782	444632	4373	96020	9720116
23	11	5788	8113851	487939	3160	81499	9958828
24	39	12066	7282386	552503	6943	106772	11831541
25		6654	8284479	498595	4831	83304	12140624
26	24	7199	7704193	610393	3668	79395	14960423
27	24	9318	7603714	488113	4331	83520	11362741
28	7	7736	6715203	581302	5044	91366	14728301
29		5499	9221731	522828	4386	79078	11823148
30	6	6335	7661250	675749	3550	77243	15956145

<u>n</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>Ca</u>	<u>Ti</u>	<u>Sn</u>	<u>Sb</u>	<u>Pb</u>
r	9134456	3761647	1259284	525	31	0	137
r	9036694	3905851	1134307	552	19	0	132
r	9110984	4018558	1226646	564	20	0	191
r	9039816	3920718	1227236	529	16	0	137
r	8992488	3841232	1123637	2335	31	0	185
r	8906654	3902155	1098091	521	21	3	159
r	8872892	3850598	1149799	520	95	104	158
1	9526937	4046871	648778	535	122	2	199
2	9259416	6151113	460057	472	108	3	177
3	9183993	4639412	188072	433	72	8	226
4	9011429	4553875	226031	341	73	1	221
5	9207704	5020459	411169	454	1018	2	248
6	9553333	5487603	308874	411	68	2	173
7	9628602	5183057	1293878	1316	93	30	140

8	9301173	6714780	470732	5500	155	24	230
9	9991764	7278997	197368	581	145	1	304
10	9672815	6094964	110327	431	336	2	1155
11	10005991	6506458	529110	508	88	5	174
12	10119066	6783865	196115	436	45	0	110
13	9841056	7476953	1281064	692	139	2	374
14	10010746	4589661	1791365	699	161	1	662
15	9862200	6897989	183675	1527	369	6	877
16	9660131	4813672	289540	2205	97	16	291
17	9841944	4711556	148498	502	37	0	54
18	10348558	4582543	1623332	674	58	1	184
19	9598873	6198754	207901	489	61	7	77
20	9387152	5824859	307198	482	68	0	158
21	9476948	6099292	192223	441	45	4	62
22	9430919	4936853	162441	454	68	0	262
23	9879423	6601368	173505	807	66	2	115
24	10092736	6758481	171697	1940	67	27	167
25	9741986	5160967	561069	917	103	1	209
26	10170035	5986766	1341563	658	39	0	130
27	9972320	6321182	222738	556	35	2	91
28	9591174	6295667	1347411	710	54	0	181
29	10380827	7260742	415644	607	74	6	347
30	9547941	6212896	1391140	680	34	1	190

<u>n</u>	<u>Cr</u>	<u>Mn</u>	<u>Fe</u>	<u>Co</u>	<u>Ni</u>	<u>Cu</u>	<u>Zn</u>
r	223	803	582576	399	0	4963	70106
r	233	578	613520	286	0	4793	70482
r	114	562	623341	143	0	5007	69939
r	107	556	609942	237	0	4856	70445
r	124	549	597747	787	0	4691	69760
r	172	543	600956	284	0	5051	68669
r	146	555	601351	322	0	5039	69118
1	333	500	587786	45	65	5223	57117
2	363	529	569290	79	146	4968	75327
3	472	480	359762	4776	63	4181	70807
4	159	783	543764	38	4	3748	72530
5	223	656	555374	32	223	4534	75010
6	150	603	659370	18	0	5157	77561
7	258	872	429858	49	8	5671	81215
8			597889	132910	147	4287	77324
9	109	629	572721	161	0	5222	72858
10	3170	1086	1041907	109819	250	4680	62794
11	450	642	496279	341		4719	77664
12	355	527	697330	6147	0	5049	70167

13	179	616	594622	129	23	4627	85784
14	96	638	619613	277	15	5370	71310
15	454	548	407249	243	0	4854	74915
16	71	737	413307	87	0	4319	78497
17	116	479	886946	306	3	4447	67414
18	199	690	473822	118	364	6567	69421
19	4617	1662	673220	179350	185	6329	70385
20	61	716	814859	50	0	4497	68343
21	583	786	693370	55	1214	4832	64768
22	23	712	630238	80	0	3661	67323
23	676	824	652531	53	236	4875	67667
24	184	623	529970	2576	0	5895	78677
25	282	585	698828	722	120	5294	71167
26	176	498	463463	236	0	4167	71450
27	536	529	435033	209	245	4321	74391
28	168	627	747353	1752	729	4343	71599
29	253	590	536196	294	29	4681	69129
30	1059	823	405555	41780	49	7982	80011

<u>n</u>	<u>Br</u>	<u>Rb</u>	<u>Sr</u>	<u>Zr</u>	<u>Mo</u>	<u>Cd</u>	<u>Ag</u>
r	11662	7804	3172	0	0	0	0
r	9330	8111	2882	44	47	52	0
r	8123	8297	3108	83	44	61	0
r	7717	8121	3110	78	42	57	0
r	7786	8019	2840	40	42	45	0
r	8361	8007	2795	83	47	55	0
r	8944	7946	2913	47	57	47	0
1	17278	4781	1135	55	114	24	0
2	15327	6255	967	60	103	67	33
3	15500	7144	697	117	119	101	0
4	13294	4290	481	68	76	88	43
5	9287	4586	928	97	71	66	8
6	10338	7025	695	61	52	68	30
7	15111	7154	2697	88	32	58	149
8	18109	7871	1084	88	32	37	80
9	18285	10707	318	13	0	9	54
10	12897	6724	236	67	20	127	72
11	16749	7097	1567	67	25	51	33
12	9289	7154	647	79	40		17
13	19041	7827	3274	76	47	48	10
14	11833	7440	3200	80	16	61	15
15	24681	11157	788	42	0	0	81
16	11304	5794	537	42	35	49	0
17	9064	5584	296	44	48	73	0

18	14857	5760	4347	77	16	80	26
19	10141	7306	481	115	63	107	0
20	12763	7544	842	102	14	84	0
21	10633	8141	516	84	58	72	0
22	12871	6381	336	90	24	61	0
23	15738	8521	777	24	13	109	0
24	12518	10426	737	76	65	83	0
25	15213	6571	1317	55	0	111	0
26	13501	7312	2287	54	16	61	0
27	13422	9628	834	73	50	92	0
28	13958	8979	3211	83	7	41	0
29	19184	10125	594	70	22	44	0
30	13428	10637	2897	66	34	74	0

<u>n</u>	<u>Ga</u>	<u>Se</u>	<u>I</u>	<u>Ba</u>	<u>W</u>	<u>Pt</u>	<u>Hg</u>
r	92	1570	0	553	2	0	8291
r	81	1671	0	494	1	0	8554
r	90	1425	0	560	1	0	8495
r	88	1739	0	553	1	0	8275
r	79	1706	0	499	2	0	8205
r	78	1583	0	503	2	0	8240
r	82	1552	0	522	251	3	8161
1	0	1002	455	58	12	41	1672
2	0	1267		35	7	46	864
3	0	1413	176	16	24	99	5586
4	0	1397	40	31	5	18	3203
5	33	1774	17	218	8	34	3791
6	9	1553	573	65	5	10	7591
7	32	1760	87	199	4	21	7723
8	0	1232	40	38	82	128	1668
9	0	1398	0	35	4	3	944
10	9	1366		48	3	4	2261
11	18	1609	1362	133	25	2	4644
12	0	1956	496	22	2	3	4276
13	23	1680	0	167	6	11	723
14	41	1436	36	273	2	1	1394
15	0	1412	0	0	4	0	3652
16	9	1644	0	61	49	4	16976
17	0	1804	6157	14	2	9	4479
18	14	1705	246	116	4	3	2739
19	18	1775	0	69	25	13	2074
20	18	1621	18	84	1	6	6447
21	0	1613	496	15	5	8	6816
22	36	1563	0	246	1	5	2917

23	0	1269	0	0	1	3	5787
24	0	1528	393	21	71	1	2225
25	0	1090	151	77	17	3	426
26	26	1818	0	188	2	0	8023
27	0		0	23	12	0	6099
28	25	1684	0	226	2	0	403
29	0	1666	5927	29	6	3	11544
30	136	1796	128	895	1	1	5898

La Tabella 14 riporta i risultati ottenuti dal test di significatività (Test F) effettuato per determinare gli elementi portatori di informazione relativamente al set di campioni considerato e a parità di procedura analitica.

Gli elementi in giallo presentano un p -value maggiore di 0.1 (valore arbitrariamente individuato come discriminante); questi elementi forniscono dei risultati sperimentali aventi una variabilità comparabile o inferiore a quella della procedura analitica e pertanto non possono fornire informazioni inerenti ai campioni. Le motivazioni per cui non risulta possibile considerare questi elementi sono svariate: ad esempio Zr risulta presente in concentrazioni molto basse nei vari campioni, mentre altri elementi presentano variabilità elevate dovute alla procedura ICP-MS (es. Ti può formare ossidi refrattari).

Gli elementi segnati in azzurro sono elementi accettabili nell'analisi, per i quali il p -value ha valori non molto inferiori a 0.1; gli elementi con p -value molto inferiore a 0.01 sono indicati su sfondo bianco e forniscono informazioni ad alta attendibilità, in quanto sono influenzati in modo trascurabile dalla procedura analitica. Per alcuni elementi (Li, Ni, Ag, I) non è stato possibile effettuare il test in quanto la distribuzione dei relativi dati di concentrazione nel tessuto placentare non è normale.

Tabella 14: Attendibilità della procedura analitica, valutata considerando i p -value ottenuti dal test di significatività (Test F).

Elemento	Test F
Al	1.00
Zr	0.80
B	0.45
Ti	0.34
Se	0.06
Ga	0.04
Br	0.02
Mn	0.02
Ba	0.01
S	0.00
Cd	0.00

Mo	0.00
Cu	0.00
Na	0.00
Si	0.00
P	0.00
Sn	0.00
Mg	0.00
Sr	0.00
Ca	0.00
Ca	0.00
Zn	0.00
Pb	0.00
Rb	0.00
Fe	0.00
K	0.00
Pt	0.00
Cr	0.00
Hg	0.00
W	0.00
Sb	0.00
Co	0.00
Li	
Ni	
Ag	
I	

A questo punto è possibile valutare la dipendenza della concentrazione degli elementi dalla zona di campionamento del campione di tessuto placentare rispetto alla zona di inserimento del funicolo (A: centrale, B: intermedia o C: periferica, vedi Figura 41). La Tabella 14 riporta i risultati ottenuti considerando i valori medi di concentrazione misurati per ogni elemento.

Tabella 14: Dipendenza della concentrazione placentare dei vari elementi dalla zona di campionamento. I valori di *s* rappresentano le deviazioni standard ottenute per le tre zone di campionamento A, B e C, mentre i *p*-value riportano i risultati statistici sul confronto rispettivamente tra le concentrazioni misurate nelle zone A-B, B-C, A-C.

Elem.	Media (A)	Media (B)	Media (C)	<i>s</i> _A	<i>s</i> _B	<i>s</i> _C	<i>p</i> -value A/B	<i>p</i> -value B/C	<i>p</i> -value A/C
Li	47	51	58	6	12	13	0.38	0.35	0.22
Na	7217209	7336724	7671761	139063	124843	131181	0.26	0.03	0.01
Mg	507190	507694	532347	15309	10170	16794	0.49	0.11	0.14
Si	97592	93886	91145	4168	4946	4248	0.28	0.34	0.14
P	11672444	11430916	12156624	455728	248785	541685	0.32	0.11	0.25

S	9658467	9645211	9826041	58776	51910	65364	0.43	0.02	0.03
K	5793717	5881466	5870414	213344	179457	172349	0.38	0.48	0.39
Ca	490393	442336	752523	110515	51068	142696	0.35	0.02	0.07
Cr	299	292	255	90	73	65	0.48	0.35	0.35
Mn	669	796	663	68	109	27	0.16	0.12	0.46
Fe	630959	618730	529062	22628	28193	21687	0.37	0.01	0.00
Co	156	205	287	40	78	89	0.29	0.24	0.09
Ni	73	116	57	27	40	28	0.18	0.11	0.34
Cu	4904	4800	5146	175	100	139	0.30	0.02	0.14
Zn	73264	73090	70908	1053	898	999	0.45	0.05	0.05
Ga	7.3	7.4	14.1	2.7	2.8	4.0	0.48	0.09	0.08
Se	1594	1549	1535	30	39	43	0.18	0.40	0.13
Br	13327	14068	15166	579	531	525	0.17	0.07	0.01
Rb	7467	7608	7558	343	292	288	0.38	0.45	0.42
Sr	907	1011	1353	100	94	211	0.23	0.07	0.03
Mo	43.1	36.8	34.3	4.8	4.9	4.9	0.18	0.36	0.10
Cd	73.1	63.1	52.3	5.1	5.0	4.7	0.08	0.06	0.00
Ag	29.6	17.4	18.3	13.6	5.8	8.8	0.21	0.47	0.24
Sn	76.2	85.9	94.1	7.6	10.5	10.6	0.23	0.29	0.09
Sb	1.5	2.0	12.1	0.5	0.8	4.5	0.29	0.01	0.01
I	597.5	558.4	792.1	202.1	206.3	228.6	0.45	0.22	0.26
Ba	75.0	63.1	103.3	15.1	13.6	22.1	0.28	0.06	0.15
W	4.1	5.2	10.4	0.9	0.9	3.8	0.19	0.09	0.05
Pt	9.1	8.5	11.8	2.2	2.0	3.2	0.42	0.19	0.24
Hg	4572	4416	4296	489	457	456	0.41	0.43	0.34
Pb	254	238	286	38	50	64	0.40	0.28	0.33

Dall'analisi effettuata si evince che non sono presenti differenze di concentrazione significative tra la zona A e la zona B, poiché i *p*-value sono tutti maggiori di 0.05, valore scelto come discriminante. Per alcuni elementi (segnati in rosso), invece, risulta essere presente una significativa variazione di concentrazione tra la zona A e C e tra la zona B e C. In particolare Na, S e Ca risultano più concentrati nella zona C, mentre Fe è più concentrato nelle zone A e B. Zn e Cd sono presenti maggiormente in A e B, mentre Br e Sb sono più concentrati nella zona C. Si conclude che la zona periferica della placenta non è adatta per effettuare i vari campionamenti, probabilmente a causa delle relative

caratteristiche morfologiche, significativamente diverse rispetto a quelle peculiari delle zone più centrali

Durante la fase di raccolta, i campioni di placenta sono stati lavati accuratamente con una soluzione 0.7 g/L di cloruro di sodio, al fine di eliminare quanto più sangue possibile ed evitare quindi l'interferenza di quest'ultimo nella successiva analisi ICP-MS. Attraverso dei semplici rapporti tra i valori di concentrazione misurati nel tessuto placentare e quelli ematici è possibile valutare l'interferenza del tessuto ematico sulla composizione elementare del tessuto placentare. In Tabella 15 sono riportati i risultati ottenuti dai rapporti tra i valori di concentrazione dei vari elementi nel tessuto placentare, rispetto alle concentrazioni degli stessi nel sangue; per questi ultimi sono stati considerati i valori più elevati degli intervalli di concentrazione pubblicati in uno studio precedente [95]. Per le placente, invece, sono state considerate le concentrazioni medie dei campionamenti effettuati nelle zone A, B e C. Il rapporto placenta/sangue è di per sé un numero privo di significato in quanto i valori del numeratore e del denominatore hanno unità di misura differenti (massa/massa per le placente, massa/volume per il sangue), ma i vari rapporti possono comunque essere confrontati tra loro per indicare l'arricchimento relativo degli elementi nella placenta rispetto al sangue. In particolare, per rapporti bassi l'elemento risulta maggiormente (o più significativamente) presente nel sangue, come nel caso del Fe, oltre che di altri elementi come Ga, Sb, Cr e Ba. Al contrario, si può ipotizzare che il tessuto placentare sia in grado di effettuare una pre-concentrazione per quelli elementi che presentano rapporti placenta/sangue elevati come Mg, P, Mn, Zn, Se, Sr, ed in parte anche Pb e Rb. Tali elementi sono quindi potenzialmente più significativi per effettuare studi statistici sulla placenta, in quanto rappresentano il contenuto elementare del tessuto placentare piuttosto che di quello ematico. In Tabella 15, inoltre, sono confrontati i risultati ottenuti in questo lavoro ("parte 2") con quelli ottenuti nel precedente studio [96] ("parte 1"); l'unica differenza procedurale significativa tra i due studi è che nel primo i campioni analizzati non hanno subito un processo di prelavaggio. E' possibile notare che il rapporto parte 1/parte 2 risulta essere pari a 1 per molti elementi e pertanto sembra che la procedura di lavaggio non sia in grado di alterare in modo significativo la concentrazione degli elementi di origine placentare. Tuttavia, in un numero limitato di casi si osservano differenze rilevanti (per Ca, Ni, Sn, Ga, Ba), con rapporti che presentano valori elevati; tali comportamenti sono difficilmente spiegabili e comunque non sono del tutto imputabili alla procedura di lavaggio effettuata.

Tabella 15: Limite medio superiore delle concentrazioni di elementi nel sangue umano [95], rapporti di concentrazione Sangue/Placenta, e rapporti di concentrazione tra i dati ottenuti nel presente lavoro ("parte 2") e quelli medi ottenuti nel lavoro precedente [96] ("parte 1"). Le celle vuote indicano la mancanza di dati sulle concentrazioni degli elementi nel sangue [95].

Elem.	Concentrazione Ematica [ppb]	Placenta/Sangue	Parte 1/Parte 2
Na	3100000	2.4	1.79
Mg	31400	16.9	1.1
P	490000	23.3	0.9
K	3200000	1.83	1.9
Ca	135000	4.16	7.78
Cr	169	1.67	1.07
Mn	39.3	18.05	0.62
Fe	642000	0.92	0.79
Co			0.32
Ni			18.66
Cu	2190	2.26	1.12
Zn	7420	9.76	0.75
Ga	21	0.46	6.66
Se	119	13.10	0.44
Br			
Rb	2800	5.07	1
Sr	52.7	20.68	1.09
Mo	16.8	2.27	0.51
Cd			0.73
Ag			
Sn			8.08
Sb	726	0.01	0.2
I			
Ba	123	0.65	3.96
W			
Pt			
Hg			
Pb	48.9	5.28	0.49

Nel presente lavoro è stata analizzata anche la relazione esistente tra la concentrazione placentare di alcuni metalli e altri dati relativamente al quadro clinico e allo stile di vita, raccolti a seguito della somministrazione di un questionario ai

partecipanti (vedi Appendice). Si sottolinea che le informazioni che si possono ricavare sono del tutto dipendenti dal fatto che le pazienti arruolate abbiano risposto in modo accurato e veritiero alle domande che sono state loro sottoposte. Sono stati valutati gli effetti della patologia (presenza o assenza di GDM), dell'etnia (campioni di gestanti caucasiche rispetto a quelle non caucasiche), dell'età (considerando un valore mediano di 32 anni come discriminante tra i due gruppi), l'effetto del peso (considerando un valore di 70 kg come discriminante) e l'effetto imputabile all'attitudine al fumo. In Tabella 16 sono riportati i valori di *p*-Value ottenuti discriminando i campioni sulla base delle informazioni raccolte.

Considerando la valutazione dell'effetto della patologia sulla concentrazione placentare di alcuni metalli, si è deciso di eseguire un test Parametrico e un Test non Parametrico, in modo da evitare l'ottenimento di informazioni fuorvianti a causa della distribuzione non omogenea dei dati di concentrazione. Per ottenere dei risultati statistici accurati si dovrebbero considerare come significativi soltanto i risultati per cui entrambi i test danno lo stesso esito. Dalla Tabella 16 si osserva che Zn è l'unico elemento, tra quelli che presentano valori maggiori del LOQ, a risultare positivo sia al test parametrico che a quello non parametrico. Lo zinco, quindi, discrimina soggetti malati dai non malati, risultando mediamente più concentrato nei soggetti sani rispetto a quelli con diabete gestazionale. Tra gli elementi aventi concentrazioni comprese tra LOD e LOQ ve ne sono alcuni potenzialmente interessanti, vale a dire Hg, Sb e Se; tuttavia solo uno dei test indica la significatività di tali specie. Tra gli elementi compresi tra LC e LOD risultano essere significativi Ni e Cd; in questo caso si deve tenere in considerazione la limitata accuratezza di questa informazione, visti i limitati valori di concentrazione placentare misurati per questi elementi.

Ulteriori indagini sono state effettuate considerando la relazione tra la concentrazione delle specie metalliche nella placenta e la nazionalità. Si ricorda che lo sviluppo del GDM è legato all'etnia e pertanto alcune popolazioni, in particolare quelle originarie dell'Asia Meridionale (India, Pakistan, Bangladesh), Caraibi e Medio Oriente (Arabia Saudita, Emirati Arabi Uniti, Iraq, Giordania, Siria, Oman, Qatar, Kuwait, Libano, Egitto) sono più predisposte allo sviluppo di questa patologia rispetto ad altri gruppi etnici, come ad esempio quello caucasico.

Dalla valutazione statistica, si ricava che le gestanti italiane presentano valori significativamente differenti (*p*-value piccoli) per alcuni metalli pesanti, in particolare per Pb, Ni, Cd e Hg. I primi tre sono significativamente minori nelle donne italiane,

mentre Hg risulta maggiore (Tabella 17). Tali differenze sono evidentemente da attribuirsi alla dieta e/o all'effetto dovuto all'esposizione a condizioni ambientali diverse.

Considerato, inoltre, che la maggior parte delle placenti italiane appartiene a soggetti sani, appare evidente come l'effetto di Ni, Cd e Hg interferisca con quello evidenziato prima a carico della patologia e, pertanto, considerato anche il numero limitato di campioni analizzati, tali elementi non sono in grado di discriminare tra soggetti con GDM e soggetti sani. Per avere una visione più reale e accurata è necessario implementare i dati con altri provenienti da pazienti italiane affette da GDM e partorienti sane non italiane.

Il parametro "etnia", cioè la differenza tra caucasici (propriamente gli europei e i nord-africani) ed il resto delle partorienti, risulta poco significativo in quanto il campionamento dei non caucasici si ferma attualmente a 4 gestanti. Si evidenziano tuttavia *p*-value ridotti per Rb, Sn, Pb, e I, che comunque sono elementi non significativi per il GDM. Tra gli elementi con concentrazioni minori del LOD appare molto significativo Ag e parzialmente significativo Ni (ad esempio, Ag è 260 volte maggiore nelle pazienti caucasiche rispetto a quelle non caucasiche, Tabella 17). L'effetto del Ni sulla patologia è quindi ulteriormente messo in discussione.

Il parametro "età" risulta essere discriminante per Rb, Pb e Hg.

Il parametro "peso" è molto interessante poiché si osservano numerose differenze a livello elementare. Gli elementi statisticamente differenti sono Cr, Mn, Fe, Co, Zn (molto significativo, poiché il *p*-value è molto minore di 0.05), Sb, Hg, Li e Ni. Questo parametro, inoltre, è altamente correlato con la patologia, poiché l'aumento dei livelli di grasso corporeo comporta anche un aumento dell'insulino-resistenza.

Il parametro "fumo" non fornisce risultati significativi, poiché solo 4 pazienti risultano essere fumatrici e inoltre non è stato considerato il fumo passivo.

Oltre a queste considerazioni, si deve osservare che vi sono dei campioni che presentano valori anomali per alcuni elementi, che comportano uno spostamento dei risultati medi e una minore significatività delle evidenze statistiche. Ad esempio, le placenti delle gestanti 8, 10, 19 e 30 presentano alti livelli di Co, mentre altre pazienti presentano valori molto più bassi; anche per I si hanno valori relativamente elevati in alcuni casi e inferiori all'LC in altri; come già visto, questi casi rappresentano

distribuzioni non parametriche la cui trattazione statistica deve essere affrontata con cautela.

Tabella 16: *p*-Value degli elementi ottenuti considerando i fattori clinici e relativi allo stile di vita. “GDM par” indica il test parametrico, “GDM non par” il test non parametrico; ITA/RESTO discrimina tra pazienti italiane e non italiane, CAUCASICI/RESTO tra pazienti di razza caucasica e non caucasica, ETA’ tra pazienti di età maggiore e minore di 32 anni, PESO tra pazienti di peso maggiore o minore di 70 kg, FUMATRICI tra fumatrici e non fumatrici. *a indica dati anomali, mentre *d indica un’anomalia nella distribuzione.

<i>p</i> -value	GDM Par	GDM non Par	ITA/RESTO	CAUCASICI/RESTO	ETA’ (>32)	PESO (<70)	FUMATRICI
B	0.39	0.40	0.41	0.37	0.15	0.33	0.21
Na	0.17	0.44	0.46	0.38	0.26	0.29	0.11
Mg	0.18	0.10	0.41	0.36	0.33	0.13	0.13
Al	0.47	0.16	0.40	0.07	0.24	0.14	0.35
Si	0.19	0.42	0.10	0.13	0.22	0.10	0.39
P	0.30	0.11	0.50	0.44	0.36	0.12	0.19
S	0.25	0.07	0.23	0.32	0.39	0.44	0.48
K	0.27	0.38	0.38	0.32	0.25	0.27	0.06
Ca	0.45	0.32	0.47	0.31	0.41	0.48	0.22
Ti	0.05*a	0.41	0.16	0.37	0.21	0.47	0.05
Cr	0.18	0.37	0.32	0.25	0.28	0.04	0.09
Mn	0.22	0.38	0.32	0.10	0.12	0.04	0.03
Fe	0.21	0.08	0.49	0.25	0.29	0.03	0.13
Co	0.25	0.50	0.41	0.11	0.22	0.05	0.04
Cu	0.24	0.26	0.25	0.32	0.24	0.44	0.32
Zn	0.05	0.04	0.45	0.41	0.34	0.00	0.05
Br	0.17	0.44	0.35	0.22	0.21	0.48	0.04
Rb	0.48	0.46	0.17	0.02	0.05	0.14	0.26
Sr	0.39	0.48	0.32	0.46	0.48	0.48	0.19
Mo	0.46	0.16	0.42	0.11	0.34	0.14	0.24
Sn	0.19	0.48	0.07	0.02	0.39	0.15	0.28
W	0.09*d	0.46	0.25	0.16	0.45	0.41	0.47
Pb	0.34	0.40	0.05	0.02	0.06	0.29	0.40
Se	0.15	0.03	0.12	0.44	0.18	0.11	0.45
Zr	0.25	0.13	0.34	0.04	0.26	0.13	0.32
Sb	0.03*ad	0.42	0.15	0.23	0.24	0.09	0.11
I	0.20	0.46	0.11	0.04	0.49	0.43	0.22
Pt	0.45	0.44	0.30	0.28	0.19	0.46	0.41
Hg	0.02*a	0.07	0.01	0.39	0.03	0.04	0.08
Li	0.44	0.23	0.33	0.44	0.20	0.07	0.16
Ni	0.01	0.02	0.02	0.09	0.14	0.03	0.35
Ga	0.25	0.20	0.44	0.11	0.18	0.34	0.35
Cd	0.02	0.03	0.03	0.22	0.39	0.28	0.09
Ag	0.13	0.22	0.28	0.00	0.48	0.39	0.37
Ba	0.21	0.50	0.39	0.23	0.28	0.50	0.28

Tabella 17: Tabella riportante il rapporto tra le concentrazioni media di un elemento nei campioni di controllo e tra la concentrazione media dello stesso elemento nei campioni ottenuti da gestanti con GDM, relativamente ai vari parametri clinici e sullo stile di vita.

MEDIA	GDM (NO/SI)	ITA /RESTO	CAUCASICI /RESTO	ETA <32/>32	PESO <70/>70	FUMATORI (No/si)
B	4.1	4.0	0.9	0.8	4.1	0.9
Na	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9
Mg	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	0.8
Al	4.0	4.0	0.8	0.9	4.1	4.0
Si	0.7	0.7	1.3	0.8	1.6	0.9
P	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	0.9
S	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
K	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9
Ca	1.0	1.0	1.3	0.9	1.0	0.7
Ti	2.0	4.7	0.9	0.7	4.0	4.7
Cr	0.5	0.7	1.5	0.7	0.3	2.0
Mn	0.9	0.9	1.2	0.9	0.8	1.2
Fe	0.9	1.0	1.1	1.1	0.8	1.1
Co	0.5	0.8	7.2	0.4	0.0	92.5
Cu	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Zn	1.02	1.0	1.0	1.0	1.1	0.9
Br	1.1	1.0	1.1	1.1	1.0	0.8
Rb	1.0	0.9	0.8	1.2	1.1	1.1
Sr	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	0.6
Mo	1.0	0.9	0.6	0.9	1.4	0.7
Sn	0.6	0.5	2.7	0.9	1.8	1.2
W	2.3	1.5	0.4	0.9	1.1	1.1
Pb	0.9	0.6	2.0	1.8	1.2	1.1
Se	1.1	1.1	1.0	0.9	1.1	1.0
Zr	0.9	0.9	0.8	0.9	4.2	4.1
Sb	3.4	2.0	0.5	0.7	2.3	1.7
I	2.0	3.2	4.5	1.0	1.1	0.4
Pt	1.1	1.5	0.4	0.5	1.1	0.8
Hg	1.9	2.4	1.1	0.5	1.8	2.2
Li	1.1	1.2	0.9	0.8	1.6	0.8
Ni	0.1	0.2	0.2	2.2	0.2	1.3
Ga	0.7	0.9	2.6	0.6	1.2	0.8
Cd	0.7	0.7	0.9	1.0	0.9	1.2
Ag	2.0	1.5	260.2	1.0	1.2	0.9
Ba	0.7	0.9	1.6	0.8	1.0	0.7

8.2.1 -Analisi delle Componenti Principali

I dati provenienti dalle analisi ICP-MS del tessuto placentare sono stati anche sottoposti a PCA. In Figura 42 sono riportati gli andamenti relativi agli elementi più significativi e maggiormente discriminanti per il GDM. Le informazioni ottenute per Zn, Hg, Cd, Ni, Fe, Co e Mn sono ben rappresentate dalle componenti *Factor 1* e *Factor 2*, se si considera il modulo dei relativi vettori. Per Mn, Co, Cr, Fe e Zn si ottiene un recupero dell'informazione pari al 100%, mentre Ni e Hg presentano un valore del 50%. I test di

blocco hanno evidenziato che le altre componenti principali non contengono ulteriori informazioni significative.

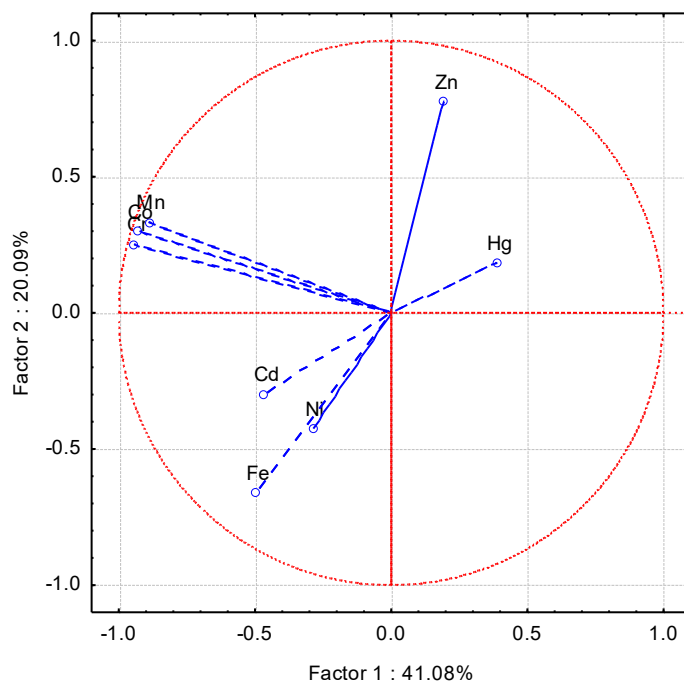


Figura 42: Grafico dei *Loadings* ottenuto considerando gli elementi chimici più significativi per il GDM.

In Figura 43 è riportato il grafico degli *Scores* ottenuto valutando come discriminante il fatto che un soggetto sia sano oppure affetto da GDM. Generalmente, le gestanti sane (indicate con N) sono rappresentate in un unico quadrante del grafico, mentre le donne che hanno sviluppato diabete gestazionale (S) formano un altro cluster, confinato in una posizione diversa.

La posizione di un determinato oggetto nel piano fornisce informazioni riguardo la sua correlazione con le due componenti principali, a loro volta correlate con le diverse variabili (elementi) secondo quanto riportato nella Figura 42. Ad esempio, se si considera il dato relativo a Zn, si possono evidenziare, in Figura 43, i campioni di tessuto placentare caratterizzati da una maggiore concentrazione di questo elemento: la concentrazione risulterà essere massima nel quadrante con coordinate Factor 1 e Factor 2 positive, e minima nei campioni con coordinate Factor 1 e Factor 2 entrambe negative.

La posizione del Co, come osservato in precedenza, indica la presenza di risultati anomali poiché esistono dei campioni che presentano concentrazioni estremamente più elevate rispetto ad altri.

Per quanto riguarda Cd, Ni, Fe, essi risultano più concentrati considerando la direzione nella quale si sviluppa il cluster delle pazienti affette da GDM, per cui questi

metalli possono discriminare il gruppo dei pazienti GDM rispetto ai sani. E' anche interessante notare che il gruppo N (sani) è rivolto verso il vettore dello Zn.

I punti di domanda che si notano sulla destra del grafico rappresentano la variabilità della procedura analitica; questi risultano essere confinati in uno spazio molto piccolo e pertanto è possibile concludere che la variabilità della procedura analitica è trascurabile rispetto alla variabilità dei campioni (se non per alcuni elementi visti prima).

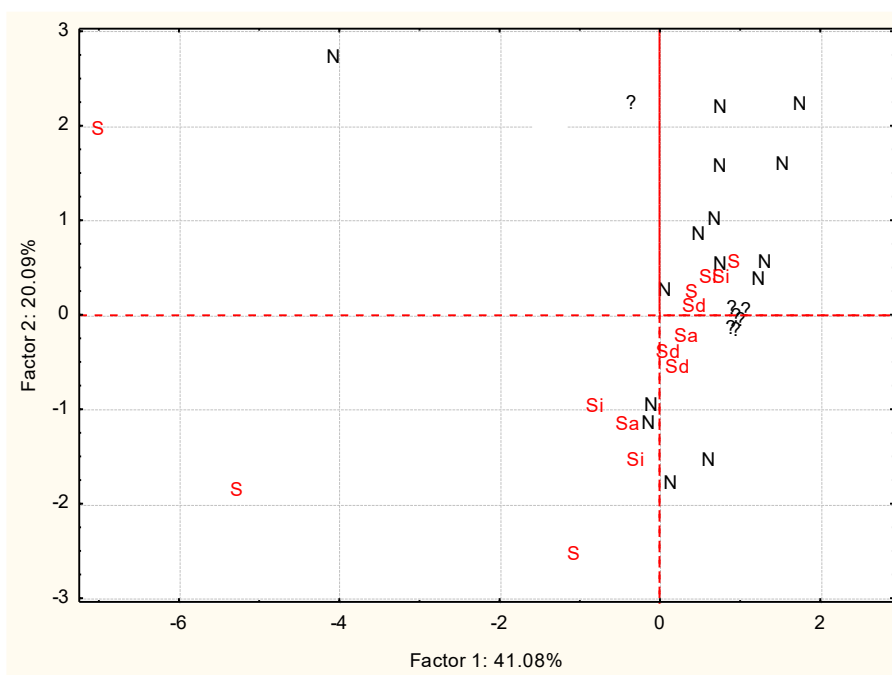
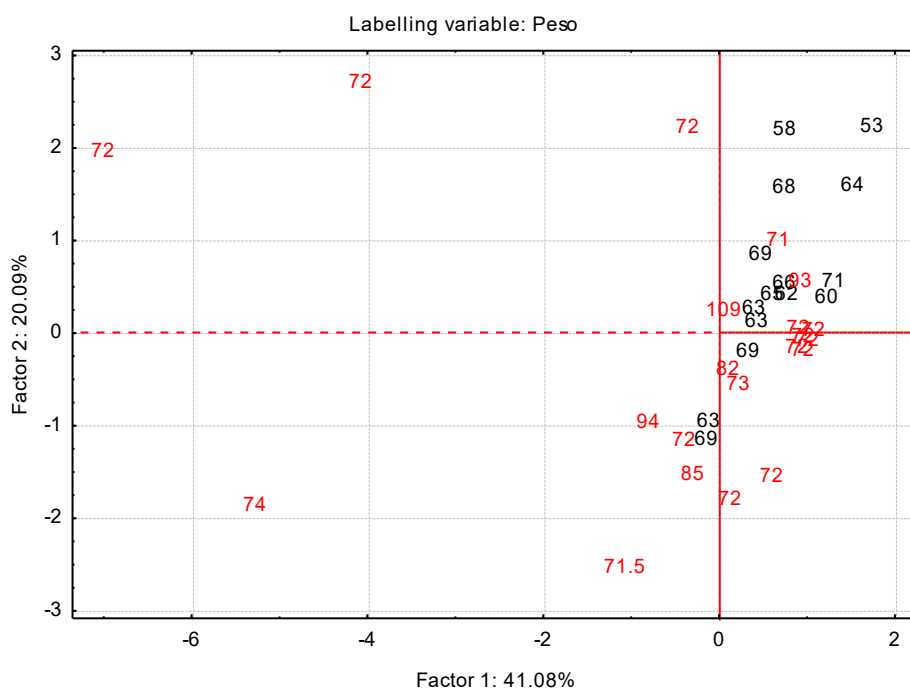


Figura 43: Grafico degli Score, pazienti GDM vs. gestanti sane.

La Figura 44 riporta la distribuzione dei campioni analizzati in base all'etnia (Paese di provenienza). Come osservato in precedenza, si nota che a causa del campionamento, le pazienti italiane formano un cluster a parte di gestanti sane, mentre le partorienti non italiane formano un ulteriore cluster, caratteristico delle pazienti affette da GDM. Si evidenzia, inoltre, che i campioni con elevate concentrazioni di Cd sono rispettivamente di origine albanese, marocchina e nigeriana. E' necessario, quindi, valutare attentamente il ruolo del cadmio per quanto riguarda la sua correlazione la fisio-patologia del diabete gestazionale e chiarire quali possano essere le fonti ambientali, che a seguito di esposizione, causano un accumulo di questo elemento a livello placentare.

In Figura 46 sono confermate anche le evidenze che si erano notate considerando il peso. In generale, si può affermare che pazienti con peso maggiore di 70 kg hanno una maggiore tendenza a sviluppare GDM, mentre le gestanti con peso inferiore a 70 kg sono solitamente comprese nel cluster dei soggetti sani.



fumo. Alcuni elementi, quali Ni, Cd e Zn, risultano in qualche modo associati al diabete gestazionale, ma il loro effettivo livello di significatività deve essere valutato attentamente considerando anche gli altri fattori presi in considerazione.

Pertanto, i risultati ottenuti sebbene siano molto interessanti perché hanno permesso di caratterizzare il tessuto placentare e hanno confermato la robustezza del metodo di campionamento, non forniscono informazioni sicure relativamente alle modificazioni del metalloma in presenza di diabete gestazionale. La raccolta e l'analisi di ulteriori campioni, già in corso, permetterà di chiarire l'effetto delle specie metalliche in relazione allo stile di vita dei soggetti reclutati e in relazione allo sviluppo del diabete gestazionale.

9 – Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stato analizzato il tessuto placentare mediante un approccio proteomico e metallomico. Attraverso un'analisi differenziale sono state messe in evidenza alcune specie proteiche e alcuni metalli che mostrano un'alterazione della relativa concentrazione tissutale in placentate provenienti da gestanti con diabete gestazionale rispetto a gestanti sane.

Le analisi di proteomica sono state effettuate con un approccio di tipo *bottom-up*, analizzando i campioni tramite elettroforesi bidimensionale e LC-MS^E. Quest'ultima ha permesso di identificare efficacemente 155 proteine placentari, delle quali 19 risultano avere un'espressione alterata nelle placente GDM rispetto alle placente sane; in particolare 9 specie proteiche risultano sotto-espresse nel tessuto proveniente da gestanti con diabete gestazionale, mentre 10 sono sovra-espresse. Entrambi gli approcci sperimentali, ovvero elettroforesi bidimensionale e LC-MS^E, hanno evidenziato un incremento dei livelli di somatomammotropina corionica e una diminuzione della concentrazione delle catene alfa, beta e gamma del fibrinogeno e di *Tubulointerstitial nephritis antigen-like* nelle placente complicate da GDM. Sono state identificate anche altre specie proteiche presentanti un'alterata espressione relativamente al diabete gestazionale, ma non sono state confermate da entrambi i metodi analitici; in particolare, l'elettroforesi bidimensionale ha evidenziato una modificazione dei livelli placentari della concentrazione di α -collagene, mentre una diversa concentrazione tissutale di *Protein disulfide isomerase* tra la placente GDM e placente sane è stata rivelata mediante l'approccio LC-MS^E. Le analisi di MALDI *imaging* hanno mostrato una diversa distribuzione a livello tissutale, confrontando il lato fetale e materno della placenta, di alcune specie proteiche con peso molecolare compreso tra 20 kDa e 40 kDa; tuttavia per queste proteine non è stato possibile eseguire nessun tipo di identificazione. Con questo approccio non sono invece state evidenziate alterazioni nella distribuzione spaziale di specie proteiche tra placente GDM e placente sane. Le analisi iniziali, relative allo studio del profilo proteico della placenta con spettrometria di massa MALDI-MS hanno inoltre confermato l'importanza di effettuare un corretto campionamento del tessuto, al fine di rimuovere quanto più tessuto ematico possibile, evitando di alterare la composizione proteica della placenta stessa.

Lo studio eseguito su campioni di linfociti provenienti da sangue cordonale ha rivelato una sovra-espressioni di marker pro-apoptotici nel caso di neonati nati da madre affetta da diabete gestazionale rispetto ai neonati nati da madri sane.

Le analisi di metallomica hanno permesso di quantificare accuratamente 32 specie metalliche presenti nel tessuto placentare. Le concentrazioni placentari di selenio e cadmio risultano essere significativamente alterate, in particolare la quantità di selenio è maggiore nel tessuto placentare proveniente da gestanti con GDM, mentre il cadmio mostra un andamento contrario. Considerando la biochimica di questi elementi, è stato ipotizzato che la placenta sia in grado di pre-concentrare il selenio al fine di ridurre lo stress ossidativo e la produzione di ROS caratteristici della patologia diabetica. Ultimamente, inoltre, sono state effettuate ulteriori analisi di metallomica su un nuovo set di campioni; queste ultime indagini hanno nuovamente evidenziato l'importanza della fase di campionamento e hanno mostrato come al fine di ottenere risultati significativi e robusti in applicazioni omiche sia necessario non solo tenere in considerazione la patologia, ma sia di fondamentale importanza arricchire i dati sperimentali con le informazioni comportamentali e relative allo stile di vita dei soggetti arruolati per lo studio.

Concludendo, questo studio ha dimostrato la presenza a livello placentare di proteine e specie metalliche alterate in presenza di diabete gestazione rispetto ai controlli. Le specie di interesse sono possibili candidati bio-marcatori per il diabete gestazionale; ulteriori studi saranno effettuati per validare la robustezza e l'accuratezza delle informazioni ottenute da questo lavoro e per implementare i risultati ottenuti in applicazioni cliniche atte allo sviluppo di nuovi test clinici per la diagnosi del diabete gestazionale e per la valutazione degli interventi medici, al fine di assicurare un miglioramento significativo delle condizioni di salute di madre e bambino e di prevenire i numerosi esiti negativi a lungo termine causati dalla patologia.

Appendice

Si riporta il questionario somministrato alle gestanti partecipanti allo studio.

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA - AZIENDA OSPEDALIERA DI PADOVA
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SALUTE DELLA DONNA E DEL BAMBINO
U.O.C. CLINICA OSTETRICA GINECOLOGICA
Direttore: Prof. Giovanni B. Nardelli

Diabete gestazionale: valutazione del profilo vascolare, metabolico, metabolomico e proteomico nella coppia madre-feto

SCHEDA RACCOLTA DATI

CODICE PAZIENTE:

NOME:

COGNOME:

ETA':

DATA E LUOGO DI NASCITA:

N. NOSOLOGICA:

RESIDENZA/DOMICILIO:

N. TELEFONO:

ANAMNESI FAMILIARE

Presenza in famiglia di:

- Ipertensione
- Diabete Mellito
- Ipercolesterolemia
- Ipertrigliceridemia
- Eventi cardiovascolari
- Malattie Renali e/o Insufficienza Renale
- Altre anomalie del metabolismo/Fattori di rischio cardiovascolari

ANAMNESI FISIOLGICA

Peso basale:

Peso attuale:

Aumento ponderale in gravidanza:

Altezza:

Etnia/Razza:

- Fumo (n°/die):
- Dieta/alimentazione:

CAMPIONI RACCOLTI

1. sangue materno	OCRA	LILLA	VERDE	ROSSA
2. urine materne	SI	NO		
3. liquido amniotico	SI	NO		
4. sangue cordonale	OCRA	LILLA	VERDE	ROSSA
5. urine neonato	SI	NO		
6. prelievo placenta		SI	NO	
Invio placenta per esame istologico	SI		NO	

Bibliografia

- [1] M. Goldman, «The innovative medicines initiative: a European response to the innovation challenge,» *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, vol. 91, n. 3, pp. 418-425, 2012.
- [2] F. Di Girolamo, I. Lante, M. Muraca e L. Putignani, «The role of mass spectrometry in the "Omics" era,» *Curr Org Chem*, vol. 17, pp. 2891-2905, 2013.
- [3] J. Hernandez-Nunez e M. Valdés-Yong, «Utility of proteomics in obstetric disorders: a review,» *International Journal of Women's Health*, vol. 7, p. 385, 2015.
- [4] C. D.-G. E. R. J. S. K. Abdallah, «Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance.,» *International Journal of Plant Genomics*, 2012.
- [5] H. M. Georgiou, M. Lappas, G. M. Georgiou, A. Marita, V. J. Bryant, R. Hiscock e G. E. Rice, «Screening for biomarker predictive of gestational diabetes mellitus,» *Acta Diabetologica*, vol. 45, n. 3, pp. 157-165, 2008.
- [6] B. Liu, Y. Xu, C. Voss, F. H. Qiu, M. Z. Zhao, Y. D. Liu, w e Z. L. Wang, «Altered protein expression in gestational diabetes mellitus placentas provides insight into insulin resistance and coagulation/fibrinolysis pathways,» *Plos One*, vol. 7, n. 9, p. e44701, 2012.
- [7] A. Singh, E. Subramani, C. Ray, S. Rapole e k. Chaudhury, «Proteomic-driven biomarker discovery in gestational diabetes mellitus: a review,» *Journal of Proteomics*, vol. 127, pp. 44-49, 2015.
- [8] K. Benirschke e P. Kaufmann, *Pathology of the human placenta*. Third edition., Springer-Verlag, 1995.
- [9] A. Pasca e A. Penn, «The placenta: the lost neuroendocrine organe,» *NeoReviews*, vol. 11, pp. 64-77, 2010.
- [10] H. Kliman, «Placental hormones. Infertility and reproductive med,» *Infertility and reproductive medicine clinics of North America*, vol. 5, pp. 591-610, 1994.
- [11] H. Kliman, «Trophoblast infiltration.,» *Reprod Med Rev*, vol. 3, pp. 137-157, 1994.
- [12] H. Kliman, «The placenta revealed,» *Amer J Pathol*, vol. 143, pp. 332-336, 1993.

- [13] K. Benirschke e P. Kaufmann, *The human placenta.*, Cambridge, 1970.
- [14] A. D. Association, «Detection and diagnosis of gestational diabetes mellitus,» *Diabetes Care*, vol. 35, pp. s15-s16, 2011.
- [15] E. A. Ryan e L. Enns, «Role of gestationale hormones in the induction of insuline resistance,» *J Clin Endocrinol*, vol. 67, pp. 341-347, 1988.
- [16] C. Kuhl, «Etiology and pathogenesis of gestational diabetes,» *Diabetes Care*, vol. 21, pp. B19-B26, 1998.
- [17] A. Lapolla, M. G. Dalfrà e G. Mello, «Early detection of insulin sensitivity and beta cell function with simple tests indicate future derangements in late pregnancy,» *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 93, n. 3, pp. 876-880, 2008.
- [18] A. Lapolla, M. G. Dalfrà e D. Fedele, «Management of gestational diabetes mellitus,» *Diabetes Metab Syndr Obes*, vol. 2, pp. 73-82, 2009.
- [19] C. Kim, K. M. Newton e R. H. Knoop, «Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes,» *Diabetes Care*, vol. 25, pp. 1862-1868, 2002.
- [20] T. H. S. C. R. Group, «Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes,» *N Engl J Med*, vol. 358, pp. 1991-2002, 2008.
- [21] I. A. o. D. a. P. S. Groups, «Recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel,» *Diabetes Care*, vol. 33, pp. 676-682, 2010.
- [22] AMD-DIS, «Standard Italiani per la cura deò diabete mellito 2014,» [Online]. Available: www.standarditaliani.it.
- [23] O. Langer, J. G. Umans e M. Miodovnik, «The proposed GDM diagnostic criteria: a difference, to be a difference, must take a difference,» *J Matern Fetal Neonatal Med*, vol. 26, pp. 111-115, 2013.
- [24] B. Pintaudi, G. Di Vieste e F. Corrado, «Improvement of selective screening strategy for gestational diabetes through a more accurate definition oh high risk group,» *Eur J Endocrinol*, vol. 170, pp. 87-93, 2013.
- [25] A. Lapolla, M. G. Dalfrà e E. Ragazzi, «New International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) recommendations for diagnosing gestational diabetes compared with former criteria: a retrospective study on pregnancy outcome,» *Diabet Med*, vol. 28, pp. 1074-1077, 2011.

- [26] A. Lapolla, M. G. Dalfrà e M. Bonomo, «Gestational diabetes mellitus in Italy: a multicenter study,» *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, vol. 145, pp. 149-153, 2009.
- [27] A. D. Garnica e W. J. Chan, «The role of the placenta in fetal nutrition and growth,» *J Am Coll Nutr*, vol. 15, pp. 206-222, 1996.
- [28] M. Desforges, C. P. Sibley e ., «Placental nutrient supply and fetal growth,» *Int J Dev Biol*, vol. 54, pp. 377-390, 2010.
- [29] G. Desoye, M. Hartmann e A. Blaschitz, «Insulin receptors in syncytiotrophoblast and fetal endothelium of human placenta. Immunohistochemical evidence for developmental changes in distribution pattern,» *Histochemistry*, vol. 101, pp. 277-285, 1994.
- [30] J. Bodner, C. F. Ebenbichler e H. J. Wolf, «Leptin receptor in human term placenta: in situ hybridization and immunohistochemical localization,» *Placenta*, vol. 20, pp. 677-682, 1999.
- [31] G. Daskalakis, S. Marinopoulos e V. Krielesi, «Placental pathology in women with gestational diabetes,» *Acta Obstet Gynecol Scand*, vol. 87, pp. 403-407, 2008.
- [32] U. M. Schafer-Graf, J. Dupak e M. Vogel, «Hyperinsulinism, neonatal obesity and placenta immaturity in infants born to women with one abnormal glucose tolerance test value,» *J Perinat Med*, vol. 26, pp. 27-36, 1998.
- [33] I. M. Calderon, D. Damasceno e R. L. Amorin, «Morphometric study of placental villi and vessels in women with mild hyperglycemia or gestational or overt diabetes,» *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 78, pp. 65-71, 2007.
- [34] L. P. Reynolds e D. A. Redmer, «Angiogenesis in placenta,» *Bio Reprod*, vol. 64, pp. 1033-1040, 2001.
- [35] O. Grissa, A. Yessoufou e I. Mrisak, «Growth factor concentrations and their placental mRNA expression are modulated in gestational diabetes mellitus: possible interactions with macrosomia,» *BMC Pregnancy Childbirth*, vol. 10, p. 7, 2010.
- [36] S. J. Holdsworth-Carson, R. Lim e A. Mitton, «Peroxisome proliferator-activated receptors are altered in pathologies of the human placenta: gestational diabetes mellitus, intrauterine growth restriction and preeclampsia,» *Placenta*, vol. 31, pp. 222-229, 2010.

- [37] M. O. Babawale, S. Lovat e T. M. e. a. Mayhew, «Effects of gestational diabetes on junctional adhesion molecules in human term placenta vasculature,» *Diabetologia*, vol. 43, pp. 1185-1196, 2000.
- [38] M. T. Coughlan, K. Oliva e H. M. e. a. Georgiou, «Glucose-induced release of tumor necrosis factor-alpha from human placental and adipose tissue in gestational diabetes mellitus,» *Diabet Med*, vol. 18, pp. 921-927, 2001.
- [39] M. Gauster, G. Desoye e M. e. a. Totsch, «The placenta and gestational diabetes mellitus,» *Curr Diab Rep*, vol. 12, pp. 16-23, 2012.
- [40] B. Cole, *Electrospray and MALDI mass spectrometry*, Wiley, 2010.
- [41] J. Lewis, J. Wei e G. Siuzdak, «Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis,» *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 5880-94, 2000.
- [42] K. Dreisewerd, M. Schurenberg, M. Karas e F. Hillenkamp, «Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile,» *Int J Mass Spectrom Ion Proc*, vol. 141, pp. 127-148, 1995.
- [43] G. Westmacott, W. Ens, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd e M. Schurenberg, «The influence of laser fluence on ion yield in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry,» *Int J Mass Spectrom*, vol. 221, pp. 67-81, 2002.
- [44] C. Menzel, K. Dreisewerd, S. Berkenkamp e F. Hillenkamp, «The role of the laser pulse duration in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry,» *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 13, pp. 975-984, 2002.
- [45] S. Berkenkamp, C. Menzel, F. Hillenkamp e K. Dreisewerd, «Measurement of mean initial velocity of analyte and matrix ions in infrared matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry,» *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 13, pp. 209-220, 2002.
- [46] P. Juhasz, M. Vestal e S. A. Martin, «On the initial velocity of ions generated by matrix-assisted laser desorption ionization and its effect on the calibration of delayed extraction time-of-flight mass spectra,» *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 8, pp. 209-217, 1997.
- [47] M. Karas, U. Bahr, I. Fournier, M. Gluckmann e A. Pfenninger, «The initial ion velocity as a marker for different desorption-ionization mechanisms in MALDI,» *Int J Mass Spectrom*, vol. 226, pp. 239-248, 2003.

- [48] V. Horneffer, K. Dreisewerd, H. C. Ludemann, F. Hollenkamp, M. Lage e K. Strupat, «Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry?», *Int J Mass Spectrom*, vol. 185, pp. 859-870, 1999.
- [49] M. Gluckmann, A. Pfenninger, R. Kruger, M. Thierolf, M. Karas, V. Horneffer, F. Hillenkamp e K. Strupat, «Mechanisms in MALDI analysis: surface ionization or incorporation of analytes?», *Int J Mass Spectrom*, vol. 210, pp. 121-132, 2001.
- [50] M. Karas, M. Gluckmann e J. Schafer, «Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors», *J Mass Spectrom*, vol. 35, pp. 1-12, 2000.
- [51] N. Medina, T. Huth-Fehre, A. Westman e B. Sundqvist, «Matrix-assisted laser desorption: dependence of the threshold fluence on analyte concentration», *Org Mass Spectrom*, vol. 29, pp. 207-209, 1994.
- [52] A. P. Quist, T. Huth-Fehre e B. Sundqvist, «Total yield measurements in matrix-assisted laser desorption using a quartz crystal microbalance», *Rapid Commun Mass Spectrom*, vol. 8, pp. 149-154, 1994.
- [53] M. Stoeckli, P. Chaurand, D. Hallahan e R. Caprioli, «Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissue.», *Nature Medicine*, vol. 7, pp. 493-496, 2001.
- [54] K. Schwamborn e R. Caprioli, «MALDI imaging mass spectrometry - painting molecular pictures», *Mol Oncology*, vol. 4, pp. 529-538, 2010.
- [55] L. McDonnell e R. Heeren, «Imaging mass spectrometry», *Mass Spectrom Rev*, vol. 26, pp. 606-643, 2007.
- [56] S. Hanash, «Disease proteomics», *Nature*, vol. 422, pp. 226-232, 2003.
- [57] E. O. S. Seeley, D. Mi, P. Chaurand e R. Caprioli, «Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment to tissue sections.», *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 19, pp. 1069-77, 2008.
- [58] N. Zaima, T. Hayasaka, G.-I. N. e M. Setou, «Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry», *Int J Mol Sci*, vol. 11, pp. 5040-55, 2010.
- [59] J. Norris, D. Cornett, J. Mobley, M. Andersson, E. Seeley, P. Chaurand e R. Caprioli, «Processing MALDI mass spectra to improve mass spectral direct tissue analysis.», *Int J Mass Spectrom*, vol. 260, pp. 212-221, 2007.

- [60] D. A. Skoog, F. S. Holler e S. R. Crouch, *Chimica Analitica Strumentale*, Napoli: Edises, 2009, pp. 254-269.
- [61] M. Roverso, *Sviluppo di un metodo analitico per la valutazione dei cambiamenti a livello proteico indotti sul tessuto placentare da diabete gestazionale*, 2012.
- [62] A. Lapolla, S. Porcu, M. Roverso, G. Desoye, C. Cosma, G. Bogana, M. Carrozzini, G. B. Nardelli e P. Traldi, «A preliminary investigation on placenta protein profile reveals only modest changes in well controlled gestational diabetes mellitus,» *European Journal of Mass Spectrometry*, vol. 19, n. 3, pp. 211-223, 2013.
- [63] E. Kohne, D. Krause, D. Leupold e Kleihauer E., «Hemoglobin F Koelliker (alpha2 minus 141 (HC 3) Arg gamma2); a modification of fetal hemoglobin,» *Hemoglobin*, vol. 1, n. 3, pp. 257-266, 1977.
- [64] P. Chaurand, S. A. Scheartz e R. M. Caprioli, «Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptide and proteins in mammalian tissue sections,» *Curr Opin Chem Biol*, vol. 7, n. 1, pp. 676-681, 2002.
- [65] A. Thomas, N. H. Patterson, J. Laveaux Charbonneau e P. Chaurand, «Orthogonal organic and aqueous-based washes of tissue sections to enhance protein sensitivity by MALDI imaging mass spectrometry,» *J Mass Spectrom*, vol. 48, pp. 42-48, 2013.
- [66] L. Molin, S. Cristoni, S. Crotti, L. Bernardi, R. Seraglia e P. Traldi, «Sieve-based device for MALDI sample preparation. I. Influence of sample deposition conditions in oligonucleotide analysis to achieve significant increases in both sensitivity and resolution,» *J Mass Spectrom*, vol. 43, pp. 1512-20, 2008.
- [67] Y. Ishihama, Y. Oda, T. Tabata, T. Sato, T. Nagasu, J. Rappsilber e M. Mann, «Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein,» *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 4, n. 9, pp. 1265-1272, 2005.
- [68] M. Takada, Y. Ban, G. Yamamoto e T. e. a. Ueda, «Periostin, discovered by nano-flow liquid chromatography and mass spectrometry, is a novel marker of diabetic retinopathy,» *Biochem Bioph Res Co*, vol. 399, pp. 221-226, 2010.

- [69] M. Morelli, R. Misaggi, A. Di Cello, V. Zuccalà, F. Costanzo, F. Zullo e B. Quaresima, «Tissue expression and serum levels of periostin during pregnancy: a new biomarker of embryo-endometrial cross talk at implantation,» *Eur J Obstet Gyn R B*, vol. 175, pp. 140-144, 2014.
- [70] H. Sasaki, J. Roberts, D. Lykins, Y. Fujii, D. Auclair e L. B. Chen, «Novel chemiluminescence assay for serum periostin levels in women with preeclampsia and in normotensive pregnant women,» *Am J Obstet Gynecol*, vol. 186, pp. 103-108, 2002.
- [71] R. Goyal, S. M. Yellon, L. D. Longo e E. Mata-Greenwood, «Placental gene expression in rats model of placental insufficiency,» *Placenta*, vol. 31, pp. 568-575, 2010.
- [72] S. Palani, N. M. Joseph, Y. Tegene, A. Zacharia e T. Marew, «Gestational diabetes: a review,» *J Glob Trends Pharmaceutical Sciences*, vol. 5, pp. 1673-1683, 2014.
- [73] S. M. Blois, B. Y. Gueuvoghlian-Silva, I. Tirado-Gonzalez, M. R. Torloni, N. Freitag, R. Mattar e M. L. e. a. Conrad, «Getting to sweet: galectin-1 dysregulation in gestational diabetes mellitus,» *Mol Hum Reprod*, vol. 20, pp. 644-649, 2014.
- [74] F. Tarquini, R. Tiribuzi, L. Crispoltoni, S. Porcellati, A. M. Del Pino, A. Orlicchio e G. Di Renzo, «Caspase 3 activation and PARP cleavage in lymphocytes from newborn babies of diabetic mothers with unbalanced glycaemic control,» *Cell Biochemistry and Function*, vol. 32, n. 1, pp. 87-95, 2014.
- [75] D. M. Hughes, D. Grégoire, H. Naka e C. L. Chakrabarti, «The vaporization of phosphorus compounds and the use of chemical modifiers for the determination of phosphorus by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry,» *Spectrochim Acta Part B*, vol. 52, pp. 517-529, 1997.
- [76] J. Odland, E. Nieboer, N. Romanova, Y. Thomassen, D. Hofoss e E. Lund, «Factor analysis of essential and toxic elements in human placentas from deliveries in arctic and subarctic areas of Russia and Norway,» *J Environ Monit*, vol. 3, pp. 177-184, 2001.
- [77] M. Kippler, A. M. Waheedul Hoque, R. Raqibb, H. Ohrvik, E. C. Ekstrom e M. Vahtera, «Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the

- transport of micronutrients to the fetus,» *Toxicol Let*, vol. 192, pp. 162-168, 2010.
- [78] C. Grant, G. Lahor, H. Fletcher, T. Potter, M. Vutchkov e M. Reid, «Elements in human placentae in Jamaica,» *West Indian Med J*, vol. 59, pp. 479-485, 2010.
- [79] P. C. Kruger, L. M. Schell, A. D. Stark e P. J. Parsons, «Lanthanide distribution in human placental tissue by membrane desolvation-ICP-MS,» *J Anal A Spectrom*, vol. 25, pp. 1298-1307, 2010.
- [80] P. Kruger, L. M. Schell, A. D. Stark e P. J. Parsons, «A study of the distribution of aluminium in human placental tissue based on alkaline solubilization with determination by electrothermal atomic absorption spectrometry,» *Metallomics*, vol. 2, pp. 585-660, 2010.
- [81] A. Serafim, R. Company, B. Lopes, J. Rosa, A. Cavaco, G. Castela, E. Castela, N. Olea e M. J. Bebiano, «Assessment of essential and nonessential metals and different metal exposure biomarkers in the human placenta in a population from the South of Portugal,» *J Toxicol Env Health A*, vol. 75, pp. 867-877, 2012.
- [82] K. Osman, A. Akesson, M. Berglund, K. Bremme, A. Schutz, K. Ask e M. Vahter, «Toxic and essential elements in placentas os Swedish Women,» *Clin Biochem*, vol. 33, pp. 131-138, 2000.
- [83] H. D. Mistry, F. B. Pipkin, C. W. G. Redman e L. Poston, «Selenium in reproductive health,» *Am J Obstet Gynecol*, vol. 206, pp. 21-30, 2012.
- [84] J. Pieczynska e H. Grajeta, «The role of selenium in human conception and pregnancy,» *J Trace Elem Med Biol*, vol. 29, pp. 31-38, 2015.
- [85] H. Steinbrenner, B. Speckmann, A. Pinto e H. Sies, «High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay between selenium and carbohydrate metabolism.,» *J Clin Biochem Nutr*, vol. 48, pp. 40-45, 2011.
- [86] S. Z. Ghaemi, S. Forouhari, M. R. Dabbaghmanesh, M. Sayadi, M. Bakhshayeshkaram, F. Vaziri e Z. Tavana, «A prospective study of selenium concentration and risk of preeclampsia in pregnant Iranian women: a nested case-control study,» *Biol Trace Elem Res.*, vol. 152, pp. 174-179, 2013.
- [87] G. Askari, B. Iraj, A. Salehi-Abargouei, A. A. Fallah e T. Jafari, «The association between serum selenium and gestational diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis,» *J Trace Elem Med Biol*, vol. 29, pp. 195-201, 2015.

- [88] X. Chen, T. O. Scholl, M. J. Leskiw, M. R. Donaldson e T. P. Stein, «Association of glutathione peroxidase activity with insulin resistance and dietary fat intake during normal pregnancy,» *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 88, pp. 5963-5968, 2003.
- [89] M. Kantola, R. Purkunen, P. Kroger, J. Tooming, J. Juravskaja, M. Pasanen, K. Seppanen, S. Saarikoski e T. Vartiainen, «Selenium in pregnancy: is selenium an active defective ion against environmental chemical stress?,» *Environ Res*, vol. 96, pp. 51-61, 2004.
- [90] R. F. Burk, G. E. Olson, K. E. Hill, V. P. Winfrey, A. K. Motley e S. Kurokawa, «Maternal-fetal transfer of selenium in the mouse,» *FASEB J*, vol. 27, pp. 3249-3256, 2013.
- [91] F. Thevenod e W. K. Lee, «Cadmium and cellular signaling cascades: interactions between cell death and survival pathways,» *Arch Toxicol*, vol. 87, pp. 1743-1786, 2013.
- [92] T. S. Nawrot, J. A. Staessen, H. A. Roels, E. Munters, A. Cuypers, T. Richart, A. Ruttens, K. Smeets, H. Clijsters e J. Vangronsveld, «Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention,» *BioMetals*, vol. 23, pp. 769-782, 2010.
- [93] J. Al-Saleh, R. Al-Rouqi, C. A. Obsun, N. Shinwari, A. Mashhour, G. Billedo, Y. Al-Sarraj e A. Rabbah, «Interaction between cadmium (Cd), selenium (Se) and oxidative stress biomarkers in healthy mothers and its impact on birth anthropometric measures,» *Int J Hyg Environ Health*, vol. 218, pp. 66-90, 2015.
- [94] T. Kawakami, K. Nishiyama, Y. Kadota, M. Sato, M. Inoue e S. Suzuki, «Cadmium modulates adipocyte functions in metallothionein-null mice,» *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 272, pp. 625-636, 2013.
- [95] C. Bertè, *Quantificazione via ICP-MS e analisi chemiometrica degli elementi contenuti in placente di donne affette da diabete mellito gestazionale*, 2014.
- [96] M. Roverso, C. Bertè, V. Di Marco, A. Lapolla, D. Badocco, P. Pastore, S. Visentin e E. Cosmi, «The metallome of the human placenta in gestational diabetes mellitus,» *Metallomics*, vol. 7, n. 7, pp. 1146-1154, 2015.