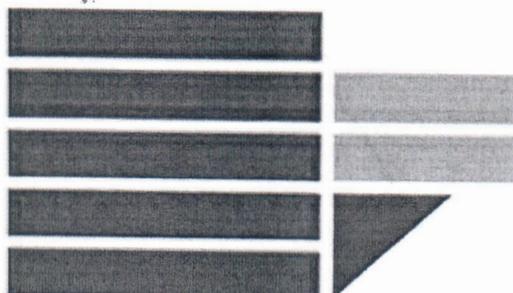


UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA VITA

CICLO
XXXIII°

EFFETTO DEL BISFENOLO A SULLA VASCOLATURA UTERINA MATERNA E SULL'UNITÀ FETO-PLACENTARE

Settore Scientifico Disciplinare BIO/09 (Fisiologia)

Coordinatore Prof.ssa Maria Carmela Cerra

Firma _____ Firma oscurata in base alle linee guida del Garante della privacy

Supervisore : Dott. Maurizio Manuola

Firma _____ Firma oscurata in base alle linee guida del Garante della privacy

Dottorando: Dott.ssa Laura Barberio

Firma _____ Firma oscurata in base alle linee guida del Garante della privacy

“Sono tra coloro che pensano che la scienza abbia una grande bellezza
Uno studioso nel suo laboratorio non è solo un tecnico, è anche un
bambino di fronte a fenomeni naturali che lo impressionano come una
fiaba. ”

Marie Curie

INDICE:

SOMMARIO

INTRODUZIONE

1. Bisfenolo A (BPA)

1.1 Bisfenolo A: caratteristiche fisico-chimiche della molecola	pg. 5
1.2 Produzione e applicazioni del BA	pg. 6
1.2.1 Fonti di esposizione al BPA	pg. 7
1.3 Dose giornaliera tollerata di BPA	pg. 8
1.4 Controverse sull'utilizzo del BPA	pg. 10
1.5 Effetti biologici indotti dal BPA	pg. 12
1.6 Curva dose- risposta non monotona	pg. 14

2. Gravidanza, rimodellamento vascolare ed effetti del BPA su questo processo:

2.1 La gravidanza	pg. 19
2.1.1 Sviluppo dell'utero in gravidanza	pg. 20
2.2 Anatomia della circolazione uterina	pg. 21
2.3 Rimodellamento della circolazione uterine in gravidanza	pg. 23
2.3.1 Flusso sanguigni utero-placentare	pg. 24
2.4 Rimodellamento circonferenziale e cambiamenti nelle proprietà cellulari vascolari	pg. 25
2.4.1 Rimodellamento assiale (longitudinale) delle arterie uterine	pg. 26
2.5 Meccanismi sottostanti il rimodellamento vascolare	pg. 27
2.6 Evidenze sugli effetti negativi indotti dal BPA in gravidanza	pg. 32
2.6.1 Effetti sulla circolazione uterina	pg. 32
2.6.2 Effetti sull' endotelio e produzione di NO	pg. 33
2.6.3 Effetti a livello della matrice extracellulare	pg. 35

3. Placenta ed effetti del BPA sui prodotti della gravidanza:

3.1 La placenta	pg. 37
3.1.1 Struttura e sviluppo della placenta umana	pg. 38
3.2 Funzioni placentari	pg. 39
3.2.1 Assorbimento di nutrienti da parte della placenta	pg. 40
3.2.2 Azione ormonale della placenta	pg. 41
3.3 Trasporto placentare	pg. 43
3.3.1 Trasportatori placentari coinvolti nella crescita fetale	pg. 45
3.4 Ritardo di crescita intrauterino (IUGR)	pg. 49
3.5 Evidenze sull'influenza del BPA sulla placenta e sullo sviluppo fetale	pg. 52

4. Obiettivo :	pg. 57
5. Materiali e Metodi:	
5.1 Animali	pg. 57
5.2 Preparazione e isolamento dei tessuti	pg. 58
5.3 Estrazione proteica e analisi Western blot	pg. 59
5.4 Isolamento e preparazione dei vasi sanguigni	pg. 60
5.5 Studi di reattività	pg. 60
5.6 Isolamento RNA ed analisi di espressione genica	pg. 60
5.7 Farmaci e soluzioni	pg. 61
5.8 Analisi statistica	pg. 61
RISULTATI	pg. 63
DISCUSSIONI	pg. 73
CONCLUSIONI	pg. 76
RINGRAZIAMENTI	pg. 100

SOMMARIO:

Il bisfenolo A (BPA) è un distruttore endocrino associato a esiti avversi in gravidanza, questo è stato riscontrato sia negli esseri umani sia nei roditori. La gravidanza normale richiede un radicale rimodellamento del sistema vascolare uterino perché avvenga un aumento significativo del flusso sanguigno utero-placentare al fine di fornire ossigeno e nutrienti sufficienti per una normale crescita e un normale sviluppo fetale. In questo lavoro abbiamo mirato a determinare gli effetti del BPA sulle arterie uterine di ratti femmina esposti al BPA sciolto in acqua potabile. Le femmine di ratto Sprague-Dawley (n = 23) sono state esposte a etanolo (solvente del BPA) o a BPA somministrato a diverse concentrazioni (2.5, 25, 250 µg/kg di peso corporeo) prima per un mese e successivamente durante la gravidanza, senza interrompersi mai. I ratti gravidi sono stati sottoposti a eutanasia il 20 ° giorno di gestazione e sono state valutate le unità feto-placentari attraverso misure morfometriche e attraverso la valutazione di un importante trasportatore placentare GLUT-1; le arterie uterine arcuate isolate dal tessuto e le arterie mesenteriche di terzo ordine. Inoltre, al fine di determinare un possibile meccanismo d'azione del BPA è stata valutata a livello dell'arteria uterina principale l'espressione genica di determinati fattori che possono essere bersagli del BPA e che sono implicati nel processo di vasodilatazione durante la gestazione. Il trattamento con BPA non ha influenzato il numero di feti né tanto meno il loro peso, che anzi è risultato aumentato alla dose 2.5 µg /kg/day, così come è risultata aumentata la quantità di GLUT-1, alla stessa concentrazione, nelle placente delle femmine di ratto. La stessa molecola ha ridotto significativamente il peso della placenta e l'efficienza di quest'ultima, specialmente alla minima e alla massima concentrazione di BPA. I dati relativi agli esperimenti condotti sulle arterie uterine hanno mostrato che il trattamento con BPA non ha influenzato la vasocostrizione indotta dal KCl ma ha ridotto significativamente la vasodilatazione indotta dall'acetilcolina (ACh), a conferma di ciò si è vista anche una riduzione di Nos3 nelle arterie uterine stesse, sempre alle concentrazioni massima e minima. Inoltre, il BPA a 250 µg / kg ha ridotto significativamente la distensibilità dell'arteria uterina ma non ha influenzato lo spessore della parete. Per quanto riguarda l'espressione genica il BPA pare ridurre l'espressione di ER-α ; PPAR-γ ma non di ER-β e VEGF. La disfunzione endoteliale e la rigidità indotte nell'arteria uterina dal BPA potrebbero spiegare l'esito compromesso della gravidanza associato alla presenza di questa sostanza.

Capitolo 1

Il Bisfenolo A (BPA):

1.1 Il Bisfenolo A: caratteristiche fisico-chimico della molecola:

Il bisfenolo A (CAS 80-05-07) è una sostanza di sintesi chimica prodotta dalla reazione tra due fenoli e una molecola di acetone, tale reazione è catalizzata da un acido noto come acido cloridrico (HCl) o una resina di polistirene solfonato. Questa molecola appartiene alla classe dei bisfenoli, composti chimici con due gruppi funzionali idrossifenilici. Il suo nome scientifico è 2,2-bis (4-idrossifenil) propano o 4,4'-isopropilidendifenolo. Si presenta sotto forma di cristalli o polvere cristallina, scaglie o granuli di colore che vanno dal bianco al marrone chiaro, solubili nei comuni solventi organici ma scarsamente in acqua.

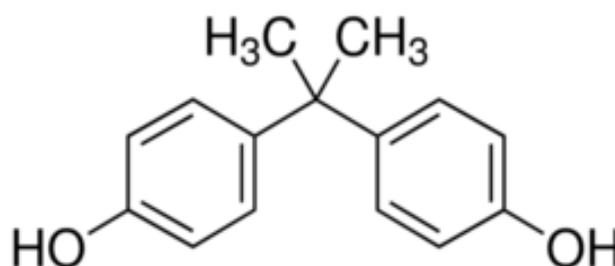


Figura 1. Molecola di Bisfenolo A

Sebbene il bisfenolo A sia il più diffuso e utilizzato dei bisfenoli nell'industria per le sue applicazioni tecnologiche, per le sue caratteristiche legate alla trasparenza, durezza, resistenza al calore, ecc. Sono noti anche numerosi altri bisfenoli. Tra questi:

- **Bisfenolo F** (CAS 87139-40-0) nome comune del bis (4-idrossidifenil) metano, prodotto della condensazione del fenolo con formaldeide.
- **Bisfenolo S** (CAS 80-09-1) nome comune del bis (4-idrossifenil) solfone, prodotto di condensazione tra fenolo e anidride solforica; tra l'altro, come si vedrà, quest'ultimo composto è stato proposto più volte, tra le varie critiche, come sostituto del BPA.

L'identificazione del bisfenolo A prevede sette classi di materie plastiche utilizzate per l'imballaggio. La classe 7 è polivalente e alcune di queste plastiche - come il policarbonato, spesso identificato con l'abbreviazione PC e le resine epossidiche - sono prodotte a partire

dal monomero di bisfenolo A. Il tipo 3 (PVC) può contenere bisfenolo A come antiossidante nei plastificanti. I Tipi 1 (PET), 2 (HDPE), 4 (LDPE), 5 (polipropilene PP) e 6 (polistirene PS) non subiscono, invece, alcun processo di polimerizzazione mediante l'utilizzo di bisfenolo A per la produzione di imballaggi.

1.2 Produzione e applicazioni del BPA:

La produzione annua del BPA è di circa 2-3 milioni di tonnellate. Viene utilizzato per la sintesi di poliestere, polisolfonati, polietere chetone, come antiossidante in alcuni plastificanti, colle, inchiostri e come inibitore della polimerizzazione del PVC. Questa molecola è il componente principale per la produzione del policarbonato: una plastica ampiamente utilizzata nella produzione dei più comuni beni di consumo (Vandenberg LN., 2007), infatti, il policarbonato, che presenta proprietà eccezionali - leggerezza, durata, alta resistenza alla trazione, alto modulo di elasticità e elevata temperatura di transizione vetrosa, essendo pressoché infrangibile, viene utilizzato per un gran numero di prodotti per bambini come ad esempio i biberon, ma anche per attrezzature sportive, dispositivi medici per dialisi e ossigenazione del sangue, prodotti di odontoiatria come ad esempio protesi dentarie o otturazioni dentali, lenti per occhiali, supporti ottici, elettrodomestici, caschi protettivi, e ovunque siano richieste caratteristiche di durezza e resistenza, oltre che trasparenza. Il BPA si trova anche sotto forma di resina epossidica (Vandenberg LN., 2007), utilizzata come rivestimento interno nella maggior parte delle lattine per alimenti e bevande. Il BPA si trova, inoltre, nella carta termica (per ricevute) come monomero libero, in questo caso il rilascio e l'assorbimento di tale molecola possono essere più facili rispetto al BPA che si trova negli imballaggi alimentari.

TABLE1. Usi del Bisfenolo A:

TIPO DI OCCUPAZIONE :	DOVE SI TROVA:
Plastica (Policarbonato)	Alcuni tipi di bottiglie e contenitori per alimenti, biberon, CD, DVD, stoviglie in plastica riutilizzabili, telefoni cellulari, bollitori e vari dispositivi medici e giocattoli.
Resina Epossidica	Rivestimenti interni di lattine e lattine per bevande, nonché circuiti stampati da apparecchi elettronici.
Sviluppatore di colore	Carte termiche (ricevute, titoli di trasporto, ricevute bancarie o biglietti di parcheggio).
Altro	Additivi in plastiche PVC (cavi, pneumatici), stabilizzanti in liquidi per freni, componenti in resine per cure odontoiatriche, ecc.

Il policarbonato e le resine epossidiche sono materiali relativamente stabili, in cui le molecole di BPA sono chimicamente interconnesse. A seconda delle condizioni di utilizzo, gli oggetti contenenti il BPA possono deteriorarsi e rilasciare, seppur in piccole quantità, tale sostanza che li compone. È così che il BPA può venire a contatto con l'uomo e indurre una serie di danni all'organismo. Quando viene utilizzato come additivo, ad esempio in carte termiche o PVC, il BPA non è legato chimicamente e può quindi essere rilasciato più facilmente, ma le quantità utilizzate in quest'area sono molto meno consistenti e l'esposizione è quindi limitata.

1.2.1 Fonti di esposizione al BPA:

Secondo i ricercatori, la più importante fonte di esposizione di BPA per uomini e per gli animali è rappresentata dal cibo, la contaminazione avviene nella maggior parte dei casi attraverso l'ingestione di alimenti (cibi e bevande) contaminate da BPA sembra, infatti, che per qualche motivo legato alla temperatura, piuttosto che all'ambiente i contenitori per alimenti possano subire un deterioramento che comporta la migrazione del BPA negli alimenti e il suo contatto con l'uomo a seguito della loro ingestione. Il ruolo delle vie inalatorie e dermiche, sembrerebbe meno rilevante anche se studi piuttosto recenti confermano che l'assorbimento cutaneo di BPA è più rilevante di quanto supposto (Zalko D., 2011). Gli interferenti endocrini, in genere, una volta ingeriti con il cibo, attraversano le membrane cellulari, raggiungono il flusso sanguigno e, trasportati dal sangue, si distribuiscono negli organi e nei tessuti. Alcuni, non essendo eliminati dall'organismo, rimangono "immagazzinati" in questi tessuti e organi aumentando in conseguenza il grado di esposizione (Vandenberg LN., 2010). Il trasferimento del BPA dai contenitori agli alimenti, è strettamente dipendente dalla temperatura; dal pH; dalla storia termica e meccanica dei contenitori nonché dalla natura chimica degli alimenti stessi (Takao Y., 2002). In generale, l'esposizione al BPA è diffusa a causa dell'eterogeneità di questa sostanza. A proposito di questo Walsh afferma: *"Il problema è che il BPA è anche un estrogeno sintetico e le plastiche con BPA possono rompersi, soprattutto quando vengono lavate, riscaldate o stressate, consentendo alla sostanza chimica di filtrare nel cibo e nell'acqua e quindi entrare nel corpo umano. . Succede a quasi tutti noi; "... Se non hai BPA nel tuo corpo, non stai vivendo nel mondo moderno. "* (Walsh B., 2010). Tuttavia, come accennato in precedenza, esistono anche altre fonti di esposizione al BPA non alimentari di uso molto comune che, se aggiunte alle altre, possono portare a un'esposizione significativa.

Mantovani e Baldi della ISS, ad esempio, hanno riportato in una rassegna letteraria l'effetto del BPA rilasciato sotto forma di monomero dai sigillanti dentali polimerici, quindi fonte non alimentare di esposizione al BPA, che seppur relativamente poco diffuso è certamente rilevabile per soggetti esposti.

1.3 dose giornaliera tollerata di BPA:

Tutta la nuova letteratura scientifica riguardante gli effetti del BPA a basse dosi ha dato luogo ad una serie di controversie con le agenzie di tutela della salute dei consumatori sui valori limite, fissati dalla normativa sul BPA, e questo ha portato alla necessità di una nuova valutazione del rischio. È stato, infatti, fortemente consigliato di rivedere la dose giornaliera tollerabile TDI. Nel 2006 l'EFSA aveva condotto la sua prima valutazione completa sul rischio indotto dal BPA e aveva stabilito un (TDI) di 0,05 mg/kg/di peso corporeo (mg/kg pc/giorno) per la sostanza. Allo stesso tempo, la stessa, ha valutato l'assorbimento del BPA attraverso cibi e bevande sia per gli adulti, sia per i neonati e sia per i bambini e ha dedotto, dalle analisi effettuate, che la TDI risulta inferiore per ciascuna categoria analizzata. Nel 2008, l' autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha esaminato le differenze tra la capacità di neonati e adulti di eliminare il BPA dal corpo e ha affermato che l'esposizione al BPA è di gran lunga inferiore alla TDI stabilita nel 2006 di 0,05 mg/kg/ di peso corporeo sia negli adulti che nei neonati. Dopo essere stato esposto al BPA, il corpo umano, infatti, metabolizza ed elimina rapidamente tale sostanza. Questo vale anche per i neonati, che sono in grado di smaltire il BPA che risulta esser in notevole eccesso rispetto alla dose giornaliera tollerata. Nel settembre 2010, l'EFSA ha aggiornato il proprio parere sul BPA in seguito a una revisione completa della letteratura scientifica e ad alcuni studi, allora recenti, sulla tossicità del BPA a basse dosi. Le analisi sulla dose giornaliera tollerata di BPA sono state svolte anche da un gruppo di esperti scientifici CEF che hanno concluso di non essere in grado di identificare nuove prove che portino a rivedere il quantitativo di BPA pari a 0,05 mg / kg di peso corporeo fissato dall'EFSA nel suo parere del 2006. Nel 2011 l'EFSA ha reagito alle relazioni sul BPA pubblicate nel settembre 2011 dall'Agenzia francese per la sicurezza sanitaria degli alimenti, dell'ambiente e del lavoro. Gli esperti hanno ritenuto che il rapporto degli effetti sulla salute del BPA non modifichi le considerazioni espresse dal gruppo di esperti scientifici nel loro precedente parere sulla sicurezza del BPA. A seguito di uno scambio di idee, l'EFSA e l'ANSES (Associazione Nazionale Stress E Salute) hanno concluso che il lavoro condotto da tale associazione si limita all'identificazione dei pericoli, mentre l'EFSA, nel 2006, ha effettuato una valutazione completa sul BPA. Nel 2012 l'EFSA affronta il tema degli effetti a basso dosaggio in tossicologia e della valutazione del rischio

in una speciale intervista scientifica tenutasi a Parma nel mese di giugno che ha visto la partecipazione di diversi esperti internazionali. Gli esperti dell'EFSA hanno deciso di intraprendere una nuova revisione dei rischi per l'uomo dall'esposizione al BPA attraverso il cibo, considerando anche il contributo delle fonti non alimentari all'esposizione complessiva alla sostanza, e hanno pubblicato, nel gennaio 2015, i risultati di tale revisione sulla tossicità dovuta all'esposizione al BPA riducendo la dose giornaliera tollerabile (TDI) di tale sostanza da 50 a 4µg/kg di peso corporeo / giorno. Nel 2016 nuovi dati hanno confermato la precedente conclusione dell'EFSA secondo cui il BPA può avere effetti sul sistema immunitario degli animali, ma le prove sono troppo limitate per trarre conclusioni sulla salute umana. Nel 2017, il gruppo di esperti scientifici CEP dell'EFSA ha approvato un protocollo da utilizzare nella rivalutazione in corso dei potenziali rischi del BPA, che definisce come selezionare, valutare e integrare le prove degli studi sul BPA. Per garantire la coerenza tra le valutazioni del BPA passate e future, gli esperti hanno applicato la metodologia di valutazione dello studio a una selezione di studi dalla valutazione dell'EFSA del 2015 e hanno confrontato i risultati con quelli raggiunti in quel momento. Lo studio chiave utilizzato per ricavare una dose giornaliera tollerabile temporanea per BPA nel 2015 è stato ritenuto di alta qualità applicando metodologie nuove e precedenti. Inoltre, i risultati della valutazione erano comparabili con entrambe le metodologie per gli altri studi selezionati. Pertanto, i nostri esperti hanno ritenuto che la metodologia BPA 2015 dell'EFSA fosse sufficientemente solida. La fase sperimentale ha aiutato gli scienziati e gli esperti ad affinare e migliorare ulteriormente il protocollo scientifico, che è stato di ulteriore supporto nella valutazione di recenti studi sulla tossicità del BPA ancora in corso. Un limite di migrazione specifica (LMS) è stato fissato dalla Commissione Europea nel 2004 per le materie plastiche a contatto con gli alimenti pari a 600 ng g⁻¹ (0,6 mg kg⁻¹), tale limite si riferisce però agli effetti acuti di altre patologie (diabete, malattie cardiovascolari) e non endocrine. In ogni caso, gli effetti di cui è accusato il BPA sono molteplici e controversi. Secondo una ricerca, ad esempio, apparsa sulla rivista "Endocrinology" nel 2005, il BPA potrebbe avere ripercussioni sullo sviluppo del sistema nervoso dei bambini; nello stesso anno, i ricercatori dell'Università di Cincinnati (USA) hanno correlato la comparsa di alcuni gravi disturbi neurologici infantili, all'esposizione al BPA, anche a dosi molto basse. Inoltre, secondo altri studi, il bisfenolo potrebbe indurre tumori al seno e alla prostata e predisposizione al diabete, malattie cardiache, disfunzioni tiroidee, problemi di impianto embrionale nell'utero e nello sviluppo fetale e postnatale.

1.4 Controversie sull'utilizzo del BPA:

Il BPA è probabilmente la sostanza più ricercata al mondo, con centinaia di studi pubblicati su riviste scientifiche ogni anno. Molti di questi studi hanno mostrato effetti altamente variabili a concentrazioni minime, nella maggior parte dei casi, tuttavia, non è stato possibile riprodurre questi risultati. Inoltre, la maggior parte degli studi in questione non soddisfa i criteri necessari ai legislatori per considerarli prove concrete su cui fare affidamento. C'è una controversia da sempre tra gli scienziati che criticano gli studi e li ritengono inaffidabili e quelli che credono che gli studi che dimostrano l'innocuità del BPA siano supportati anche dall'industria. Anche i rapporti ufficiali che valutano tutti gli studi condotti sul BPA, come il recente rapporto dell'EFSA, sono oggetto di intenso dibattito all'interno della comunità scientifica. Questa mancanza di consenso si ritrova anche nei vari regolamenti sull'utilizzo e, quindi, sulla produzione di BPA. Alcuni paesi, tra cui Canada, Francia o Danimarca, sono dell'opinione che il BPA dovrebbe essere totalmente vietato in base al principio di precauzione, che ha spinto l'Unione europea a vietarne l'uso nelle bottiglie di plastica a partire dal 2011. Altri paesi, come l'Australia, il Giappone, invece, ritengono che le prove scientifiche disponibili non siano sufficienti per bandire il BPA e che si debba tenere conto anche del problema delle alternative. Non esiste infatti un'unica sostanza in grado di sostituire il BPA per tutte le sue applicazioni. In caso di divieto del BPA, vengono lanciate sul mercato nuove sostanze alternative per ciascuno dei suoi usi, di cui a volte sono disponibili solo informazioni tossicologiche limitate, quindi che non garantirebbero al 100% la sicurezza desiderata (**Tabella 2**).

Table.2: Attuale regolamentazione del BPA in vari paesi:

Paese	Applicazione	Limite	Introduzione
Unione europea	Plastica a contatto con derrate alimentari	Limite di migrazione fissato a 0,05 mg/kg	2018
	Biberon in policarbonati*	Vietato	2011
	Giocattoli	Limite di migrazione fissato a 0.04 mg/l	2017
	Carta termica	Vietato (limite fissato a 0.02% del peso)	2020
Austria	Tettarelle, ciucci e giocattoli per la dentizione	Vietato	2012
Belgio	Contenitori per alimenti destinati a bambini di età inferiore a tre anni	Vietato	2013
Danimarca	Contenitori per alimenti destinati a bambini di età inferiore a tre anni	Vietato	2010
Francia	Tutti i contenitori per alimenti	Vietato	2015
Svezia	Contenitori per alimenti destinati a bambini di età inferiore a tre anni	Vietato	2013
Svizzera	Plastica, vernice e rivestimenti a contatto con derrate alimentari	Limite di migrazione fissato a 0.05 mg/kg	2019
	Vernici e rivestimenti dei contenitori per alimentari dedicati ai lattanti e ai bambini	Alcuna migrazione ammessa	2019
	Giocattoli	Limite di migrazione fissato a 0.04 mg/l	2018
	Biberon in policarbonati*	Vietato	2017
	Carta termica	BPA e BPS vietati (limite fissato a 0.02% del peso)	Dicembre 2020
Australia	Nessun divieto legale		
Cina	Biberon in policarbonati	Vietato	2011
Canada	Biberon in policarbonati	Vietato	2010
Giappone	Nessun divieto, ma misure volontarie da parte dei produttori		
Stati Uniti	Biberon in policarbonati	Vietato	2012
	Contenitori per alimenti destinati a bambini di età inferiore a tre anni	Vietato in alcuni Stati USA	2010-2013

** Nel quadro della legislazione sulle materie plastiche a contatto con i prodotti alimentari*

A seguito dei vari divieti sull'utilizzo del BPA, l'industria ha sviluppato diverse sostanze alternative a questa molecola per le sue molteplici applicazioni. Purtroppo, tuttavia, queste sostanze non sono sempre migliori del composto originale. Ad esempio, alcuni flaconi senza BPA ("BPA FREE") continuano a rilasciare sostanze che imitano l'azione degli estrogeni. Una sostanza molto simile al bisfenolo A, il bisfenolo S, è stata riscontrata in una serie di oggetti di utilizzo quotidiano, compresi i recipienti per alimenti, ad esempio, e studi recenti hanno confermato che questo bisfenolo rappresenta anche un interferente endocrino, quindi la dicitura "BPA-free" non è sinonimo di assenza di attività ormonale.

Esistono anche altre alternative che, a prima vista, sembrano meno dannose, ma serviranno ancora qualche anno e numerosi studi per essere sicuri della sicurezza di queste sostanze attualmente poco conosciute. Alcuni paesi ritengono quindi che, data la mancanza di prove

scientifiche, prima di bandire il BPA sia necessario innanzitutto provare l'innocuità delle sostanze utilizzate in sua vece, al fine di evitare di sostituire questa sostanza chimica con un'altra che potrebbe rivelarsi peggiore. Le normative quindi variano notevolmente da uno stato all'altro, il che trasmette un senso di insicurezza ai consumatori. Il fatto che il BPA sia prodotto in grandi quantità e che si trovi in numerosi prodotti di uso comune solleva ulteriormente le preoccupazioni riguardo a questa sostanza.

1.5 Effetti biologici indotti dal BPA:

Negli ultimi decenni l'opinione pubblica, i media e gli studiosi hanno dibattuto a lungo sulla possibilità che alcune molecole interferiscano con il normale funzionamento del sistema ormonale dell'uomo e degli animali. Queste sostanze vengono identificate con il nome di interferenti endocrini (EDCs). La US Environmental Protection Agency (EPA) ha definito un composto di interferenza endocrina come *"un agente esogeno che interferisce con la sintesi, la secrezione, il trasporto, il metabolismo, l'azione di legame o l'eliminazione degli ormoni naturali trasmessi dal sangue che sono presenti nel corpo e sono responsabili dell'omeostasi, riproduzione e processo di sviluppo."* (Changwon Y., 2019). Il termine sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino viene utilizzato per definire una classe di composti sintetici e naturali che possiedono la capacità di alterare vari componenti del sistema endocrino e potenzialmente indurre effetti negativi sulla salute degli individui e, più in generale, delle popolazioni esposte. Queste molecole, quindi, possono compromettere la normale attività del sistema ormonale dell'uomo e degli animali, sistema che risulta essere molto importante per le funzioni fisiologiche dell'organismo (metabolismo; immunità; comportamento; sviluppo; crescita) e della specie (riproduzione) (Schug TT., 2011). Le sostanze chimiche con attività ormonale, e quindi potenziali interferenti endocrini, includono:

- **Ormoni naturali** di qualsiasi animale, rilasciati nell'ambiente, e sostanze chimiche prodotte da una determinata specie che esercitano azioni ormonali su altri animali. Ad esempio, gli ormoni umani riattivati involontariamente durante il trattamento dei rifiuti umani negli effluenti delle acque reflue possono comportare una serie di danni ai pesci.
- **Prodotti chimici naturali**, comprese le tossine prodotte dai componenti delle piante (i cosiddetti fitoestrogeni, come la genisteina o il coumestrol) e alcuni funghi.
- **Prodotti farmaceutici** prodotti sinteticamente destinati ad essere altamente attivi dal punto di vista ormonale. Ad esempio, la pillola contraccettiva e i trattamenti per i tumori sensibili

agli ormoni possono essere rilevati anche nelle acque reflue.

- **Prodotti chimici e sottoprodotti artificiali** rilasciati nell'ambiente.

Diversi esperimenti di laboratorio, condotti nel tempo, hanno suggerito che alcune sostanze chimiche prodotte dall'uomo potrebbero essere in grado di causare cambiamenti endocrini. Questi includono alcuni pesticidi (ad esempio DDT e altri composti clorurati), sostanze chimiche in alcuni prodotti di consumo e medici (ad esempio additivi plastici) e una serie di prodotti chimici industriali (ad esempio bisfenoli policlorurati (PCB), diossine). L'attività ormonale di queste sostanze chimiche è molte volte più debole rispetto a quella degli ormoni presenti naturalmente nel corpo, ad es. il nonilfenolo (un prodotto di degradazione dei tensioattivi alchilfenolo etossilato), trovato come contaminante di basso livello in alcuni fiumi europei, ha un'attività estrogenica di solo circa un decimillesimo rispetto a quella dell'ormone naturale, l'estrogeno. Numerosi composti tossici hanno concentrazioni ambientali inferiori alle soglie di rischio, secondo le normative, ma bisogna tenere conto che il problema di salute umana e ambientale riguardante gli EDC è legato al loro bioaccumulo, esposizioni croniche di basso livello e effetto sinergico degli stessi, secondo scienziati. Alcuni EDC frequentemente identificati nei test di migrazione erano il BPA, ftalati e 4-NP (4- nonilfenolo) o t-butilfenolo. Per quanto riguarda, invece, i principali non-EDCs identificati questi erano prevalentemente solventi, antiossidanti e composti simili alla gomma (Romero J., 2002). Alcune sostanze chimiche possono agire sul sistema endocrino per disturbare i meccanismi omeostatici dell'organismo stesso o per avviare alcuni processi in momenti anormali del ciclo vitale. Di solito sono prodotti naturali o sostanze chimiche sintetiche che imitano, potenziano (un agonista) o inibiscono (antagonista) l'azione degli ormoni (Soto AM., 1995).

Il bisfenolo A (BPA) è considerato un interferente endocrino insieme a una serie di altre sostanze, nello specifico il bisfenolo A si è visto essere in grado di legarsi ai recettori estrogenici che riconoscono l'ormone sessuale femminile, nonostante sia, approssimativamente, da 10000 a 100000 volte meno attivo dell'ormone naturale (Takayanagi S., 2006). Una serie di studi hanno confermato la presenza di BPA nel sangue e nelle urine (Genuis SJ. , 2012) , inoltre, il danno che questa sostanza è in grado di fare all'organismo viene considerato abbastanza grave, trattandosi infatti di un disturbatore endocrino si pensa che abbia un effetto sul sistema riproduttivo, nervoso, immunitario e cardiovascolare oltre che sul metabolismo (obesità, diabete) e che eserciti un'azione cancerogena. Infatti, un rapporto dell'EFSA ha rivelato che il BPA è in grado di modificare

la struttura della ghiandola mammaria, che potrebbe successivamente favorire lo sviluppo di tumori (Pupo, M., 2012). Attualmente un grande interesse scientifico è rivolto ai rischi che questa molecola può indurre in gravidanza, sia per la madre che per il feto. Nel sangue materno, il BPA libero ha raggiunto la concentrazione di 22,3 ng/ml (range: 0,5-22,3 ng/ml) (Padmanabhan V., 2008) ; nel plasma materno, invece il BPA libero ha raggiunto concentrazioni pari a 0,3-18,9 ng / ml e nel plasma fetale di circa 0,2-9,2 ng / ml (Schönfelder G., 2002). Il BPA è stato riscontrato anche nel liquido amniotico (Edlow AG., 2012), nella placenta (Jangwoo L., 2018) e nel cordone ombelicale (Jangwoo L., 2018), così come nel latte materno (Jangwoo L., 2018). Sono inoltre presenti in letteratura una serie di studi che dimostrano la capacità del Bisfenolo A di attraversare la placenta e raggiungere il feto nella sua forma non coniugata , quindi quella che causa il maggior danno all'organismo. (Gauderat G., 2016; Balakrishnan B., 2010). Questa capacità appartenente al BPA rende la molecola un serio pericolo per il feto durante lo sviluppo intrauterino. La vita prenatale, infatti, è un periodo di sviluppo plastico e delicato qualsiasi tipo di insulto esterno può portare a cambiamenti persistenti a livello di cellule, tessuti e soprattutto organi. Ovviamente la capacità del BPA di raggiungere la placenta e attraversarla non determina un rischio solo per il feto ma anche per la placenta stessa, quindi una serie di conseguenze negative legate alla salute della madre. Un cattivo funzionamento placentare può comportare un basso apporto di nutrimento, sangue e ossigeno al feto, tutto questo può essere causa di un'altra grave conseguenza ovvero il ritardo della crescita intrauterina IUGR, ma anche di aborto spontaneo o, addirittura, morte fetale. Alcuni studi hanno dimostrato che il BPA in gravidanza è associato a complicanze della gravidanza quali la preeclampsia (PE) e ritardo di crescita intrauterino (IUGR,) (Yunzhen Y., 2018; Burstyn I., 2013) le principali patologie della gravidanza con morbilità e mortalità del feto (Müller JE., 2018). Poiché nel ritardo di crescita intrauterino, la scarsa crescita fetale così come nell'EP sono associati a un ridotto flusso sanguigno utero-placentare (Lunnell NO., 1982), si possono ipotizzare effetti del BPA proprio sulla funzione vascolare uterina con conseguente alterazione dell'emodinamica dei vasi uterini e dei prodotti della gravidanza, ovvero i nati.

1.6 Curva dose-risposta non monótonica (NMDRC):

“La dose fa il veleno” è il dogma della moderna tossicologia, derivato da una citazione di Paracelso, medico e alchimista del XV secolo considerato uno dei fondatori della tossicologia come disciplina. Questo principio di base non è solo comunemente riconosciuto, ma anche intuitivo. Si può facilmente presumere che la relazione tra la dose di esposizione chimica e l'effetto biologico osservato sia di conseguenza logica: maggiore è la dose,

maggiore è l'effetto. Questa ipotesi è alla base del moderno sistema di test di tossicità per nuovi composti (e altri metodi di screening per la ricerca degli effetti), quindi la fede nel principio non è solo teorica, ma ha anche implicazioni molto pratiche. Lo screening, di solito impiega una gamma di dosi elevate di un particolare composto, e ha ottenuto effetti che vengono estrapolati a dosi inferiori. I test eseguiti includono la valutazione delle LD50 (la dose letale per il 50% degli animali da esperimento), MTD (dose massima tollerata), LOAEL (livelli più bassi di effetti avversi osservati) e NOAEL (il livello senza effetti avversi osservati). La dose sicura per l'uomo e la fauna selvatica viene successivamente calcolata da un algoritmo che fornisce un coefficiente di sicurezza e basato sul valore NOAEL. Supponendo che la relazione dose-risposta fosse stata lineare, il "dosaggio sicuro" avrebbe potuto essere dedotto da un semplice test dose-risposta. La relazione tra dose ed effetto corrispondente a questo dogma può essere visualizzata come una curva dose-risposta monotona (Fig 2.), che può assumere forme leggermente diverse, tuttavia, la curva dell'effetto mantiene sempre una direzione di cambiamento.

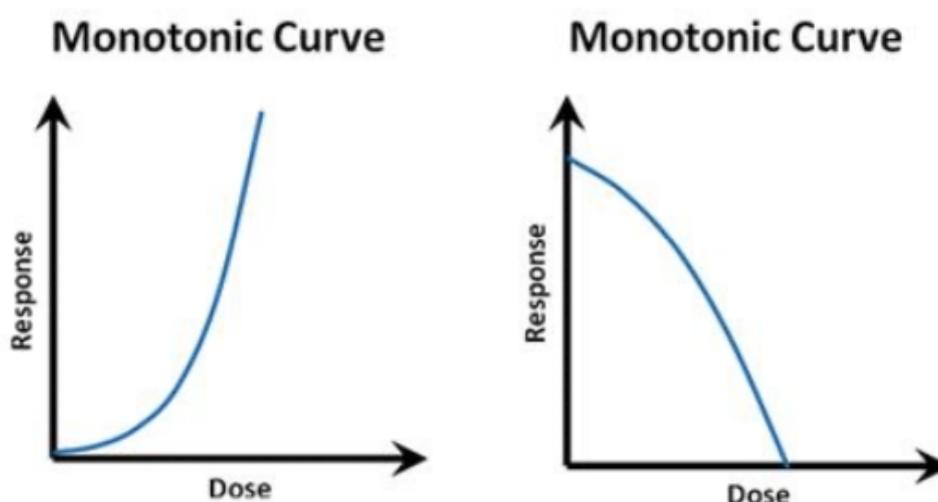


Figura 2. Esempio di curva dose-risposta monotonica.

Anche se accurato, in molti casi il dogma non è valido, soprattutto per alcuni composti e il numero di essi è in rapido aumento. È possibile che una sostanza chimica susciti un pattern di risposta più complesso del previsto. Per decenni, gli studi sulle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino (EDCs) hanno sfidato i concetti tradizionali di tossicologia, in particolare il dogma che "la dose fa veleno" perché gli EDCs possono avere effetti a basse

dosi che non sono attesi a dosi più elevate. Sebbene il numero di possibili pattern di risposta formati da interazioni molecolari complesse sia teoricamente illimitato, in questi casi è comune osservare una curva dose-risposta a forma di U o U rovesciata caratterizzata dalla presenza di un picco e dalla conseguente diminuzione di l'effetto con una dose crescente. Quel tipo di pattern è chiamato curva dose-risposta non monotona (NMDRC) (Fig.3) perché la funzione matematica che definisce questa curva non preserva l'ordine dato: la pendenza della curva dose-risposta cambia segno da positiva a negativo o viceversa ad un certo punto del range delle dosi esaminate, quindi la direzione del cambiamento dell'effetto biologico non è costante.

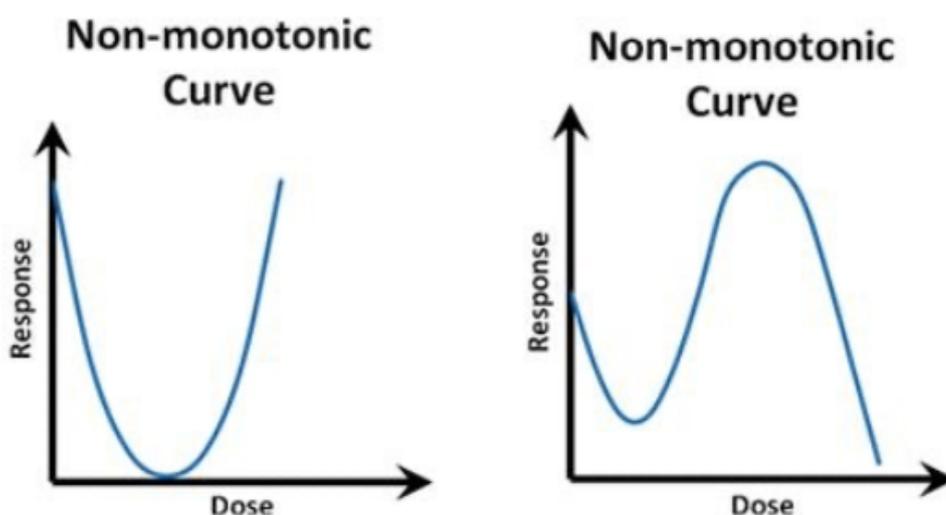


Figura 3. Esempi di curve dose-risposta non- monotona.

Vengono proposti numerosi meccanismi molecolari per spiegare l'esistenza di curve dose-risposta non monotone e di effetti a basso dosaggio. Questi includono :

- **Cofattori e recettori specifici per una cellula o un tipo di tessuto:** alcuni degli effetti non monotoni osservati possono essere il risultato di effetti monotoni sovrapposti, ad esempio provenienti da una serie di diverse sottopopolazioni cellulari o tessuti presenti nel campione o nella coltura, che reagiscono all'ormone in modo diverso (Soto AM., 2001) a causa di un diverso tipo e quantità di recettori espressi (Morani A., 2008) nonché della presenza di cofattori specifici in grado di alterare la selettività del recettore e l'elaborazione del segnale a valle (Jeyakumar M., 2008), quindi anche la risposta.

- **Selettività del recettore:** molti composti possono agire tramite più recettori e percorsi a seconda della concentrazione. Sono attivati, quasi esclusivamente, da un tipo di recettore a basse dosi, e diventano meno specifici a dosi elevate, legandosi debolmente anche ad altri tipi di recettori (Moriyama K., 2002) e alterando gli endpoint biologici.
- **Desensibilizzazione dei recettori:** per un'ampia gamma di ormoni (o agenti che li imitano) è stata osservata una ridotta risposta ai ligandi da parte del recettore come risultato dell'inattivazione biochimica dopo un'esposizione prolungata.
- **Down-regolazione dell'espressione dei recettori:** l'aumento dei livelli di ligando spesso porta ad un aumento dell'inattivazione e della degradazione dei suoi recettori, superando ad un certo punto la capacità di produrne di nuovi a un ritmo pari alla velocità del percorso di degradazione (Ismail A., 2005) . Inoltre, la produzione di recettori può essere regolata in base al livello di ligando circolante, secondo uno schema non lineare. Inoltre la segnalazione da un tipo di recettore può influenzare il processo di produzione di un altro tipo (Kinyamur HR., 2003).
- **Competizione per i siti recettoriali:** se il composto artificiale è in competizione con un ormone naturale per lo stesso recettore, entrambi possono trovare un sito non occupato, legarsi e attivare le risposte; tuttavia ad una dose elevata del composto supera l'ormone naturale, alterando la risposta. Sono stati utilizzati modelli matematici per determinare l'alta probabilità di NMDRC in tutti questi casi (Kohn MC., 2002).
- **Cicli di feedback endocrini negativi:** Diversi ormoni animali sono regolati da circuiti di feedback positivi o negativi: il livello circolante di un dato ormone o prodotto della sua azione influenza la produzione di questo ormone in base all'attivazione dei recettori ad esso correlati. La sovrastimolazione del recettore ormonale da parte di altri composti riduce la produzione di ormoni (Vandenberg LN., 2012).

Diversi studi dimostrano che gli EDCs non seguono il principio "la dose fa il veleno", ma piuttosto mostrano una curva di risposta alla dose a forma di U e a forma di U invertita, non monótonica, dove le risposte più forti possono essere suscitate dal più basso e dosi più elevate, o concentrazioni intermedie, rispettivamente, probabilmente a causa della down-regolazione del recettore indotta da livelli ormonali più elevati (Tibbetts TA., 1998; Vandenberg LN., 2009). Il BPA, come più volte è stato detto è un EDCs e negli ultimi anni è stata ampiamente discussa la sua capacità di produrre NMDRC. Nel 2007, un gruppo di esperti riunito dal NIEHS ha concluso che c'erano prove evidenti che il BPA possa indurre NMDRC (Wetherill YB., 2007). Per iniziare ad affrontare questo problema, è stato condotto uno studio pilota per determinare la frequenza di NMDRC in un sottoinsieme di studi

condotti in vitro sul BPA e presenti nella letteratura scientifica. I risultati di questo studio pilota hanno mostrato che gli NMDRC sono, in effetti, comuni e che i fattori associati al disegno sperimentale possono influenzare la capacità di osservare queste risposte. In particolare, questo studio pilota ha esaminato una piccola parte della letteratura EDC e ha concluso che gli NMDRC sono stati osservati in oltre il 30% di tutti gli studi e per oltre il 20% di tutti gli esperimenti nel set di dati esaminato. Fondamentalmente, quindi, si può affermare che la presenza di NMDRC sfida l'uso di estrapolazioni di dose da alta a bassa e l'uso di un modello di soglia, che propone che vi sia una dose al di sotto della quale non si osservano effetti di una sostanza chimica.

Capitolo 2

Gravidanza, rimodellamento vascolare ed effetti del BPA su questo processo:

2.1 La gravidanza:

La gravidanza rappresenta un processo che prevede una serie di cambiamenti negli organi e nei tessuti di una donna a seguito dello sviluppo del feto. L'intero processo, dalla fecondazione alla nascita, richiede in media 266-270 giorni, ovvero circa nove mesi. Un nuovo individuo viene creato quando gli spermatozoi si fondono con un ovulo fertile, o *uovo*. Un certo numero di spermatozoi attivamente mobili si depositano nella vagina, passano attraverso l'utero e invadono le tube di Falloppio. Solo uno spermatozoo, tuttavia, normalmente darà vita poi ad un nuovo organismo. A seguito di un processo chiamato mitosi, l'ovulo fecondato, o *zigote*, si divide in due cellule figlie di dimensioni uguali. La divisione mitotica conferisce a ciascuna cellula figlia 44 autosomi, metà dei quali di origine materna e metà di origine paterna. Ogni cellula figlia ha anche due cromosomi X, che rendono il nuovo individuo una femmina, o un cromosoma X e Y, rendendolo un maschio. Quando lo zigote raggiunge l'utero, è diventato una massa solida simile al gelso chiamata *morula*. All'aumentare del numero di cellule in una morula, lo zigote forma una struttura cava simile a una bolla, la *blastocisti*, che, nutrita dalle secrezioni uterine galleggia libera nella cavità uterina per un breve periodo e poi si impianta nel rivestimento uterino. Normalmente, l'impianto della blastocisti avviene nella porzione superiore del rivestimento uterino (Figura 4).

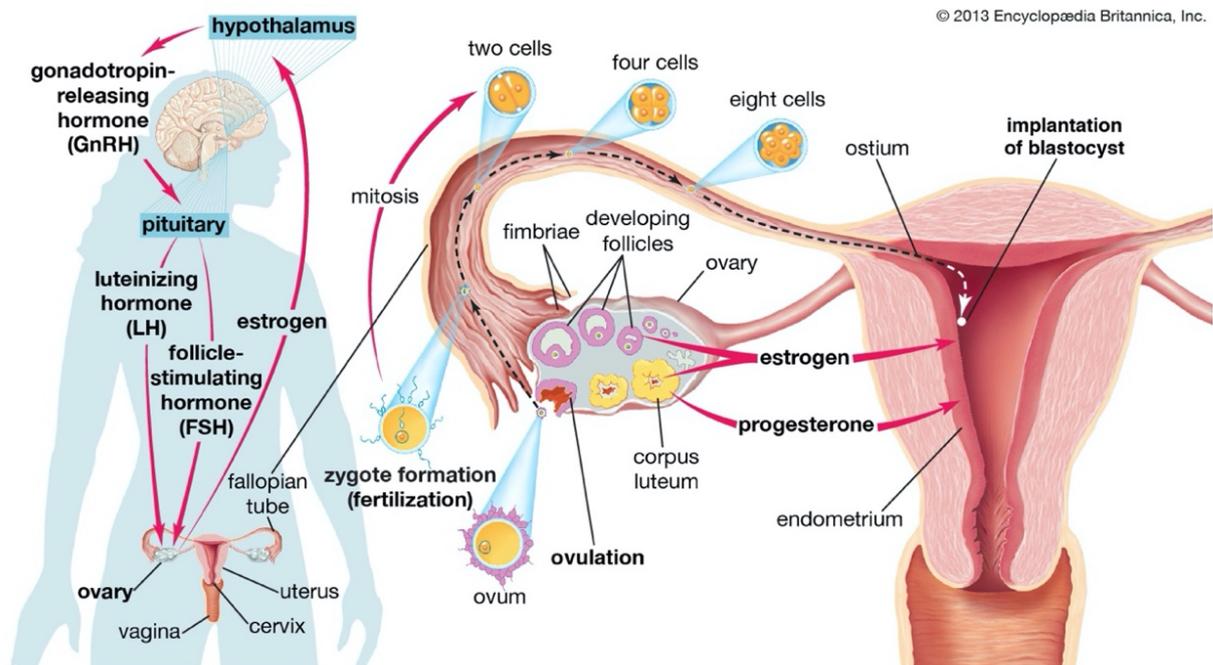


Figura 4. : Inizio della gravidanza; fecondazione e impianto: principali strutture e ormoni coinvolti nell'inizio della gravidanza.

2.1.1 Sviluppo dell'utero in gravidanza:

L'utero è un organo a forma di pera dalle pareti spesse che misura sette centimetri (circa 2,75 pollici) di lunghezza e pesa 30 grammi (circa un'oncia) in una donna non incinta nella sua adolescenza. Ha un'estremità inferiore simile a un bottone, la cervice, che si fonde con la porzione bulbosa più grande, chiamata corpo. Il corpo comprende circa tre quarti dell'utero. A termine della gravidanza, l'utero è un grande cilindro a parete sottile, cavo, elastico, pieno di liquido che misura circa 30 centimetri (circa 12 pollici) di lunghezza, pesa circa 1.200 grammi e ha una capacità da 4.000 a 5.000 millilitri. La maggiore dimensione dell'utero a seguito della gravidanza è dovuta a un marcato aumento del numero di fibre muscolari, vasi sanguigni, nervi e vasi linfatici nella parete uterina. Vi è anche un aumento da cinque a dieci volte delle dimensioni di ogni singola fibra muscolare e un marcato aumento del diametro dei vasi sanguigni e linfatici. Durante le prime settimane di gravidanza, la forma dell'utero rimane invariata, ma l'organo diventa gradualmente più morbido. Entro la 14a settimana forma uno sferoide appiattito. La cervice fibrosa diventa notevolmente più morbida e acquisisce un tappo di muco protettivo all'interno della sua cavità. La parete uterina si allunga e si assottiglia durante la gravidanza a partire dal momento del concepimento e per tutta la crescita fetale, ma anche dalla presenza del fluido che lo circonda. È solo in tarda

gravidanza che la cervice si dirada gradualmente e si ammorbidisce, tant'è vero che durante il travaglio essa si dilata per il passaggio del neonato.

2.2 Anatomia della circolazione uterina:

L' utero è irrorato dalle arterie uterine sinistra e destra che salgono lungo la porzione laterale all'interno del legamento largo e terminano anastomizzandosi con la rispettiva arteria ovarica (Figura 5). Ad intervalli lungo la loro lunghezza i vasi danno origine ad arterie uterine arcuate che passano medialmente e penetrano nel miometrio. Durante il loro corso le arterie uterine arcuate danno origine alle arterie uterine radiali che si dirigono verso il lume dell'utero. Quando si avvicinano al confine miometrio-endometrio, ciascuna arteria radiale emette rami laterali, le arterie basali che irrorano il miometrio e le parti basali più profonde dell'endometrio, e continua come un'arteria a spirale (Figura 6A) (Pijnenborg R., 2006). Le arterie a spirale sono altamente avvolte all'interno della base e delle parti più profonde dell'utero, ma quando si avvicinano al lume uterino si restringono improvvisamente e si dividono in diversi rami più piccoli che seguono un andamento più rettilineo prima di terminare in un plesso capillare appena sotto l'epitelio uterino . Nello stato non gravido le pareti delle arterie spirali e radiali contengono grandi quantità di muscolatura liscia dotata di una ricca innervazione. Quindi, sono altamente reattive agli stimoli adrenergici sia esogeni che endogeni (Adamsons K., 1975; Ramsey E.M., 1980). All'inizio della gravidanza le cellule trofoblastiche extravilluose endovascolari migrano lungo i lumi delle arterie spirali, mentre le cellule trofoblastiche interstiziali migrano attraverso lo stroma endometriale e penetrano dalle pareti dei vasi dall'esterno. Sia l'invasione endovascolare che quella interstiziale sono associate alla conversione fisiologica delle arterie spirali (Kaufmann P., 2003; Pijnenborg R., 2006). Durante questo processo le arterie perdono la muscolatura liscia delle loro pareti e la loro lamina elastica, per cui si dice comunemente che i vasi si dilatano. L'entità della conversione varia attraverso il letto placentare ed è maggiore nella regione centrale dove l'invasione dei trofoblasti è più estesa (Brosens I.A., 1988).

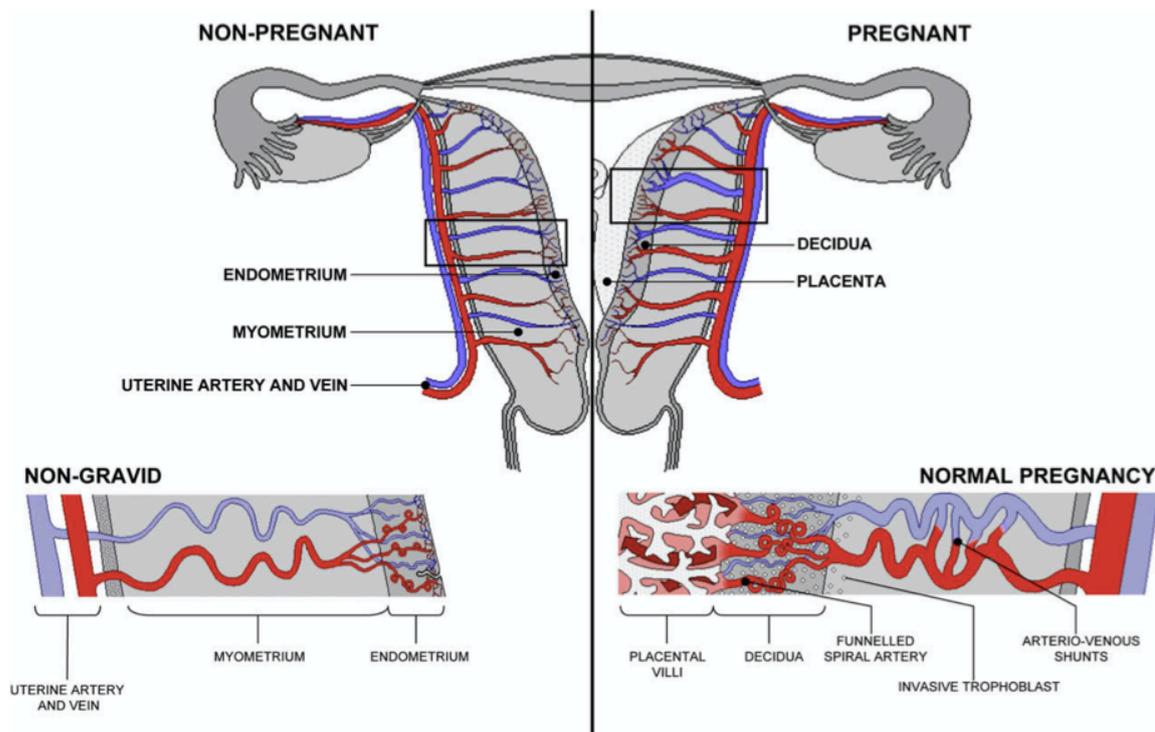


Figura 5. Rappresentazione schematica della vascolarizzazione uterina e placentare in donne gravide e non gravide e invasione extravillosa citotrofoblastica.

I roditori (Figura 6B) mostrano, invece, un utero duplex, con le principali arterie utero-ovariche e le vene che corrono parallele, ma ben al di fuori della parete uterina, all'interno di un foglio planare di tessuto connettivo chiamato mesometrio. I vasi del mesometrio sono perfusi da sangue arterioso proveniente dall'estremità uterina o ovarica, cioè con un flusso bidirezionale. I vasi secondari analoghi alle arterie arcuate negli esseri umani possono formare anelli ridondanti con l'arteria principale e le arterie radiali, denominate terziarie, collegano gli anelli formati dalle arterie arcuate con la parete uterina. Queste arterie radiali (chiamate anche mesometriali o segmentali) possono essere ulteriormente classificate in base alla loro destinazione come pre-miometriali o preplacentari. Le arterie radiali pre-miometriali entrano nella parete uterina tra i siti di placentazione e si ramificano in un plesso arterioso intrauterino che alimenta il miometrio, mentre i vasi radiali pre-placentari si allargano prima di entrare nella placenta attraverso un processo di invasione del trofoblasto endovascolare.

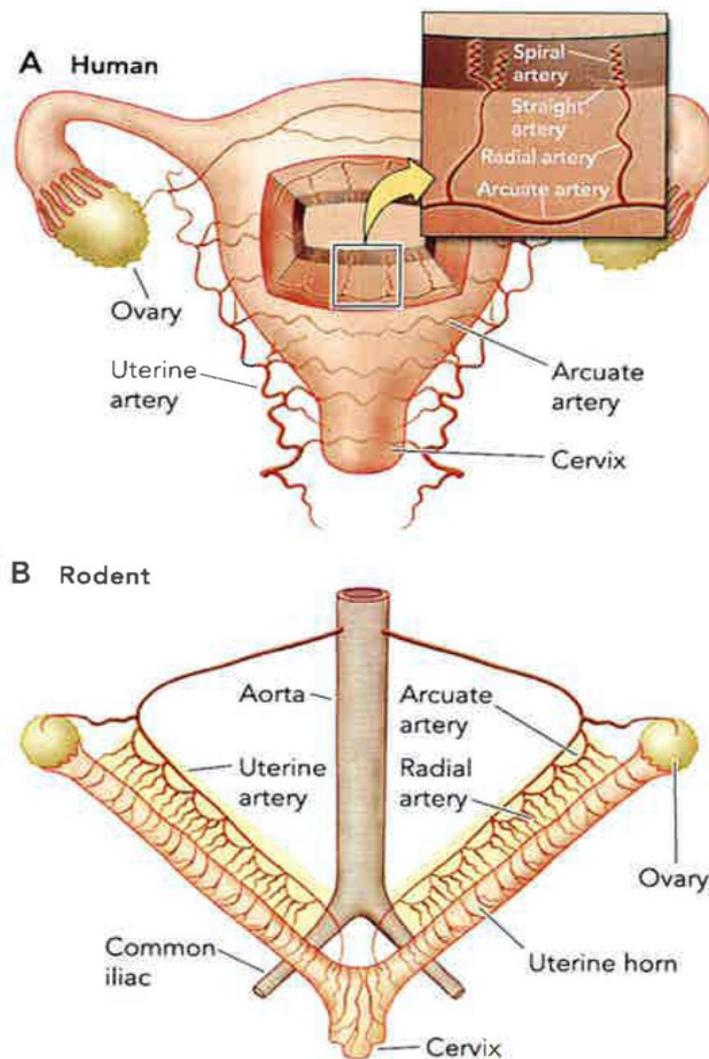


Figura 6. Anatomia vascolare uterina comparativa. Circolazione uterina nell'uomo (Figura 6A), nei roditori (Figura 6B) e negli ungulati, come pecore e maiali (Figura 6B).

2.3 Rimodellamento fisiologico della circolazione uterina in gravidanza:

Affinché la gravidanza proceda normalmente e avvenga una normale crescita fetale, sono necessari una serie di cambiamenti sia a livello di organi come per esempio l'aumento delle dimensioni dell'utero sia a livello dei vasi sanguigni. Sono, infatti, necessari grandi aumenti del flusso sanguigno uteroplacentare per garantire il corretto apporto di sangue, nutrienti e ossigeno dalla placenta al feto. Questi cambiamenti nel flusso utero-placentare si verificano in tutte le specie di mammiferi studiate, inclusi gli esseri umani. Nello specifico, nelle donne e negli animali da esperimento come roditori e pecore, il flusso sanguigno uteroplacentare aumenta di molte volte rispetto alla condizione di non gravidanza, di solito di circa il 90% (Dowell R.T., 1997; Rosenfeld C.R., 1974; Lees M.H., 1971). I cambiamenti emodinamici

sono principalmente dovuti ad una profonda diminuzione della resistenza vascolare uterina, che si ottiene attraverso una combinazione tra il rimodellamento espansivo (che determina lo sviluppo dei vasi sanguigni) e i cambiamenti funzionali nella reattività dei vasi stessi (che determinano una maggiore vasodilatazione, a discapito di quei meccanismi responsabili della vasocostrizione). Esistono, tra l'altro, alcune prove su un collegamento meccanicistico tra questi due processi. L'importanza clinica del rimodellamento vascolare uterino è sottolineata dal fatto che una crescita e uno sviluppo insufficienti della circolazione utero-placentare possono portare a una perfusione ridotta placentare e contribuire allo sviluppo di patologie gestazionali significative come la restrizione della crescita intrauterina (IUGR) e la preeclampsia (PE) (Bewley S., 1991; Bernstein IM., 1998).

2.3.1 Flusso sanguigno uterino e placentare in gravidanza:

I primi studi sull'uomo condotti da Assali et al (1953-1960) (Assali NS., 1953; Assali NS., 1955) e Metcalfe (Metcalfe J., 1955) che utilizzavano il principio dell'equilibrio di diffusione (più spesso protossido di azoto, N₂O) o sonde di flusso elettromagnetiche posizionate direttamente sull'arteria uterina hanno dimostrato che il flusso sanguigno utero-placentare totale aumenta da un valore basale di 20–50 ml / min in a 450–800 ml / min, nelle gravidanze singole, con valori che superano 1 l/min nelle gravidanze gemellari. Questi primi risultati sono anche supportati da successive misurazioni del flusso sanguigno dell'arteria uterina con diverse tecniche, come ad esempio: 133Xe (Rekonen A., 1976); tecniche di velocità di clearance metabolica placentare (Edman CD., 1982) e l'ecografia Doppler transvaginale più recente e diretta (Palmer SK., 1992). Negli animali da esperimento come i roditori o le pecore, le variazioni relative dell'UPBF sono uguali o maggiori di quelle riscontrate negli esseri umani, con aumenti del flusso sanguigno a termine della gravidanza, che vanno da 10 a 100 volte al di sopra dei livelli osservati in condizioni di non gravidanza (Bejellin L., 1975; Bruce N.W., 1976; Caton D., 1986; Dowell R.T., 1997; Ford S.P., 1984; Ford S.P., 1985; Greiss F.C Jr ., 1970; Hart M.V., 1985; Keyes L.E., 1997; Lang U., 2003; Rosenfeld C.R., 1974). Poiché la pressione sanguigna normalmente diminuisce o comunque rimane invariata durante la gravidanza, i cambiamenti emodinamici uterini sono principalmente influenzati da una profonda diminuzione della resistenza vascolare uterina. Ciò è dovuto a meccanismi diversi ma allo stesso tempo complementari, tra cui l'allargamento strutturale circonferenziale dell'intero albero vascolare uterino (comprese le vene), una riduzione del tono vascolare (vasodilatazione) e la formazione della placenta. Da un punto di vista sistemico, gli aumenti dell'UPBF sono facilitati dalla combinazione di una gittata cardiaca

sostanzialmente aumentata e un volume vascolare espanso che sono caratteristici della gestazione in ogni specie studiata (Thornburg KL., 2000). Nell'uomo (Assali NS., 1960; Thaler I., 1990) e nelle cavie (Bejellin L., 1975), l'aumento dell'UPBF è graduale e abbastanza lineare, mentre nel ratto, che ha una gestazione di 22 giorni, gli aumenti del flusso sanguigno uterino totale sono rilevabili per la prima volta intorno al giorno 15, cioè l'ultimo "trimestre" di gestazione (Dowell R.T., 1997). Inoltre, altro aspetto molto importante relativo all'aumento del flusso sanguigno utero-placentare è dato dal fatto che, con l'avanzare della gravidanza si verifica un progressivo aumento della proporzione di sangue diretto alla placenta. Ciò è stato dimostrato da Dowell e Kauer nel ratto (Dowell R.T., 1997), nello specifico, quello che si è visto, è che il 15° giorno di gravidanza <10% del flusso sanguigno uterino era placentare; il 22° giorno il valore relativo al flusso sanguigno utero-placentare risultava essere aumentato al 90%. Stime simili sono state rilevate negli ovini (Rosenfeld C.R., 1974) e nei primati (Lees M.H., 1971).

Il flusso sanguigno assoluto al miometrio aumenta in proporzione alla massa uterina, mentre il flusso sanguigno uterino relativo (millilitro al minuto per 100 g di tessuto, esclusa la placenta) può fluttuare e diminuire leggermente (Dowell R.T., 1997; Rosenfeld C.R., 1974; Whitney E.A., 1993) o rimanere abbastanza costante (Dowell R.T., 1997; Ford S.P., 1984) durante gravidanza.

2.4 Rimodellamento circonferenziale e cambiamenti nelle proprietà cellulari vascolari:

Durante la gravidanza, il diametro dell'arteria uterina principale raddoppia, approssimativamente, le proprie dimensioni nell'uomo (Palmer S.K., 1992). Questa scoperta è supportata da una serie di studi pubblicati che utilizzano pecore, maiali, porcellini d'India e ratti, dove anche i diametri delle arterie uterine generalmente aumentano da due a tre volte (Annibale D.J., 1990; Griendling K.K., 1985; Guenther A.E., 1988; Keyes L.E., 1997; Mateev S.N., 2006; Moll W., 2003; Nienartowicz A., 1989, Palmer S.K., 1992; van der Heijden O.W., 2005; Van der Heijden O.W., 2004). Questo ingrandimento del calibro arterioso si verifica più spesso con un ispessimento minimo o nullo della parete vascolare (Annibale D.J., 1990; Osol G., 1993). l'aumento del diametro del lume si traduce tuttavia in una maggiore area della sezione trasversale; quindi il modello di rimodellamento circonferenziale è *ipertrofico verso l'esterno*. Le arterie arcuate e radiali più piccole si rimodellano secondo uno schema simile, con ingrandimenti documentati del calibro del lume che vanno dal 25 al 220% e senza alcun cambiamento o aumento dello spessore della parete

(Cipolla M., 1994; Cipolla M.J., 1997; Gokina N.I. , 2003; Makinoda S., 1986; , Moll W., 1983; , Moll W., 1973; , Osol G., 1993; St-Louis J., 2006; St-Louis J., 2001). In uno studio condotto sulle arterie radiali miometriali umane di donne preeclampatiche (Ong S.S., 2005), è stato riportato che il modello di rimodellamento favorisce un lume più piccolo e una parete più spessa, senza cambiamenti nell'area della sezione trasversale, suggerendo il riarrangiamento degli elementi che costituiscono la parete attorno a lume più piccolo, cioè rimodellamento *eutrofico verso l'interno*. Poiché in media occupano la maggior parte della parete, l'aumento in termini di larghezza, del lume vascolare sarebbe dovuto, semplicemente, da un aumento della lunghezza delle cellule muscolari lisce vascolari (ipertrofia assiale): ad esempio, la lunghezza delle cellule muscolari lisce nelle arterie uterine arcuate di ratti gravidi rispetto a ratti vergini non gravidi risultano essere aumentati del 20% (Cipolla M., 1994). Nelle cavie (Hees H., 1987) la lunghezza delle cellule muscolari lisce risulta essere aumentata da 21 a 39 μm (86%), insieme a un aumento comparabile dello spessore cellulare (da 4,6 a 9,6 μm , o 108%). Le misurazioni morfometriche suggeriscono che l'allungamento delle cellule muscolari lisce vascolari si verifica anche negli ovini (Annibale DJ., 1990). Sorprendentemente, non sono disponibili dati sull'uomo, sebbene l'ipertrofia della muscolatura liscia miometriale sia ben stabilita. Oltre all'ipertrofia cellulare, vi è anche una forte evidenza di iperplasia all'interno della parete vascolare, poiché sono stati riportati tassi aumentati di divisione delle cellule muscolari lisce nelle arterie e nelle vene uterine di ratti e cavie (Annibale DJ., 1990; Cipolla MJ. , 1997; Hammer ES., 2005; Keyes LE. , 1997; Keyes LE. , 1996; Page KL. , 2002); anche se, sebbene l'iperplasia endoteliale sia stata documentata nel ratto (Annibale DJ., 1990), i cambiamenti nell'ipertrofia endoteliale (aumento dell'area o della massa cellulare) non sono stati ancora dettagliati.

2.4.1 Rimodellamento assiale (longitudinale) delle arterie uterine:

L'andamento temporale e il modello di rimodellamento vascolare possono variare a seconda della specie, e possono anche essere specifici rispetto alle dimensioni e alla localizzazione del vaso. Ad esempio, i risultati emersi da uno studio condotto sui ratti suggeriscono che il rimodellamento può iniziare nei vasi più piccoli, prossimalmente ai siti di placentazione o alla parete uterina e poi, con il progredire della gravidanza, procede verso i vasi più grandi e più a monte (Annibale DJ., 1990). Questa osservazione si basa sui tassi mitotici della muscolatura liscia vascolare e delle cellule endoteliali, che risultavano, inizialmente, più alti nei vasi più piccoli più o meno a metà gravidanza (giorno 16/22) e, solo successivamente,

(giorno 20/22) nei vasi più grandi a monte. Questo concetto è coerente con il concetto di invasione trofoblastica delle arterie spirali uterine immediatamente prossimali alla placenta che rappresenta un evento iniziale del processo di rimodellamento (Brosens JJ., 2002; Lyall F., 2005; Pijnenborg R., 1981).

Nell'uomo, la crescita assiale vascolare che corrisponde all'allungamento delle arterie arcuate deve verificarsi quando l'utero si allarga circonferenzialmente per accogliere l'unità feto-placentare. Nelle donne, non è chiaro se ciò sia ottenuto mediante un'effettiva crescita longitudinale o mediante un progressivo raddrizzamento delle arterie uterine spirale, non ci sono studi attualmente che hanno tentato di distinguere tra il raddrizzamento dei vasi dovuto a forze meccaniche alterate e la crescita reale, che implicherebbe la divisione cellulare e un aumento della massa della parete. È interessante considerare l'influenza del rimodellamento circonferenziale rispetto a quello assiale sull'emodinamica uterina, poiché gli aumenti di lunghezza avrebbero influenze opposte sulla resistenza vascolare rispetto agli aumenti di diametro. Con un raddoppio approssimativo di ciascun parametro, come è stato notato in diversi studi, l'effetto dell'allargamento dovrebbe predominare, poiché la relazione tra lunghezza e resistenza è lineare (cioè, un raddoppio della lunghezza equivale a un raddoppio della resistenza), la relazione tra diametro (o il raggio) e resistenza, invece, è inverso e elevato alla quarta (cioè, il raddoppio del diametro riduce teoricamente la resistenza di 16 volte), secondo la legge di Poiseuille. Il rimodellamento circonferenziale espansivo e la diminuzione della resistenza distale dovuta alla placentazione esercitano un effetto sinergico che può provocare aumenti di molte volte dell'UPBF.

2.5 Meccanismi sottostanti il rimodellamento vascolare in gravidanza:

Il rimodellamento vascolare è un processo attivo che dipende da almeno quattro processi cellulari: crescita, morte, migrazione e produzione / degradazione della matrice extracellulare. Ciascuno di questi processi è soggetto a molteplici influenze normative e interattive, comprese forze fisiche come pressione / allungamento e stress da taglio, influenze umorali / endocrine come VEGF e steroidi sessuali e fattori locali generati all'interno della parete vascolare, ad es. NO endoteliale, angiotensina ed endotelina. I molteplici collegamenti tra input e output cellulari complicano ulteriormente la comprensione dei precisi meccanismi coinvolti. Ad esempio, VEGF, estrogeni e shear stress stimolano tutti la produzione di NO e sia gli estrogeni che l'NO regolano l'attività metalloproteinasi della matrice e, quindi, le proprietà meccaniche passive e la composizione della matrice (Dumont O., 2007; Grandas OH., 2009; Pustovrh MC., 2007). In particolare:

Shear stress e NO- La forza di taglio (shear stress) sulle pareti vascolari, determinata dalla velocità del sangue, è oggi riconosciuta come un importante stimolo che aumenta la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} e la liberazione di NO dalle cellule endoteliali. Studi condotti da Langille, DeMey e altri (Ben Driss A., 1997; Buus CL., 2001; Ceiler DL., 2000; Erami C., 2005; Langille BL., 1996; Langille BL., 1986; Loufrani L., 2008; Schiffers PM., 2000; Tuttle JL., 2001) hanno stabilito con fermezza che un aumento dello shear stress stimola il rimodellamento espansivo delle arterie grandi e piccole in un certo numero di letti vascolari. È interessante notare che, nonostante il numero di citazioni, la diversità delle specie è limitata poiché praticamente tutti i dati in questi studi sono stati ottenuti utilizzando modelli di roditori. Questo meccanismo è interessante dal punto di vista fisiologico, poiché un aumento del calibro dei vasi consente il mantenimento di un aumento del flusso, normalizzando allo stesso tempo lo shear stress endoteliale dovuto a una diminuzione della velocità del flusso sanguigno. L'aumento dello shear stress è un meccanismo plausibile per l'allargamento arterioso uterino durante la gravidanza in considerazione della sua natura ben consolidata come meccanismo fisiologico e del fatto che la riduzione della resistenza a valle che si verifica secondaria alla placentazione sarebbe uno stimolo efficace per aumentare la velocità del flusso (e, quindi, shear stress) nelle arterie a monte. La vasodilatazione e / o la crescita dei vasi consentirebbero al flusso aumentato di continuare, ma con una velocità più lenta, normalizzando così lo shear stress. Tuttavia, la velocità del sangue nell'arteria uterina delle donne nella settimana 36 di gravidanza è stata quasi otto volte più veloce rispetto allo stato di non gravidanza (in media 61,4 contro 8,4 cm / s), mentre il diametro arterioso è aumentato di circa il doppio (Palmer SK., 1992). Il meccanismo (i) molecolare (i) mediante il quale lo stress di taglio porta alla crescita del vaso circonferenziale non è noto, sebbene diversi studi recenti abbiano indicato che l'NO endoteliale può essere un importante mediatore di questo processo (Rudic RD., 1998; Tronc F., 2000; Tuttle JL., 2001; van der Heijden OW., 2005). Questa osservazione è pertinente al rimodellamento gestazionale uterino in considerazione della ben consolidata sovraregolazione della segnalazione di eNOS e NO in stato di gravidanza ed è supportata da diverse linee di evidenza. In primo luogo, sia il messaggio che i livelli proteici di NOS-3 (o eNOS), l'enzima responsabile della produzione di NO da parte dell'endotelio, sono aumentati dallo stress di taglio, così come il rilascio di NO (Tuttle JL., 2001). Di conseguenza, l'attività e l'espressione di NO sintasi (Nelson SH., 2000) e il rilassamento ad acetilcolina (Nelson SH., 1998) sono aumentati nelle arterie uterine delle donne in gravidanza. In secondo luogo, i topi privi del gene per NOS-3 mostrano una riduzione del rimodellamento vascolare uterino e una diminuzione del flusso sanguigno uterino (van der Heijden OW., 2005). E terzo, l'inibizione chimica della

produzione di NO da parte di inibitori di NO come L-NAME ha praticamente abolito il rimodellamento espansivo dell'arteria uterina principale e delle arterie radiali più piccole nel ratto, sebbene, in particolare, la crescita assiale fosse completamente inalterata (Osol G., 2009). Le differenze nelle risposte vascolari regionali sono state documentate anche in altri studi (D'Angelo G., 1994; Pasterkamp G., 2004). In uno studio che ha utilizzato topi knockout NOS-3 (van der Heijden OW., 2005), la crescita dell'arteria uterina principale era inferiore a quella degli animali selvatici ma ancora significativamente maggiore di quella dei controlli non gravidi, suggerendo che meccanismi diversi da quelli legati allo shear stress dunque il rilascio endoteliale di NO gioca un ruolo importante. È stata anche descritta la produzione di NO da parte del trofoblasto extravilloso di cavia (Nanaev A., 1995), aumentando la possibilità che altri tipi di cellule come i macrofagi o il trofoblasto possano migrare nello spazio periarterioso e stimolare la vasodilatazione e il rimodellamento della parete arteriosa e venosa attraverso meccanismi legati all'NO. Un certo numero di altre vie di segnalazione sono state implicate nel rimodellamento arterioso indotto dal flusso tra cui l'attivazione di MMP (Tronc F., 2000), influenze adrenergiche (Erami C., 2005), recettori toll-like (Hollestelle SC., 2004), citoscheletro (Loufrani L., 2008), compresa la vimentina (Schiffers PM., 2000) e le tirosin chinasi associate a membrana come PYK2 (Tai LK., 2002).

Metalloproteinasi della matrice nel rimodellamento vascolare gestazionale- Le metalloproteinasi della matrice (MMP) svolgono un ruolo vitale nel turnover della matrice e sono, a loro volta, soggette alla regolazione sia degli steroidi sessuali che dell'NO. Ad esempio, sia gli estrogeni che il progesterone, da soli e in combinazione, hanno dimostrato di modulare l'espressione del gene MMP e della proteina delle cellule muscolari lisce, il turnover della matrice e il deposito (Grandas OH., 2009; Natoli AK., 2005). L'attività di diverse MMP è elevata nei tessuti vascolari durante la gravidanza (Kelly B., 1999) e i livelli di MMP, in particolare quelli di MMP-2 e MMP-9, sono alterati nelle donne preeclamptiche (Myers JE., 2005; Raffetto JD., 2008). Questa combinazione di regolazione da segnali gestazionali e un ampio spettro di azioni sulla struttura della parete vascolare (ad esempio, riorganizzazione e composizione della matrice e migrazione delle cellule muscolari lisce) ha stabilito un ruolo centrale per le MMP nel rimodellamento vascolare (Merchant SJ., 2004).

VEGF and PlGF- Anche i membri della famiglia VEGF, in particolare PlGF, sono candidati interessanti per mediare questo processo perché inducono vasodilatazione, stimolano la mitosi endoteliale e sono associati a ipervascolarizzazione e allargamento dei vasi esistenti (Odorisio T., 2002; Osol G., 2008; Maynard SE., 2005). È importante sottolineare che un'attenuazione della segnalazione di VEGF / PlGF mediante secrezione placentare di un

eccesso del loro recettore solubile [recettore del fattore di crescita endoteliale vascolare solubile-1 o tirosin chinasi-1 correlata a Fms solubile (sFlt-1)] è ben documentata in pre-eclamptico donne, e la sovra espressione di sFlt-1 negli animali provoca una sindrome gestazionale (ipertensione, proteinuria e glomerulosi endoteliale) che imita da vicino la pre-eclampsia (Maynard SE., 2005).

Sistema renina-angiotensina- un altro meccanismo coinvolto nel processo di rimodellamento è il sistema renina-angiotensina, come mostrato in uno studio in cui l'eccessiva attivazione del sistema renina-angiotensina, da una dieta a basso contenuto di sodio in ratte gravide, ha attenuato significativamente il normale aumento del diametro dell'arteria (St-Louis J., 2006). In alcune donne pre-eclamptiche, è stata documentata la sovra espressione di un anticorpo che stimola il recettore dell'angiotensina-1 (AT-1) e si ritiene che sia importante nella genesi dell'ipertensione caratteristica di questa malattia, sebbene la sua influenza sull'utero il rimodellamento vascolare deve ancora essere esaminato.

Signaling veno-arterioso- Sebbene i meccanismi e le vie che governano il rimodellamento della vascolarizzazione uterina durante la gravidanza non siano ben definiti, il fatto che l'utero e la placenta siano organi altamente sintetici che rilasciano una serie di fattori di crescita e vasoattivi nell'effluente venoso uterino ci ha portato a suggerirne l'esistenza di un meccanismo locale di segnalazione veno-arteriosa per cui l'utero e la placenta possono regolare la propria perfusione. Qui, i segnali placentari e / o miometriali secreti (ad es. Fattori di crescita) passano attraverso la parete venosa uterina e influenzano la struttura delle arterie uterine adiacenti. Una base anatomica per il trasferimento venoarterioso esiste nella circolazione uterina, perché le arterie e le vene sono disposte in stretta apposizione in un certo numero di specie (Ginther OJ., 1974; Celia G., 2002; Celia G., 2005) e negli esseri umani (Celia G., 2005). Il supporto fisiologico per l'esistenza dei meccanismi veno-arteriosi viene da studi precedenti sulla luteolisi, in cui i prostanoidi secreti dal miometrio passano nelle vene uterine e vengono poi trasferiti all'arteria ovarica, portando a vasocostrizione e ischemia che provocano la morte del corpo luteo . Questo meccanismo luteolitico venoarterioso è stato dimostrato in numerose specie di mammiferi (Ginther OJ., 1974). Pertanto, lo scambio venoarterioso è plausibile sia da un punto di vista anatomico che fisiologico. Un recente studio del nostro laboratorio ha convalidato in vitro l'esistenza della comunicazione veno-arteriosa nella circolazione uterina del ratto, dimostrando che piccole molecole vasoattive perfuse all'interno della vena uterina inducono cambiamenti di diametro nell'arteria uterina adiacente (Celia G., 2002). Inoltre, la permeabilità venosa delle vene

uterine isolate di ratto è significativamente aumentata, anche a segnali di grande peso molecolare (70 kDa), potenziata durante la gravidanza ed è regolata da forze fisiche come la tensione della parete e da segnali molecolari come VEGF (Celia G., 2002; Celia G., 2005). Poiché anche fattori di crescita come VEGF e PlGF sono potenti vasodilatatori, questo meccanismo può fornire un percorso a circuito breve per regolare la perfusione placentare inducendo cambiamenti nel tono arterioso. Tuttavia, mancano attualmente prove sperimentali che dimostrino (o confutino) in modo definitivo l'importanza del trasferimento venoarterioso come meccanismo in vivo per il rimodellamento gestazionale vascolare uterino e la determinazione se questo meccanismo sia fisiologicamente importante nel contesto del rimodellamento vascolare uterino materno durante la gestazione attende ulteriori ricerche.

Estrogeni e Progesterone- In una serie di studi è stato documentato il ruolo importante degli ormoni steroidei sessuali femminili (progesterone ed estrogeni) nell'adattamento vascolare uteroplacentare durante la gravidanza. Ad esempio, il 17- β estradiolo riduce la resistenza vascolare uterina e promuove la vasodilatazione dell'arteria uterina (Sprague BJ., 2009) attraverso meccanismi legati alla via dell'ossido nitrico (NO)/chinasi regolata extracellulare (ERK) (Chen DB., 2004) gli estrogeni stimolano anche la sintesi del DNA nelle arterie radiali uterine (Tabata M., 1988) e promuovono l'attività mitotica all'interno della parete dell'arteria uterina (Keyes LE., 1997; Keyes LE., 1996; Forbes TR., 1972; Jose SO., 2010); L'estrogeno stimola anche la secrezione endometriale di uno o più fattori che promuovono la migrazione di VSMC come primo passo nel rimodellamento dei vasi endometriali (Babischkin JS., 2009) e svolge un ruolo nella regolazione dell'invasione e del rimodellamento delle arterie a spirale uterine da parte dei trofoblasti extravillosi. Sono necessari bassi livelli di estrogeni durante la gravidanza precoce dei primati per consentire la normale progressione dell'invasione vascolare dei trofoblasti, mentre l'aumento di estrogeni che si verifica durante il secondo trimestre ha un ruolo fisiologico nel sopprimere l'ulteriore invasione del trofoblasto arterioso (Albrecht ED., 2006). Meno si sa, invece, sugli effetti degli estrogeni (e del progesterone) sul rimodellamento espansivo dell'arteria uterina. I risultati di uno studio, in cui è stata indotta nel topo la pseudo-gravidanza (uno stato in cui i livelli ormonali aumentano senza la presenza di un feto o di una placenta) (van der Heijden OW., 2005), hanno mostrato un significativo rimodellamento espansivo dell'arteria uterina principale 10 giorni dopo la stimolazione, sebbene l'entità fosse significativamente inferiore (circa il 25%) rispetto alla quantità misurata nelle femmine gravide. Questo risultato suggerisce l'esistenza di un sinergismo tra fattori locali e sistemici nel processo di

rimodellamento. Un ruolo per il progesterone piuttosto che per gli estrogeni può anche meritare considerazione in quanto stimola la maturazione dei vasi nell'endometrio del topo durante il ciclo mestruale (Girling JE., 2007) sebbene, sorprendentemente, il suo ruolo nel rimodellamento vascolare uterino durante la gravidanza non sia stato valutato.

2.6 Evidenze sull'effetto del BPA in gravidanza:

L'impatto del Bisfenolo A sulla funzione uterina durante la gravidanza rimane ad oggi ancora poco chiaro, sono presenti diversi studi circa l'influenza del BPA in gravidanza nello specifico per quanto riguarda l'impianto degli embrioni, piuttosto che sull'instaurazione della gravidanza (Li Q., 2016). Ci sono diversi studi che riguardano l'impatto del BPA sullo sviluppo placentare (Benachour N., 2009) e sullo sviluppo fetale, in particolare pare che il BPA abbia un effetto dannoso sullo sviluppo intrauterino con conseguente basso peso alla nascita (Müller JE., 2018) ma, a volte, anche morte prematura (Pinney SE., 2017), parto pretermine (Cantonwine DE., 2015) e nei peggiori dei casi aborto. Altro aspetto che porta a pensare l'influenza del BPA sulla gravidanza è dato dal fatto che il BPA è stato riscontrato nel fluido amniotico, nella placenta persino nel cordone ombelicale e anche a concentrazioni piuttosto elevate. La concentrazione di BPA nel liquido amniotico è persino superiore a quella del plasma delle donne in gravidanza, raggiungendo livelli di 8,3 ng / mL a 15-18 (Ikezuki Y., 2002) settimane di 12 o 7,75 ng / mL al termine della gravidanza (Shekhar S., 2017). I rapporti di cui oggi siamo a conoscenza risultano piuttosto allarmanti soprattutto se si tiene conto che il BPA mostra una curva dose- risposta a forma di U e di conseguenza potrebbe esibire effetti molto significativi già a basse concentrazioni. Poiché, come accennato in precedenza, la circolazione materna gioca un ruolo cruciale per la normale crescita placentare e, conseguentemente, fetale che è logico pensare che il BPA possa compromettere, a monte, le funzioni delle arterie uterine; il processo d'invasione trofoblastica legata al corretto rimodellamento delle arterie spirale; piuttosto che alterare l'espressione di quei fattori essenziali per il corretto rimodellamento uterino (NO; VEGF; PlGF; estrogeni e recettori estrogenici; MMPs ecc.).

2.6.1 Effetto sulla circolazione uterina:

Al momento in letteratura non sono presenti studi che dimostrino un effetto specifico del BPA a livello delle arterie uterine, né, tantomeno, sono presenti studi che dimostrino un effetto ipertensivo in gravidanza indotto dal BPA con conseguente aumento di pressione

sanguigna in gravidanza. Tuttavia, esistono studi relativi alle conseguenze indotte dal BPA sulla crescita fetale (Burstyn I., 2013) e sulla riduzione del peso placentare, che fanno ipotizzare che tali conseguenze siano dovute ad un effetto negativo del BPA sul rimodellamento vascolare uterino. Nello specifico si pensa che il BPA possa avere effetti sul rimodellamento delle arterie spirale uterine che porterebbe di conseguenza ad una riduzione del flusso sanguigno al feto. In un articolo pubblicato nel 2018, ad esempio, è stato dimostrato che il trattamento con 50 µg /kg di BPA su topi gravidi, durante i primi sette giorni di gravidanza, dal giorno 1 al giorno 7, attraverso un sondino gastrico, ha portato a una crescita limitata dei feti. L'IUGR è stato inoltre accompagnato da un rimodellamento alterato delle arterie spirale uterine, evidenziato da un maggiore spessore della loro parete nell'utero delle femmine di ratto in gravidanza che sono state esposte al BPA rispetto ai controlli. Nello stesso studio è stato anche dimostrato che il 14° giorno di gestazione, che corrisponde a metà gravidanza nell'uomo, è stata osservata una riduzione del peso placentare negli animali trattati con BPA rispetto ai controlli. Non si conoscono i motivi per cui le placente delle madri trattate con BPA risultino essere più leggere rispetto a quelle dei controlli, nonostante mostrino parametri istologici simili. Una possibile spiegazione è data dal fatto che le placente del gruppo trattato con BPA hanno ricevuto meno sangue materno rispetto ai controlli e poiché il sangue irrorava l'intera placenta, le differenze nel volume del sangue che la raggiungono possono provocare differenze nel peso dell'organo. Questa tesi supporterebbe, ancora una volta, l'ipotesi che il problema indotto dal BPA è a monte, ovvero a livello della circolazione uterina materna. Susiarjo e colleghi hanno recentemente dimostrato che l'esposizione materna al BPA interrompe l'espressione genica placentare e questo è stato associato a uno sviluppo anormale delle placente stesse. Il mancato sviluppo della placenta e, conseguentemente, il mancato aumento di peso possono portare a ipertensione materna cronica e preeclampsia (McNamara H., 2014) ma anche disturbi fetali (Panti AA., 2012), infatti, la normale crescita della placenta dipende dal flusso sanguigno utero-placentare che in gravidanza aumenta in modo significativo (Palmer SK, 1992) come conseguenza della crescita circonferenziale del sistema vascolare uterino (Osol G., 2019).

2.6.2 Effetto sull'endotelio e sulla produzione di NO:

Sempre a proposito di preeclampsia, un altro aspetto importante da considerare è che una delle caratteristiche principali di questa subdola patologia che rappresenta la principale complicanza della gravidanza associata a morbilità e mortalità materna e fetale (Possomato-Vieira JS., 2016) è data dalla ridotta produzione di NO, nota anche come disfunzione endoteliale. NO, insieme a EDHF e PGI₂, rappresenta uno dei principali fattori coinvolti

nella vasodilatazione. Quello che si sa è che le arterie durante la gravidanza subiscono un grande rimodellamento vascolare, quindi hanno una maggiore propensione alla vasodilatazione grazie a fattori, questo è essenziale per un corretto apporto di sangue, nutrimento e ossigeno dalla placenta al feto, ma, più in generale, è importante che tutto l'utero e il sistema vascolare si rimodellino correttamente per accogliere il feto e perché la gravidanza venga portata a termine nel migliore dei modi. Tutte le sostanze ad azione vasodilatatrice vengono rilasciate sia da stimoli meccanici come shear stress (stress dovuto allo stiramento parietale), sia da stimoli biochimici, come acetilcolina (ACh), istamina, bradichinina, serotonina, sostanza P, neuropeptidi, ecc. Con il termine “disfunzione endoteliale” si identifica quella condizione patologica caratterizzata da cellule endoteliali anatomicamente intatte, ma la cui stimolazione, invece di determinare solo la produzione di NO, attiva parallelamente la produzione di specie reattive dell'ossigeno o di radicali liberi, che provocano la distruzione dell'NO stesso. In particolare, una ridotta produzione e/o biodisponibilità di NO compromette non solo la regolazione del tono vasomotorio, ma anche quella dei meccanismi che controllano la produzione di fattori pro e anti-aterogenici. Tale squilibrio determina la prevalenza di sostanze, come endoperossidi, endotelina-1, angiotensina II e altre, che favoriscono l'attivazione dei processi di danno endoteliale. La disfunzione endoteliale è quindi una condizione patologica caratterizzata da una ridotta biodisponibilità di NO. Sebbene la disfunzione endoteliale sia principalmente causata da una maggiore distruzione di NO, può dipendere anche dalla sua ridotta produzione, come nella carenza del substrato di L-arginina, o dalla vasocostrizione indotta da fattori derivati dalla cicloossigenasi. In letteratura, nel 2014, è stato pubblicato un articolo in cui si è cercato di comprendere il possibile coinvolgimento del BPA nella disfunzione endoteliale e sebbene non sia un articolo incentrato sulla vascolarizzazione uterina e non riguardi la gravidanza, ciò che emerge è che il BPA induce la disfunzione endoteliale nell'arteria carotidea attraverso disaccoppiamento dell'eNOS, compromettendo il rilassamento dei vasi e aumentando significativamente la pressione sanguigna. Probabilmente il meccanismo alla base di questo effetto è dato dal disaccoppiamento di eNOS mediato da AngII, che porta a un aumento dello stress ossidativo e nitrosativo attraverso l'accumulo di radicali liberi di superossido e perossinitrito. Questi risultati suggeriscono che l'attivazione di CaMKII-indotta da AngII può svolgere un ruolo fondamentale nella disfunzione dell'endotelio in seguito al trattamento con BPA. (Saura M., 2014). Questo è il primo studio riguardante un possibile effetto del BPA a livello vascolare a seguito del quale non sono stati pubblicati altri che determinerebbero il possibile meccanismo d'azione. Pertanto le informazioni che si hanno su questo argomento sono piuttosto limitate. Esistono numerosi articoli scientifici in

letteratura che mostrano come non solo il BPA ma anche altri interferenti endocrini come BPS (analogo del BPA) o ftalati (ad esempio DHEP e MHEP) inducano una serie di alterazioni allo sviluppo fetale e placentare (Grindler NM., 2018; Strakovsky RS., 2018; Philippat C., 2019 Martinez-Razo LD., 2021) ma non sono chiari, anche in questo caso, i meccanismi di azione con cui agiscono. Inoltre, il BPA, in qualità di EDCs, potrebbe inibire la produzione di NO attraverso il legame con i recettori degli estrogeni ER- α ed ER- β (Kuramitz H., 2002) che svolgono un ruolo cruciale nella produzione di NO in UA e nel loro relativo adattamento alla gravidanza (Veille JC., 1996). (Chen DB., 2004; Mandalà M., 2020). Questo è un aspetto molto importante e da non sottovalutare.

2.6.3 Effetto a livello della matrice extracellulare:

In fisiologia, la capacità dei vasi sanguigni di espandersi elasticamente sotto l'effetto dell'aumento della pressione della sabbia per poi ridursi, restituendo il volume di sangue accumulato sotto l'effetto della diminuzione della pressione sanguigna, è chiamata "compliance". La compliance di un vaso sanguigno, quindi, dipende dall'elasticità delle sue pareti e costituisce una misura delle relazioni tra variazioni di pressione e variazioni di volume. Come accennato in precedenza, esistono a livello della matrice extracellulare vascolare di proteine chiamate metallo-proteinasi di matrice MMPs che sono di fondamentale importanza in quanto regolano la distensibilità vascolare. Le metalloproteinasi della matrice (MMPs) sono una famiglia di enzimi proteolitici che degradano vari componenti della matrice extracellulare (ECM). I membri della famiglia MMP includono collagenasi, gelatinasi, stromelisine, matrilisine e MMP di tipo a membrana. Gli inibitori dei tessuti endogeni delle metalloproteinasi (TIMP) riducono l'eccessiva degradazione proteolitica dell'ECM da parte delle MMP. L'equilibrio tra MMP e TIMP gioca un ruolo importante nel rimodellamento vascolare, nell'angiogenesi e nella vasodilatazione uterina e sistemica durante la gravidanza normale. Nel normale rimodellamento vascolare fisiologico, le attività delle MMP sono strettamente regolate a livello di trascrizione, attivazione delle loro pro-forme o zimogeni, interazione con componenti ECM specifiche e inibizione da parte di inibitori endogeni. La preeclampsia, tra le altre cose, comporta gravi aumenti di pressione sanguigna e il rimodellamento vascolare mediato da MMP può giocare un ruolo fondamentale nella patogenesi della malattia (Qiu Q., 2004) perché è stato dimostrato che l'accumulo di collagene con contemporanea riduzione dell'elastina possono rappresentare il fattore determinante nella riduzione dell'elasticità della parete arteriosa e del flusso di sangue al feto, situazione che si verifica proprio nella preeclampsia (Iwaki T., 2004) . È stato anche visto in diversi studi scientifici che ci sono alcuni fattori uteroplacentari come le MMPs,

piuttosto che gli inibitori tissutali delle MMPs (TIMP), il membro canonico della famiglia delle catenine WNT 2/ β e fattori proangiogenici / antiangiogenici, la crescita della placenta, che se sbilanciati possono essere associati a un errato rimodellamento vascolare ma anche a una ridotta invasione trofoblastica. Attualmente in letteratura non ci sono molte evidenze circa l'effetto del BPA, su questi fattori ed in particolare su MMP-2 e MMP-9, che sono quelli maggiormente coinvolti nel rimodellamento vascolare. Tuttavia, studi epidemiologici hanno mostrato un'associazione tra l'esposizione al BPA e la preeclampsia, il BPA è stato definito come un fattore che determina effetti molto simili a quelli indotti dalla preeclampsia. In particolare, uno studio ha rilevato che nei topi esposti a 4 μ M di BPA, il profilo genico correlato all'invasione dei trofoblasti era interrotto; ci sono stati livelli aumentati di trascritti per i geni inibitori dell'invasione trofoblastica TIMP1 e TIMP-2 e livelli ridotti di trascritti per i geni che mediano l'invasione trofoblastica MMP-2 e MMP-9; WNT2 e β -catenina. Sono stati individuati anche livelli ridotti di proteine WNT- 2 e β -catenina negli estratti placentari di topi esposti al BPA rispetto a quelli non esposti, il che significa che il BPA gioca un ruolo importante nella soppressione dell'invasione delle cellule trofoblastiche. Il fatto che il BPA possa avere un effetto sui livelli di espressione di MMP-2 e MMP-9 ci porta a pensare che il BPA possa, in qualche modo, determinare un'alterazione della compliance vascolare che è molto importante in gravidanza per garantirne il corretto funzionamento dei vasi, il corretto nutrimento fetale, e, conseguentemente il corretto sviluppo di quest'ultimo. È stato dimostrato che l'esposizione al BPA regola queste vie di segnalazione attraverso meccanismi epigenetici. I WNT sono una famiglia di glicoproteine secrete con diversi ruoli vitali nello sviluppo e nell'invasione del trofoblasto umano (Su MT., 2017; Isaka K., 2003), in parte inducendo l'espressione di MMP2 e -9 (Biadasiewicz K., 2011). La ridotta espressione di WNT2 altera l'invasione dei trofoblasti e si correla con un aumento del rischio di preeclampsia (Poston L., 1995). Ciò che è stato visto è una ridotta espressione di WNT2, β -catenina, MMP2 e MMP9 e un'elevata espressione di TIMP1 e -2 mRNA nelle placente trattate con BPA, suggerendo fortemente che il BPA inibisce l'invasione del trofoblasto tramite la segnalazione WNT. L'espressione di WNT2 è down-regolata dalla riprogrammazione della metilazione del DNA nella placenta umana (Qiu Q., 2004). Poiché non sono molti gli articoli che analizzano gli effetti del BPA sulla distensibilità vascolare, le informazioni relative a questo argomento si limitano a questi. Una cosa è certa, il fatto che il BPA abbia un effetto sulle metalloproteinasi di Matrice ci porta a pensare che sia coinvolto nell'alterazione del corretto rimodellamento vascolare uterino anche in questo senso, alimentando l'ipotesi che abbia una "preeclampsia simile" effetto.

Capitolo 3.

Placenta ed effetti del BPA sui prodotti della gravidanza:

3.1 La placenta:

Per i nove mesi della sua esistenza intrauterina, il feto umano dipende totalmente dalla placenta, un organo extracorporeo transitorio che si interfaccia con la madre, per sostenerlo e proteggerlo.

L'ampia varietà di forme morfologiche placentari osservate tra i mammiferi rende l'organo difficile da definire, ma il placentologo comparativo Harland Mossman ne ha catturato l'essenza affermando: "La normale placenta dei mammiferi è un'apposizione, o fusione, delle membrane fetali alla mucosa uterina per uno scambio fisiologico" (Mossman HW., 1937). Questa definizione riconosce giustamente lo scambio fisiologico come la funzione primaria della placenta, ma non enfatizza gli altri compiti che l'organo deve svolgere per raggiungere quella funzione; ad esempio, il suo rimodellamento delle arterie a spirale uterine all'inizio della gravidanza per stabilire la circolazione materna, la sua attività endocrina che ha un profondo effetto sul metabolismo materno e il suo ruolo metabolico nel fornire substrati protetti per il feto.

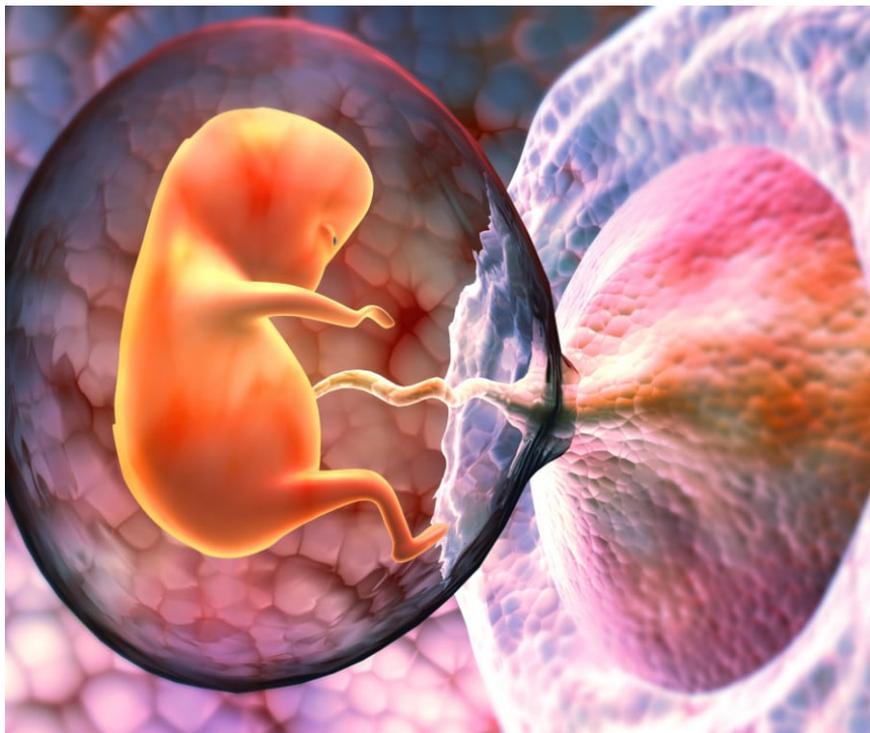


Figura 7. Connessione placentale-fetale

3.1.1 Struttura e sviluppo della placenta umana:

La placenta e le membrane extraembrionali associate si formano a partire dallo zigote all'inizio di ogni gravidanza e quindi hanno la stessa composizione genetica del feto. Le due principali fonti di tessuto che la compongono sono il *trofodermis* che forma la parete della blastocisti e il *mesodermis* extraembrionale sottostante. Il trofodermis si differenzia in trofoblasto, che a sua volta forma il rivestimento epiteliale della placenta e dà anche luogo alla sottopopolazione di cellule trofoblastiche extravillosi invasive. Il mesodermis extraembrionale costituisce, invece, il nucleo stromale della placenta, da cui hanno origine i fibroblasti, la rete vascolare e la popolazione dei macrofagi. La placenta è un organo grossolanamente discoide e presenta un diametro medio di 22 cm; uno spessore di 2,5 cm al centro e un peso di circa 500 g. Le sue superfici sono rappresentate dalla placca corionica rivolta verso il feto e alla quale è attaccato il cordone ombelicale, e la placca basale che confina con l'endometrio materno. Tra queste placche c'è una cavità, definita spazio intervillare, in cui si proiettano 30-40 alberi villosi fetali riccamente ramificati. Ogni albero villosi si ramifica è localizzato sull'apertura di un'arteria spirale materna. Il sangue materno rilasciato in queste aperture filtra tra i rami dei villi prima di defluire nelle aperture delle vene uterine e di uscire dalla placenta. Ciascun lobulo rappresenta, quindi, un'unità di scambio materno-fetale indipendente. La copertura epiteliale dell'albero villosi è il sinciziotrofoblasto, un vero sincizio multinucleato che non presenta fessure intercellulari allo spazio intervillare. Grazie alla sua posizione, il sinciziotrofoblasto è coinvolto in molte delle funzioni della placenta, come la sintesi e la secrezione di grandi quantità di ormoni steroidei e peptidici, la protezione dagli xenobiotici e il trasporto attivo. Ha un alto tasso metabolico e rappresenta circa il 40% del consumo totale di ossigeno dell'unità fetoplacentare (Carter AM., 2000). Il sinciziotrofoblasto è un tessuto differenziato terminale e la sua espansione durante la gravidanza è ottenuta mediante la fusione e l'incorporazione di cellule citotrofoblastiche mononucleari sottostanti che poggiano sulla membrana basale sottostante (Gauster M. , 2010; Rote NS., 2010). La formazione della placenta inizia subito dopo la fecondazione e le prime settimane di gravidanza sono molto importanti per una corretta placentazione. Allo stesso modo, gli organi fetali si formano nel primo trimestre, mentre il bambino impiegherà il resto della gravidanza per crescere e aumentare di peso. Per questo motivo, negli ultimi anni medici e ricercatori hanno iniziato a insistere sull'importanza del primo trimestre per il futuro della gravidanza e per la salute della madre e del bambino, e in

particolare sull'importanza delle abitudini di vita in questo primo trimestre e forse anche prima, abitudini che è molto importante riuscire a rispettare a pieno, come ad esempio, evitare alcol e fumo, condurre una dieta sana (varia ed equilibrata, preferibilmente parametrica) e svolgere attività fisica regolare.

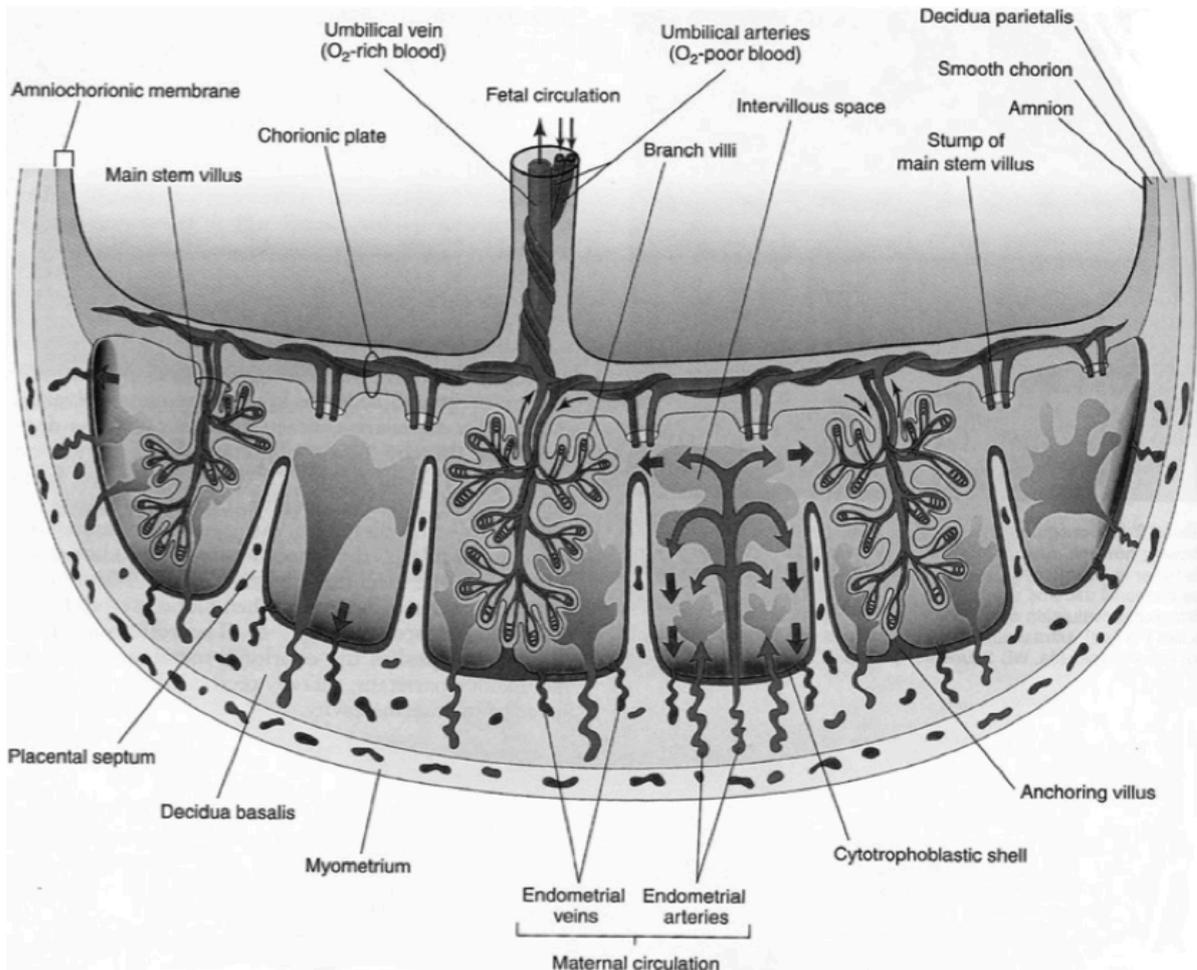


Figura 8. Sezione trasversale di una placenta a termine.

3.2 Funzioni placentari:

Le funzioni svolte dalla placenta sono molto numerose, infatti, agisce come:

- *Polmone*: fornendo ossigeno al feto e rimuovendo l'anidride carbonica. Questi gas si diffondono facilmente attraverso il sottile strato di cellule che separa i villi coriali dal sangue materno.
- *Rene*: purificando e regolando i fluidi corporei del feto.

- *Apparato digerente*: procurando e fornendo nutrienti. La placenta, infatti, è permeabile a molti nutrienti presenti nel sangue della madre, come glucosio, trigliceridi, proteine, acqua e alcune vitamine e minerali.
- *Sistema immunitario*: consentendo il passaggio degli anticorpi dovuti all'endocitosi ma impedendo quello di molti patogeni (ad eccezione, ad esempio, dei virus della rosolia e dei protozoi della toxoplasmosi).
- *Barriera protettiva*: impedendo il passaggio di molte sostanze nocive, anche se alcune possono ancora attraversarla e nuocere al feto (caffaina, cocaina, alcol, alcuni farmaci, nicotina e altre sostanze cancerogene presenti nel fumo di sigaretta).

3.2.1 Assorbimento di nutrienti da parte della placenta:

Il feto ottiene i nutrienti necessari al suo sostentamento e alla sua crescita dal sangue materno, attraverso la placenta, e principalmente glucosio, aminoacidi, acidi grassi, vitamine e minerali. Il trasporto dei nutrienti è influenzato dai gradienti di concentrazione e dal metabolismo del flusso sanguigno placentare.

Glucosio: il trasporto del glucosio avviene per diffusione facilitata lungo un gradiente di concentrazione attraverso la placenta dalla madre al feto. Questo processo è mediato da una famiglia di trasportatori chiamati GLUT; principalmente a svolgere questo ruolo è l'isoforma GLUT-1, che si trova all'interno delle membrane sia materna ("microvillosa") sia fetale ("basale") del sinciziotrofoblasto.

Aminoacidi: l'elevata velocità di sintesi proteica necessaria per la crescita e lo sviluppo fetale fanno pensare che le concentrazioni fetali di aminoacidi sono, generalmente, superiori rispetto a quelle materne; a tal proposito sono stati identificati circa 15-20 specifici meccanismi di trasporto attivo aminoacidico nelle membrane microvillose o sinciziotrofoblastiche basali. Questi meccanismi includono trasportatori di aminoacidi Na-dipendenti e Na / Cl-dipendenti, cationici e associati alla glicoproteina. I trasportatori possono essere inibiti da alcol o nicotina.

Acidi grassi: gli acidi grassi essenziali sono una componente vitale delle membrane e sono un requisito per la crescita cellulare e il metabolismo. Le lipoproteine materne possono essere assorbite dalla placenta direttamente tramite specifici recettori delle lipoproteine o recettori definiti scavenger, oppure, ancora, gli acidi grassi possono essere generati dall'attività della lipasi placentare, in particolare dalla lipoproteina lipasi nella membrana microvillosa. Gli acidi grassi liberi (FFA) prodotti si diffondono attraverso la membrana.

all'interno del citoplasma sinciziale, gli FFA legati a FABP possono essere esterificati, b-ossidati o trasportati nel sistema vascolare fetale tramite FATP o diffusione.

Calcio: il feto accumula circa 25-30 g di calcio nel corso della gravidanza per mineralizzare lo scheletro (in particolare durante il terzo trimestre) e per contribuire a molte funzioni cellulari, tra cui la crescita cellulare, il rilascio di neurotrasmettitori e la trasduzione del segnale. Vari studi condotti sulla reazione a catena della polimerasi della trascrittasi inversa (RT-PCR) indicano soprattutto i canali L-type, canali del calcio voltaggio-dipendenti e potenziali canali del recettore transitorio, come candidati per il trasporto attivo dei canali del calcio nelle membrane dei sinciziotrofoblasti.

Ferro: Ferritine e transferrine si sono evolute, rispettivamente, per immagazzinare e trasportare ferro e elementi vitali in molti processi cellulari, ma anche per catalizzare la produzione di specie reattive dell'ossigeno nocive. La transferrina diferrica si lega a un recettore sulla membrana microvillosa sinciziotrofoblastica e il complesso viene interiorizzato in vescicole acide. Il successivo trasporto al sistema vascolare fetale probabilmente coinvolge un trasportatore di metallo bivalente-1, un trasportatore-1 regolato dal ferro e l'ossidasi di rame (efestina).

Inoltre, attraverso la placenta avvengono una serie di scambi gassosi indispensabili per il corretto sviluppo fetale.

3.2.2 Azione ormonale della placenta:

La placenta funziona come un organo endocrino. Secerne ormoni sia peptidici che steroidei, che agiscono per mantenere la gravidanza e prepararsi al parto e all'allattamento. I due principali ormoni peptidici secreti dalla placenta sono la gonadotropina corionica umana (hCG; prodotta dal sinciziotrofoblasto) e il lattogeno placentare umano (hPL), noto anche come somato-mammotropina corionica umana hCG ad azione luteotrofica, prolungando la vita del corpo luteo e quindi mantenendo secrezione di progesterone per prevenire la diffusione dell'endometrio. Dopo 6-8 settimane la placenta assume la produzione di progesterone e continua a secernere quantità minori di hCG. hPL è anche prodotto dal sinciziotrofoblasto. Agisce per promuovere la crescita del tessuto mammario in preparazione per l'allattamento e ha anche effetti metabolici antagonizzando l'uso del glucosio materno e migliorando la mobilizzazione dei grassi. I principali steroidi secreti dalla placenta sono gli estrogeni (che inibiscono la maturazione di altri follicoli), principalmente estradiolo e

progesterone (che previene le contrazioni uterine e supporta l'endometrio) e altri (inclusi inibina, prolattina e pronenina). Il progesterone mantiene l'endometrio, riduce l'attività miometriale e sopprime le risposte immunologiche materne agli antigeni fetali. Agisce come un precursore della produzione di steroidi da parte delle ghiandole surrenali fetali. La produzione di estrogeni implica l'uso di substrati androgeni dalla madre e dal feto ("l'unità materno-feto placentare"). Il deidroepiandrosterone (DHEA) è prodotto dalla ghiandola surrenale fetale e viene convertito in 16-idrossi-DHEA nel fegato fetale. Gli enzimi aromatasi attivi nella placenta convertono quindi questi precursori in estradiolo ed estrone.

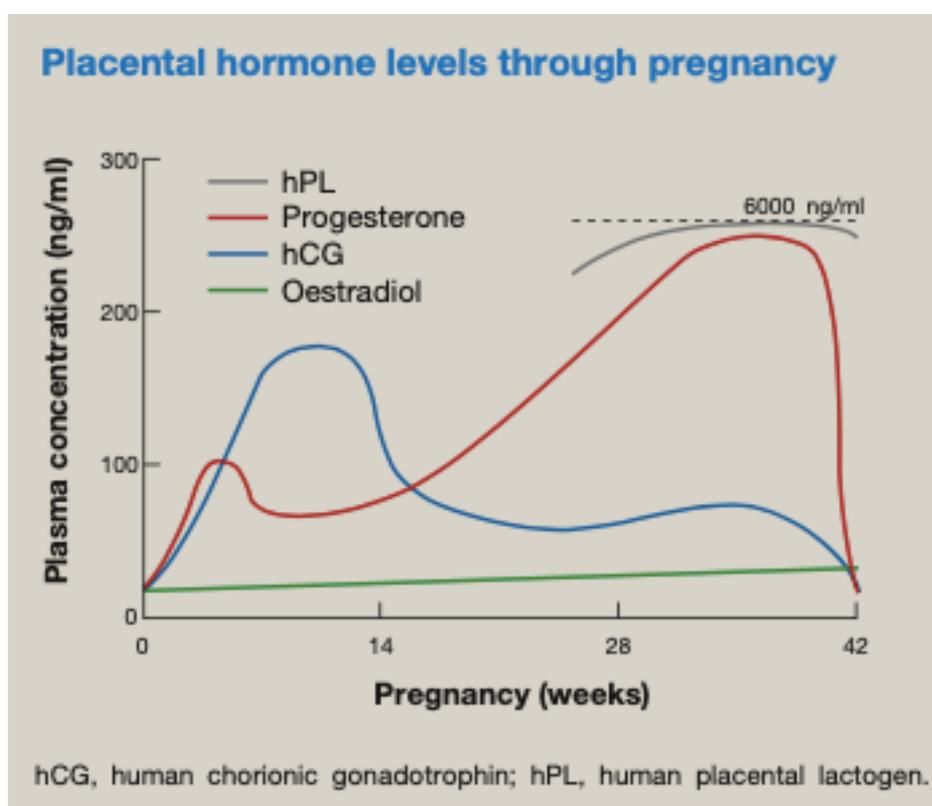


Figura 9. Livelli ormonali placentare in gravidanza.

È interessante notare che la placenta manca di alcuni degli enzimi necessari per completare la sintesi degli ormoni steroidei; tuttavia, questi enzimi sono presenti nel feto. In questo modo, almeno dal punto di vista endocrino, si instaura un rapporto di "simbiosi", tanto che si parla di "unità fetale-placentare". La placenta, quindi, provvede a tutte le necessità del feto, nutrendolo, proteggendolo e costruendo un legame intimo con la madre; un legame fatto di cura e rifiuto, di dipendenza e autonomia che, per molti aspetti, accompagnerà i due individui anche nella vita extrauterina.

3.3 Trasporto Placentare:

Il trasferimento di una sostanza attraverso la barriera materno-fetale dipende dallo spessore e dall'estensione della barriera stessa, nonché dal gradiente di concentrazione della sostanza, o dalla presenza di meccanismi di trasferimento attivi. La placenta, come detto, svolge molteplici funzioni importanti per il corretto sviluppo fetale e per il corretto esito della gravidanza. L'assenza di giunzioni intercellulari nello strato sinciziotrofoblastico suggerisce che lo scambio di sostanze attraverso quest'organo deve avvenire tramite le membrane plasmatiche apicali e basali, sebbene vi siano due possibili eccezioni. In primo luogo, è stata postulata la presenza di canali trans-trofoblastici pieni d'acqua. La prova principale di tali canali è che la placenta umana è liberamente permeabile a soluti di 1350-5200 dalton, mentre nella placenta epitelio-coriale della pecora la diffusione è limitata a molecole di oltre 400 dalton (Willis DM., 1986; Thornburg KL., 1988). È ben noto che ci sono piccoli difetti sparsi nella superficie sinciziotrofoblastica di tutte le placente umane, che portano alla deposizione di placche di fibrina (Burton GJ. , 1987; Burton GJ., 1987). In questo contesto, le placche rappresentano una possibile via per la diffusione di molecole idrofile, mentre in termini più ampi possono anche essere potenziali portali per l'ingresso di cellule immunitarie materne e per la trasmissione verticale di patogeni. Studi immunoistochimici hanno individuato il trasferimento di alfa-fetoproteina a questi siti (Brownbill P., 1995), suggerendo che possano svolgere un ruolo significativo dal punto di vista fisiologico. Lo scambio attraverso la membrana placentare intatta può avvenire attraverso tre processi principali: diffusione, meccanismi mediati dal trasportatore ed endocitosi / esocitosi. La velocità di diffusione di una molecola scarica è determinata dalla legge di diffusione di Fick, e quindi è proporzionale all'area superficiale per lo scambio, alla diffusività della molecola in questione e al suo gradiente di concentrazione, e inversamente proporzionale alla distanza di diffusione tra il circolazioni. Data l'importanza di questi parametri strutturali, non è irragionevole presumere che i requisiti per lo scambio diffusionale, e in particolare lo scambio di ossigeno, siano i principali motori dell'architettura placentare. Quindi, l'elaborazione dei villi terminali e delle membrane vasculosinciziali con l'avanzare della gestazione aumenterà la capacità di diffusione dell'organo. Questa visione è supportata dal fatto che la capacità di diffusione teorica specifica (ml per min per kPa per kg di feto) della placenta per l'ossigeno stimata stereologicamente rimane costante per tutta l'età gestazionale (Mayhew TM., 1993). Oltre a questi parametri strutturali, lo scambio di molecole cariche sarà influenzato da qualsiasi gradiente elettrico esistente tra la circolazione materna e quella fetale. Si è visto, in numerosi studi, inoltre che la forza trainante per il flusso cationico nel sinciziotrofoblasto diminuisce

e quella per gli anioni aumenta con l'avanzare della gravidanza. La diffusione di piccole molecole relativamente idrofobe, come i gas respiratori, attraverso la membrana plasmatica avviene rapidamente. Quindi, il loro flusso dipende più dal gradiente di concentrazione attraverso la membrana dei villi che dalla sua superficie o spessore. Il gradiente di concentrazione, a sua volta, è determinato in parte da fattori materni e ambientali, ma è prevalentemente influenzato dalla velocità del flusso sanguigno attraverso la membrana. Lo scambio di tali molecole viene definito "a flusso limitato" e la compromissione della circolazione uterina o ombelicale, come è facile dedurre, può quindi avere un profondo impatto sulla velocità di crescita fetale. Al contrario, per le molecole insolubili (idrofile) nei lipidi, come il glucosio, che non si diffondono così facilmente attraverso le membrane plasmatiche, il gradiente di concentrazione è spesso più stabile. In questo caso, i parametri strutturali della membrana dei villi sono più significativi e si dice che lo scambio sia "limitato dalla membrana o dalla diffusione". Le proteine trasportatrici possono consentire lo scambio verso il basso di un gradiente di concentrazione a una velocità maggiore rispetto alla semplice diffusione, spesso indicata come diffusione facilitata. Il classico esempio nella placenta è la famiglia di trasportatori GLUT che trasportano il glucosio. In alternativa, possono consentire lo scambio di molecole, come gli amminoacidi, contro un gradiente di concentrazione, denominato trasporto attivo, che è un processo dipendente dall'energia. L'espressione dei geni che codificano le proteine trasportatrici è, in parte, sotto controllo endocrino e la leptina sovraregola i trasportatori del glucosio e degli amminoacidi, facilitando il trasferimento dei nutrienti (Tessier DR., 2013). Inoltre, uno dei maggiori vantaggi relativi allo scambio mediato dai trasportatori è che, in condizioni avverse, la velocità può essere modulata alterando il numero di proteine inserite nella membrana plasmatica (Fowden AL., 2009). Pertanto, se la superficie per lo scambio viene ridotta, sperimentalmente nei topi, o la madre è soggetta a denutrizione, l'espressione placentare di alcuni trasportatori di amminoacidi risulterà aumentata, aumentando il flusso (Sibley CP., 2004 ; Coan PM., 2010). L'endocitosi è il processo mediante il quale le invaginazioni si formano sulla superficie delle cellule apicali, si staccano e quindi si spostano più in profondità nel citoplasma. Lì, possono fondersi con le vescicole della via lisosomiale o attraversare la cellula e fondersi con la superficie basale nel processo di esocitosi. Il primo fornisce nutrienti per la scomposizione da parte di molecole di enzimi proteolitici e l'uso da parte della cellula, mentre il secondo rappresenta una via di trasporto. Entrambi sono attivi nel sinciziotrofoblasto della placenta umana (King BF., 1982; Hempstock J., 2004).

3.3.1 Trasportatori placentari coinvolti nella crescita fetale:

Poiché la placenta è responsabile del trasferimento della maggior parte delle sostanze tra la circolazione materna e quella fetale, la crescita fetale è intimamente legata alle funzioni di scambio della placenta e la dimensione di un feto alla nascita riflette direttamente il trasferimento netto di soluti e acqua attraverso il placenta durante la gestazione e, quindi, il corretto funzionamento di questo organo. Nell'uomo, il primo passaggio coinvolto nell'attraversamento della placenta richiede il trasporto attraverso la membrana plasmatica microvillosa (MVM) del sinciziotrofoblasto, l'epitelio trasportatore della placenta (Fig. 1). Una volta nel citoplasma, le molecole destinate al feto escono dal sinciziotrofoblasto attraverso la membrana plasmatica basale (BM) rivolta verso il feto. La MVM e la BM sono probabilmente le più importanti barriere di membrana coinvolte nel trasferimento materno-fetale (Sideri M., 1983). Rappresentano la fase limitante nel trasporto dei nutrienti primari del feto come glucosio e amminoacidi.

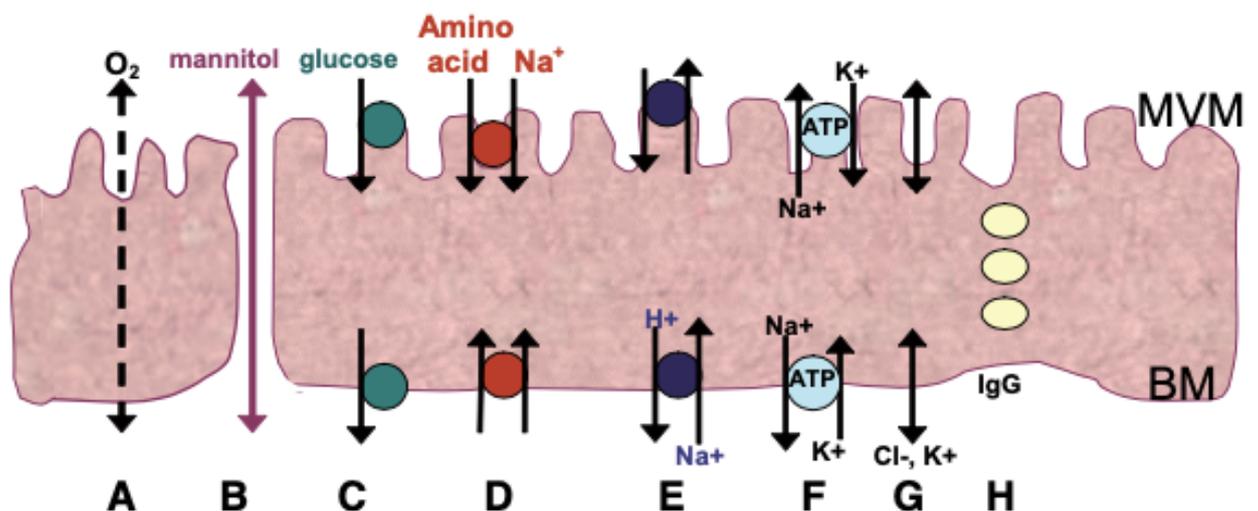


Figura 10. Diagramma schematico che illustra i principali meccanismi di trasferimento attraverso la membrana microvillosa (MVM) e la membrana basale (BM) del sinciziotrofoblasto.

Diffusione: la maggior parte degli scambi attraverso la placenta è guidata dalla diffusione. Una differenza di concentrazione materno-fetale di qualsiasi molecola, o gradiente elettrochimico per molecole cariche porterà alla diffusione di quella molecola attraverso la placenta lungo il suo gradiente di concentrazione. Ci sono, in generale, due percorsi

disponibili per la diffusione; una via lipofila (per molecole liposolubili) e una via idrofila (per molecole liposolubili). Le sostanze lipofile come i gas respiratori si dissolvono rapidamente attraverso l'intera membrana plasmatica sinciziotrofoblastica (Fig. 11A). A causa dell'ampia superficie disponibile per questo processo, si dice che tale diffusione sia limitata dal flusso: il trasferimento netto dipenderà dalla differenza di concentrazione materno-fetale del gas, che a sua volta dipende dalle velocità di flusso della circolazione uterina e ombelicale. Non sorprende quindi, meccanicamente, che anomalie nel flusso sanguigno attraverso entrambi i letti vascolari siano associate all'IUGR (Cnossen JS., 2008; Karsdorp VH., 1994). Il fallimento della normale invasione del trofoblasto nella decidua all'inizio della gravidanza può portare al fallimento della normale trasformazione delle arterie a spirale che forniscono sangue direttamente nello spazio intervillare sul lato materno della placenta (Aplin JD., 1991; Pijnenborg R., 1983).

Permeabilità diffusiva della placenta alle molecole idrofile: le molecole idrofile hanno una scarsa solubilità nei doppi strati lipidici e quindi non attraversano facilmente le membrane plasmatiche (Dobson PD., 2008). Di conseguenza, con riferimento all'equazione di Fick sopra descritta, il trasferimento per diffusione di queste sostanze è molto meno influenzato dai gradienti di concentrazione (e quindi dal flusso sanguigno a meno che questo non sia molto basso) ed è maggiormente influenzato dalla superficie della barriera disponibile per la diffusione, e lo spessore di questa barriera; la diffusione di queste molecole deve avvenire attraverso i pori extracellulari riempiti di acqua, bypassando la membrana plasmatica (Stulc J., 1989). La natura morfologica di questi pori - a volte indicata come via paracellulare (Fig. 11B) - nelle placente emcoriali non è chiara ma sembrano esistere due possibilità. I pori possono essere canali transtrofoblastici, che sono stati visualizzati sia nella cavia che nella placenta umana (Kaufmann P., 1982; Kertschanska S., 1994). In alternativa, può essere fornita una via paracellulare durante la denudazione del sinciziotrofoblasto (Brownbill P., 1995; Brownbill P., 2000; Edwards D., 1993). Questa è una caratteristica normale della placenta umana in tutte le fasi della gestazione e le denudazioni sono aperte o piene di depositi di fibrinoidi (Nelson DM., 1990).

Trasportatori di membrana: le proteine trasportatrici trovate nella membrana plasmatica responsabili del trasporto di molecole idrofile includono canali e trasportatori. I canali sono proteine di membrana integrali che trasportano gli ioni lungo il loro gradiente elettrochimico (Fig. 11G). Sebbene la diffusione attraverso i canali sia passiva, è anche selettiva, controllata e saturabile. I trasportatori sono proteine di membrana integrali che si combinano

selettivamente con il soluto e lo traslocano da un lato all'altro della membrana plasmatica. Questo meccanismo è saturabile e può utilizzare energia dal gradiente elettrochimico prevalente (cioè diffusione facilitata, Fig. 11C), o dall'idrolisi di ATP (cioè trasporto attivo, Fig. 11F). Alcuni vettori possono trasportare più di un soluto alla volta, ad es. co-trasportatori che trasportano entrambi i soluti nella stessa direzione (Fig. 2D) e scambiatori che trasportano i soluti in direzioni opposte (Fig. 2E). I portatori possono sfruttare i gradienti generati dalle pompe collegando i movimenti di + soluto. I soluti vengono spostati contro il loro gradiente di concentrazione utilizzando questo processo di trasporto attivo secondario (Fig. 2D). L'endocitosi, un'altra forma di trasporto transcellulare, coinvolge l'invaginazione della membrana plasmatica per formare una vescicola legata alla membrana intracellulare che contiene fluido extracellulare. Il contenuto della vescicola viene rilasciato dall'altra parte della cellula mediante un processo chiamato esocitosi (Fig. 2H): riesaminato da Atkinson et al., 2006 (Atkinson DE., 2006).

In particolare i principali trasportatori placentari coinvolti nella crescita fetale includono:

Trasporto ionico: nella placenta svolge due funzioni, mantenimento dell'omeostasi cellulare in termini di gradienti elettrochimici e volume delle cellule placentari, particolarmente importante per il sinciziotrofoblasto con i suoi alti tassi di flussi di soluti transcellulari e fornitura di cationi e anioni al feto.

Canali del potassio: come in tutti gli epitelii, la differenza di concentrazione di ioni transmembrana e la differenza di potenziale elettrico (il gradiente elettrochimico) sono determinanti importanti della velocità e della direzione di trasporto degli ioni e dei processi che comportano il trasferimento netto di carica (es. co-trasporto). Sono stati compiuti alcuni progressi nell'identificazione dei canali K^+ nel sinciziotrofoblasto e questi includono Kir2.1 (Clarson LH., 2002; Mylona P., 1998), membri della famiglia TASK e TREK (Bai X., 2005; Bai X., 2006). Ci sono canali K^+ presenti nell'MVM (Fig. 2G) (Bai X., 2005; Greenwood SL., 1993b).

$Na^+ / K^+ / ATPasi$: in alcune cellule, una parte dell' E_m è generata dall'attività della pompa $Na^+ / K^+ / ATPasi$ o Na^+ (Fig. 2F). La pompa Na^+ estrude attivamente il sodio dalla cellula in cambio di K^+ utilizzando l'energia sotto forma di ATP (Clarson LH., 1996). Questo genera un gradiente di Na^+ diretto verso l'interno che a sua volta facilita i meccanismi di ingresso di Na^+ . Nella placenta, si pensava originariamente che questo trasportatore fosse localizzato prevalentemente sul BM (Kelley LK., 1983) come in altri

epiteli, ma uno studio più recente e approfondito ha mostrato che sia l'espressione che l'attività di $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / \text{ATPasi}$ sono presenti sulla MVM a livelli doppi rispetto a quella del BM (Johansson M., 2000). L'attività di $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / \text{ATPasi}$ è relativamente bassa nella placenta rispetto ad altri epitelii di trasporto (Birdsey TJ., 1997) e non contribuisce in modo significativo all'em in cellule citotrofoblastiche (Greenwood SL., 1996) o sinciziotrofoblasto intatto (Birdsey TJ., 1997).

Scambiatore Na^+ / H^+ : esistono vari meccanismi per il trasporto di Na^+ nel sinciziotrofoblasto tra cui conduttanze di sodio, scambio Na^+ / H^+ e co-trasporto con ioni inorganici e soluti organici (Shennan DB., 1987). L'ingresso di Na^+ nella cellula attraverso la via conduttiva implica il movimento di Na^+ lungo il suo gradiente elettrochimico (Chipperfield AR., 1988) ma la natura di questa via non è stata ancora caratterizzata nel sinciziotrofoblasto. Lo scambiatore Na^+ / H^+ (NHE) catalizza un accoppiamento elettroneutrale dell'afflusso di Na^+ nel sinciziotrofoblasto con efflusso di H^+ (Balkovetz DF., 1986; Sibley CP., 2002) mostrato in Fig. 2E. Si ritiene che la funzione principale dell'NHE sia la regolazione del pH intracellulare (Powell TL., 1996). I canali $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / \text{ATPasi}$, NHE e Na^+ potrebbero essere tutti coinvolti nell'omeostasi dei sinciziotrofoblasti e nel trasporto del catione al feto.

Trasporto di Ca^{2+} : il trasferimento placentare di Ca^{2+} al feto in via di sviluppo è essenziale per la mineralizzazione ossea e, se questo è anormale, può aumentare il rischio di sviluppare l'osteoporosi più avanti nella vita (Tobias JH., 2004). L'accrescimento fetale di Ca^{2+} aumenta in modo esponenziale nell'ultimo terzo della gravidanza, in concomitanza con lo sviluppo dello scheletro fetale (Comar CL., 1956), suggerendo che esiste un dialogo incrociato tra i due processi. I dati suggeriscono che nella placenta del topo e del ratto, come in altri epitelii, è probabile che il trasporto di Ca^{2+} coinvolga tre fasi principali (Atkinson DE., 2006; Belkacemi L., 2005): in primo luogo, la diffusione nel trofoblasto dal plasma materno verso il basso un gradiente elettrochimico attraverso i canali epiteliali del Ca^{2+} della famiglia del gene del potenziale recettore transitorio (TRP); in secondo luogo, il trasferimento attraverso il citoplasma del trofoblasto legato alla proteina legante il calcio calbindin-D9K (Glazier JD., 1992); e, in terzo luogo, estrusione attiva nel compartimento fetale tramite la membrana plasmatica $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPasi}$ (PMCA) localizzata nel BM (Borke JL., 1989; Fisher GJ., 1987).

Trasporto del glucosio: la crescita e lo sviluppo fetale dipendono da un adeguato apporto di nutrienti da parte della madre, in particolare glucosio e amminoacidi. Il glucosio è una

fonte energetica primaria per il feto. Indagini che utilizzano vescicole della membrana di sinciziotrofoblasto e perfusione placentare hanno dimostrato che il trasporto del glucosio attraverso la placenta umana è saturabile, stereo-specifico, mostra competizione ed è indipendente dalle fonti di energia, cioè mostra tutte le caratteristiche della diffusione facilitata (Fig. 11C) (Bissonnette JM., 1981; Johnson LW., 1985; Rice PA., 1976). Il trasporto del glucosio nei tessuti dei mammiferi è mediato dalla famiglia del gene GLUT dei trasportatori a diffusione facilitata di cui ci sono almeno dodici membri (Joost HG., 2001). La concentrazione di glucosio nel plasma fetale è inferiore a quella nella circolazione materna anche se uno studio ha stimato che la capacità di trasferimento del glucosio della MVM è molte volte superiore a quella richiesta per soddisfare i bisogni fetali e placentari (Johnson LW., 1980). È probabile che il gradiente glicemico materno-fetale possa derivare dalla limitazione del trasferimento transinciziale complessivo da parte della minore capacità di trasporto del BM (Johnson LW. 1985).

Trasporto di amminoacidi: Sulla base di interazioni competitive tra substrati amminoacidici, nella placenta sono stati identificati almeno 15 sistemi di trasporto per amminoacidi neutri, basici e acidi analoghi a quelli per altri epiteli (Jansson T., 2001; Moe AJ., 1995). Molti dei trasportatori di amminoacidi sono stati ora clonati e caratterizzati a livello molecolare (Kudo Y., 2002). I geni che codificano i diversi trasportatori sono suddivisi in diverse famiglie di portatori di soluti (SLC). Ad esempio, la famiglia SLC38 codifica per i trasportatori di amminoacidi neutri del sistema A e del sistema N (Hediger MA., 2004). La classificazione più generalmente accettata dei trasportatori di amminoacidi li divide in due sistemi: quelli che co-trasportano Na⁺ con l'amminoacido (sistemi Na⁺-dipendenti) e quelli che non lo fanno (Na⁺-indipendenti sistemi) (Christensen HN., 1982). I trasportatori di amminoacidi Na⁺-dipendenti sono trasportatori attivi secondari perché non utilizzano direttamente ATP. Invece sfruttano l'energia attiva della Na⁺/K⁺ ATPasi che crea il gradiente Na⁺.

3.4 Ritardo di crescita intrauterino (IUGR):

La restrizione della crescita intrauterina (IUGR) è definita come l'incapacità di un feto di raggiungere il suo potenziale di crescita geneticamente determinato (Brodsky D., 2004). L'IUGR colpisce circa il 5-15% di tutte le gravidanze negli Stati Uniti e in Europa, ma varia ampiamente tra i paesi in via di sviluppo (30-55% dei bambini nati nell'Asia centro-meridionale, 15-25% in Africa e 10-20% in America Latina); (Kramer M., 2003; Saleem T., 2011). L'identificazione di neonati con limitazione della crescita fetale è resa difficile dalla

mancanza di consenso internazionale sulla definizione e sui criteri diagnostici dell'IUGR. Nella pratica clinica il rilevamento dei feti IUGR si basa sul peso alla nascita (<2500 g) o sul peso fetale stimato (<10 ° percentile) e sulla valutazione ecografica della crescita fetale (circonferenza addominale <2,5 ° percentile). Inoltre, indici di velocimetria Doppler alterati, come forme d'onda anomale dell'arteria ombelicale o ridotta pulsatilità dell'arteria cerebrale media, suggeriscono anomalie nella circolazione fetale e sono indicative di IUGR. L'IUGR è associato a un aumento del rischio di natimortalità (Smith GC., 2007), mentre è anche una delle principali cause di morbilità e mortalità perinatale (Salam RA., 2014). I neonati IUGR sono a maggior rischio di parto pretermine, asfissia, termoregolazione alterata, ipoglicemia, disfunzione cardiaca e infezioni. Inoltre, una ridotta crescita fetale può avere conseguenze negative sulla salute per tutta la vita, inclusi un deterioramento del progresso neuro-evolutivo nell'infanzia e un rischio più elevato di malattie metaboliche e cardiovascolari nell'età adulta (Barker DJ., 2006; Longo S., 2013). L'IUGR è spesso associato a sviluppo, struttura e morfologia della placenta alterati, che a loro volta alterano la funzione placentare e la capacità di fornire nutrienti al feto (Baschat AA., 2004; Lager S., 2012). Diverse cause, di origine ambientale, materna e fetale, possono portare a insufficienza placentare. Questi includono gravidanze ad alta quota, condizioni associate a flusso sanguigno uteroplacentare alterato, giovane età materna, denutrizione, infezioni placentari e processi infiammatori, fumo di sigaretta, uso di droghe illecite, malattie genetiche fetali e malformazioni congenite (Figura 11).

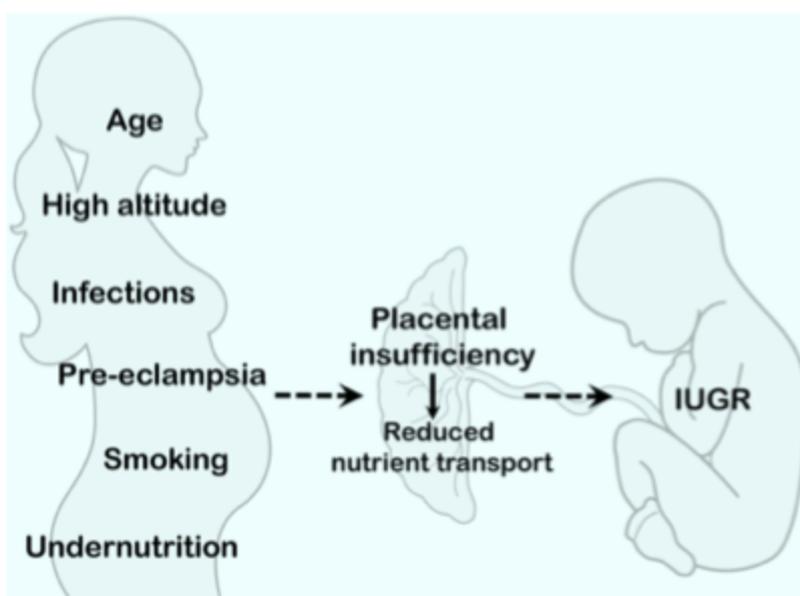


Figura 11. Condizioni materne e ambientali associate all'IUGR.

3.4.1. Funzioni di trasporto placentare alterate in IUGR:

Sebbene sia generalmente accettato che l'IUGR sia associato a limitazioni nell'apporto di nutrienti e ossigeno, i meccanismi coinvolti devono essere completamente stabiliti. Un fattore importante che determina l'IUGR è dato da una serie di alterazioni nelle funzioni di trasporto placentare, come abbiamo visto, ci sono diversi trasportatori placentari coinvolti nella crescita fetale. Sono molti gli studi che dimostrano che il ritardo della crescita intrauterina può essere determinato da una serie di alterazioni nelle funzioni di trasporto placentare, infatti si riduce l'attività di un certo numero di trasportatori come ad esempio Sistema A, L e tau, trasportatori per amminoacidi cationici, lo scambiatore sodio-protone e la pompa del sodio (Jansson T., 2006). Queste alterazioni del trasporto placentare sono il risultato di una specifica regolazione da parte della placenta, che determina, almeno in parte, l'andamento della crescita fetale. In particolare, per quanto riguarda i trasportatori: l'isoforma 1 del trasportatore del glucosio (GLUT 1) è il trasportatore primario che media il trasferimento facilitato del glucosio attraverso la barriera placentare umana nella seconda metà della gravidanza e il movimento del glucosio attraverso il BM sembra essere il passo limitante (Jansson T., 1993; Jansson T., 2000). È improbabile che l'ipoglicemia fetale in IUGR sia dovuta a cambiamenti nei trasportatori del glucosio placentare poiché sia l'espressione della proteina GLUT 1 che l'attività di trasporto del glucosio nelle membrane plasmatiche di sinciziotrofoblasto sono stati riportati inalterati nell'IUGR (Jansson T., 1993; Jansson T., 2000). Il trasporto di amminoacidi attraverso la placenta umana è un processo attivo che determina concentrazioni di amminoacidi nella circolazione fetale sostanzialmente più elevate di quelle nel plasma materno. Nello IUGR, l'attività del Sistema A, un trasportatore Na C-dipendente che media l'assorbimento di amminoacidi neutri non essenziali, è marcatamente ridotta nell'MVM (Glazier JD., 1997; Mahendran D., 1993) specialmente nei bambini IUGR che vengono partoriti prematuramente (Jansson T., 2000). Inoltre, l'attività di numerosi sistemi di trasporto placentare per amminoacidi essenziali, come lisina, leucina (Jansson T., 1998) e taurina (Norberg S., 1998), è ridotta in MVM e / o BM isolati dalle placente IUGR. Questi risultati in vitro sono compatibili con uno studio su donne in gravidanza in cui Paolini et al. ha dimostrato, utilizzando tecniche di isotopi stabili, che il trasferimento placentare degli amminoacidi essenziali leucina e fenilalanina è ridotto in IUGR (Paolini CL., 2001). la sotto regolazione dei trasportatori di aminoacidi placentari in IUGR si traduce in una diminuzione del rilascio di aminoacidi al feto ed è probabile che sia un fattore importante che causa le basse concentrazioni plasmatiche fetali di alcuni aminoacidi in questa complicanza della gravidanza. Gli aminoacidi sono, insieme al glucosio, lo stimolo principale per la secrezione di insulina fetale, probabilmente il più importante ormone promotore della crescita in utero. Pertanto, sembra che ci sia un

collegamento diretto tra la sotto-regolazione dei trasportatori di aminoacidi placentari e la crescita fetale limitata in IUGR. Il feto IUGR è tipicamente caratterizzato da depositi di grasso sottocutaneo notevolmente ridotti, contribuendo all'aspetto magro del neonato IUGR. Ciò può essere dovuto alla ridotta sintesi di grasso fetale e / o al ridotto trasferimento placentare di acidi grassi liberi. Infatti, un recente rapporto dimostra che l'attività della lipoproteina lipasi MVM, il primo passaggio critico nel trasferimento transplacentare di acidi grassi liberi, è ridotta in IUGR (Magnusson A., 2004). Questi dati sono in linea con gli studi clinici che mostrano rapporti fetali / materni inferiori per gli acidi grassi polinsaturi a catena lunga nello IUGR (Cetin I., 2002). Sebbene sia ormai stabilito che l'IUGR è determinato da limitazioni nell'apporto di nutrienti e O₂ dalla placenta, tutti i meccanismi coinvolti non sono stati completamente stabiliti. Sicuramente un'altra causa di IUGR, a cui viene data molta importanza, è data da un alterato flusso sanguigno dovuto ad un errato rimodellamento vascolare e conseguentemente ad un non corretto sviluppo delle arterie spirale uterine fondamentali per la normale crescita fetale. infatti se queste non si sviluppano correttamente portano ad un esito errato della gravidanza provocando non solo un ritardo della crescita intrauterina ma anche una serie di complicazioni per la madre che provocheranno problemi di ipertensione e pressione sanguigna come avviene nella preeclampsia. Parlando di molecole trasportate attraverso la placenta, un esempio di molecola soggetta a trasporto limitato in caso di flusso sanguigno limitato è l'ossigeno. L'O₂, infatti, è una molecola altamente lipofila e relativamente piccola che si diffonde facilmente attraverso la barriera placentare, quindi è probabile che la riduzione del flusso sanguigno placentare contribuisca all'ipossia fetale in IUGR. Viceversa, in base a quanto detto sopra, il trasporto di altri nutrienti come il glucosio o gli aminoacidi è meno influenzato dalle variazioni del flusso sanguigno.

3.5 Evidenze sull'influenza del Bisphenol A sulla placenta e sullo sviluppo fetale:

In letteratura sono presenti numerosi dati riguardanti l'effetto del BPA sulla placenta e, di conseguenza, sul corretto sviluppo fetale. È stato dimostrato che l'esposizione in vitro a basse dosi di BPA è in grado di agire sull'interfaccia materno-fetale, alterando la secrezione endocrina dei trofoblasti e la capacità di migrare e invadere i tessuti uterini materni, con gravi conseguenze per lo sviluppo delle arterie spirali uterine, che, a seguito della corretta invasione trofoblastica, subiscono un'enorme rima (Narciso L., 2019; Spagnoletti A., 2015; Paulesu L., 2018). Dal lato materno, la decidualizzazione cellulare e la ricettività uterina alla blastocisti impiantata sono entrambe compromesse dal BPA (Paulesu L., 2018). Una cosa

molto importante da evidenziare è che il BPA riesce ad attraversare la barriera placentare e raggiungere il feto con conseguenze molto gravi. In generale, gli animali adulti sono in grado di metabolizzare ed eliminare il BPA dal corpo. In precedenza, è stato riscontrato che il BPA è altamente glucuronato da UGT2B1, un'isoforma dell'uridina 5'-difosfoglucuronosiltransferasi (UGT) espressa nel fegato di ratto (Nishikawa M., 2010). Inoltre, altri esperimenti di perfusione epatica hanno mostrato che il BPA-glucuronide (BPA-GA) risultante era escreto principalmente nella bile (Inoue H., 2001). Kurebayashi et al. Nel 2003 hanno dimostrato che il BPA somministrato per via orale viene metabolizzato principalmente in BPA-GA e che la maggior parte del BPA-GA viene escreta nelle feci attraverso la bile, sebbene una parte venga escreta nelle urine. Questi risultati hanno stabilito che il BPA è quasi completamente eliminato dagli efficienti sistemi di metabolizzazione dei farmaci degli animali adulti (glucuronidazione ed escrezione nella bile) durante il suo passaggio attraverso il fegato. Inoltre, in uno studio di tossicità riproduttiva su tre generazioni di ratti Sprague-Dawley CD, Tyl et al. (2002) non hanno trovato effetti correlati al trattamento con BPA a basso dosaggio (0,001-5 mg / kg / giorno). Ancora una volta, questo è molto probabilmente attribuibile all'efficiente metabolismo dei farmaci degli xenobiotici in un corpo adulto. Al contrario, sono stati segnalati effetti avversi dell'esposizione a basse dosi di BPA durante la gravidanza. Dopo aver esposto ratti gravidi a 14 C-BPA, Domoradzki et al. (2003) hanno rilevato BPA e metabolizzato BPA-GA nella placenta e nel feto. In un altro studio, la radioattività è stata rilevata nell'intestino fetale e nella vescica urinaria il giorno gestazionale (GD) 18 ma non GD12 o GD15 dopo che i ratti gravidi erano stati trattati per via orale con 14C-BPA (Kurebayashi H., 2005). Si è visto che nei topi CD-1, l'esposizione materna a 10 µg / kg di BPA / giorno induce uno sviluppo anormale della prostata e dell'uretra nei feti maschi (Timms BG., 2005). Pertanto, le questioni importanti relative all'esposizione al BPA coinvolgono gli effetti negativi non solo sulla generazione esposta ma anche sulla generazione successiva, quando l'esposizione si verifica durante la gravidanza, anche a basse dosi. Nella madre incinta e nel feto, lo stato fisiologico, inclusi i sistemi di metabolismo dei farmaci, differisce da quello degli animali adulti non gravidi. Cao et al. Nel 2002 hanno dimostrato che l'espressione epatica della proteina 2 associata a resistenza multipla (Mrp2), che espelle coniugati chimici come il glucuronide nel dotto biliare, è ridotta durante la gravidanza nel ratto. Inoltre, è stato dimostrato che la quantità di BPA-GA escreta nelle vene materne è aumentata dall'escrezione compensatoria (Inoue H., 2004). Ciò suggerisce che la concentrazione di BPA-GA nel sangue materno è aumentata durante il periodo gestazionale e, di conseguenza, vi è un aumento del rischio di trasferimento di BPA-GA attraverso la placenta. Un'altra cosa

importante che è stata dimostrata è che l'attività UGT contro gli xenoestrogeni è assente nei ratti fetali e che questa attività si sviluppa dopo la nascita, sebbene sia ridotta nei ratti gravidi (Matsumoto J., 2002). Pertanto, rispetto all'adulto, il feto ha sistemi di metabolizzazione dei farmaci vulnerabili, che possono spiegare gli effetti negativi sul feto stesso. Il meccanismo previsto degli effetti avversi fetali indotti dall'esposizione materna al BPA durante la gravidanza. Il BPA-GA nel sangue materno viene trasferito attraverso la placenta al feto e quindi deconiugato in BPA. Il BPA deconiugato può rimanere nel feto a causa di una carenza di attività UGT fetale con tutti i conseguenti rischi per il feto.

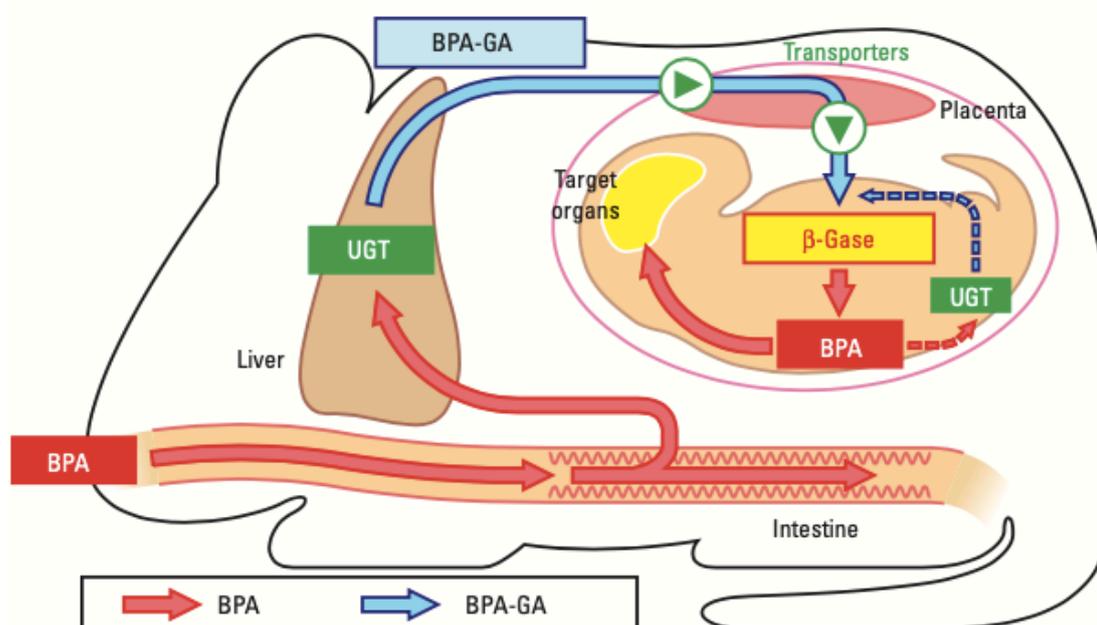


Figura 12. Meccanismo previsto degli effetti avversi sul feto indotti dall'esposizione materna al BPA durante la gravidanza.

Per quanto riguarda, nello specifico, gli effetti che il BPA può avere a livello della placenta, esiste una serie di evidenze scientifiche che ne dimostrano l'effetto a livello della vascolarizzazione placentare, quanto emerge, da uno studio in cui topi CD-1 gravidi sono state somministrate due diverse concentrazioni di BPA 50µg / kg / giorno e 0,5µg /kg/giorno, è che BPA 50µg /kg /giorno ha indotto degenerazione e necrosi significativa delle cellule giganti, aumento della vacuolazione nell'area articolare in assenza di accumulo di glicogeno e riduzione dello strato spongiofoblastico; BPA 0,5µg/kg/giorno ha indotto l'esaurimento del glicogeno e un significativo accumulo nucleare di β-catenina nei trofoblasti degli strati labirintici e spongiofoblastici, supportando l'attivazione della via Wnt2/ β-catenina.

L'analisi trascrittomiche ha indicato che BPA05 ha promosso e BPA50 ha inibito lo sviluppo e la ramificazione dei vasi sanguigni; morfologicamente, i vasi materni erano più stretti nelle placente BPA05, mentre i vasi embrionali e materni erano dilatati irregolarmente nel labirinto delle placente BPA50. La reazione quantitativa a catena della polimerasi ha mostrato un'induzione del recettore estrogeno β da parte di BPA50, che non corrispondeva all'attivazione dei geni a valle, infatti l'analisi dei siti di legame del fattore di trascrizione ha supportato il complesso AhR / Arnt come regolatore di geni modulati con BPA50. Al contrario, Creb è apparso come i principali geni che regolano il fattore di trascrizione modulati con BPA05. Le strutture embrionali (testa, arti anteriori) hanno mostrato perturbazioni divergenti in seguito all'esposizione a BPA05 o BPA50, potenzialmente correlate alla nutrizione embrionale sbilanciata e / o alla modulazione dei geni coinvolti nello sviluppo dell'embrione. I nostri risultati supportano la placenta come un obiettivo importante del BPA, anche a livelli di dose rilevanti per l'ambiente. I risultati sfoltiti di questo studio sono stati confermati da una serie di altri studi in cui, a seguito del trattamento con basse dosi di BPA in topi gravidi, si è osservato che: La reazione quantitativa a catena della polimerasi ha mostrato un'induzione del recettore estrogeno β da parte di BPA50, che non corrispondeva all'attivazione dei geni a valle, infatti l'analisi dei siti di legame del fattore di trascrizione ha supportato il complesso AhR / Arnt come regolatore di geni modulati con BPA50. Al contrario, Creb è apparso come i principali geni che regolano il fattore di trascrizione modulati con BPA05. Le strutture embrionali (testa, arti anteriori) hanno mostrato perturbazioni divergenti in seguito all'esposizione a BPA05 o BPA50, potenzialmente correlate alla nutrizione embrionale sbilanciata e / o alla modulazione dei geni coinvolti nello sviluppo dell'embrione. I risultati ottenuti in questo studio supportano la placenta come un obiettivo importante del BPA, anche a livelli di dose rilevanti per l'ambiente. Inoltre ciò che si è visto in questo studio è stato confermato anche in una serie di altri studi in cui, a seguito del trattamento con basse dosi di BPA in topi gravidi, si è osservato che:

- La proporzione dell'area labirintica per l'intera placenta nei topi trattati con BPA è diventata inferiore a quella nei controlli e quella della ghiandola metriale era più alta nei topi BPA.
- Gli spazi placentari intervillari erano più stretti nei topi BPA. Cambiamenti degenerativi sono stati trovati nelle cellule giganti trofoblastiche e negli strati spongiofoblastici di topi BPA.
- Il numero di neonati di topo BPA è diminuito drasticamente entro 3 giorni dalla nascita e nessun topo è sopravvissuto dopo il P-Day 56. I risultati, presenti in letteratura, suggeriscono che il BPA non solo interrompe le funzioni placentari e porta all'aborto attraverso la

stimolazione cronica dell'espressione genica legandosi al DNA, ma che influenza anche la mortalità infantile attraverso l'esposizione indiretta dell'embrione. In ogni caso, come spesso accade, i dati in letteratura sono discordanti nel senso che alcuni studi, in cui si evidenzia un effetto del BPA sulla placenta, non mostrano alcuna conseguenza sul feto, sul suo corretto sviluppo che rimane inalterato piuttosto che sul numero di aborti spontanei o nascite premature. Uno studio condotto da Anna M. Nuzzo et al. afferma che la placenta risponde a condizioni avverse come l'ipossia adattando la sua capacità di trasferimento del substrato per mantenere la crescita e lo sviluppo fetale. I dati ottenuti da questo studio mostrano che c'è un aumento della superficie placentare e del sangue capillare fetale che potrebbe essere un adattamento compensatorio per aumentare o mantenere la capacità di trasporto della placenta, proteggendo la crescita fetale (Nuzzo AM., 2018). In un altro studio, invece, pubblicato nel 2018, ai topi C57BL / 6 gravidi sono stati somministrati 50 µg / kg di BPA / giorno dal primo giorno di gestazione gd1 a gd7. Il BPA è stato somministrato mediante sonda gastrica per imitare i possibili rischi di esposizione al BPA correlata alla dieta. Hanno seguito lo sviluppo fetale e placentare in vivo mediante misurazioni ecografiche seriali ad alta frequenza. Successivamente, hanno sacrificato gli animali al giorno 14 della gravidanza, determinato i tassi di impianto e aborto e registrato il peso del feto e delle loro placenti. L'esposizione al BPA nelle prime fasi della gravidanza ha provocato, in questo caso, la restrizione della crescita intrauterina (IUGR) che è andata di pari passo con il rimodellamento non ottimale delle SA uterine. senza, tuttavia, chiarire i meccanismi sottostanti (Müller JE., 2018). Allo stesso modo, anche i nostri risultati, sebbene si mostri una riduzione del peso placentare, non dimostrano una riduzione del peso fetale, ma un aumento dello stesso, questo potrebbe essere spiegato dal fatto che è stato osservato a seguito di immunostochimica e western blot analisi, che sono state eseguite nei tessuti placentari di ratto, un aumento del trasportatore del glucosio di tipo 1 GLUT-1. Nel complesso, quindi, si può affermare che l'esposizione prenatale al BPA influisce sulla gravidanza e sulla crescita fetale e lo fa inducendo cambiamenti nel trasferimento dei nutrienti placentari, in particolare, in questo studio è il glucosio che rappresenta il principale carburante metabolico delle cellule di mammifero ed è uno dei i principali nutrienti trasferiti dalla madre al feto durante la gestazione. (Benincasa L., 2020).

4. Obiettivo:

Esistono prove significative che l'esposizione al BPA in gravidanza possa portare ad una serie di esiti avversi come il ritardo di crescita intrauterino (IUGR) piuttosto che effetti molto gravi a livello dello sviluppo placentare, effetti che causano una serie di complicazioni che possono, poi portare a morbilità e mortalità della madre e del feto. Non sono presenti al momento nella letteratura scientifica delle prove circa l'effetto del BPA sulla vascolatura uterina in gravidanza e quindi evidenze scientifiche su ciò che l'esposizione a tale molecola può provocare nei vasi. Considerando che IUGR e alterazioni placentari sono associati entrambi ad un ridotto flusso utero-placentare, questo progetto di ricerca si è posto come obiettivo quello di indagare gli effetti del Bisfenolo A sulla vascolatura uterina e, quindi, la possibile influenza di questa molecola sulla struttura e sulla funzione vascolare uterina evidenziando eventuali alterazioni sia dell'emodinamica vascolare sia dei prodotti della gravidanza cioè feto e placenti. Oltre a questo è stata fatta un'analisi sull'espressione genica di alcuni fattori (quali NOS3; ER- α ; ER- β ; PPAR- γ ; VEGF; Cox-2), coinvolti nel rimodellamento vascolare uterino in gravidanza, per capire se il BPA possa in qualche modo, alterando la loro espressione, alterare la struttura il funzionamento delle arterie uterine e di conseguenza compromettere il corretto esito della gravidanza stessa.

5. Materiali e Metodi:

5.1 Animali:

Gli esperimenti sono stati condotti su ratti Sprague Dawley femmine di 8 settimane di età. I ratti sono stati divisi in quattro gruppi e sono stati trattati con BPA: 1) 2,5 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{giorno}$ ($n = 7$); 2) 25 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{giorno}$ ($n = 8$); 3) 250 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{giorno}$ ($n = 6$) e con 4) veicolo (etanolo; $n = 6$) 0.04% v/v . BPA o etanolo sono stati aggiunti all'acqua da bere per un mese intero prima della gravidanza, il trattamento non è mai stato interrotto fino al giorno del sacrificio dopo 20 giorni di gravidanza. Le femmine gravide sono state ottenute ponendo una femmina in estro con un maschio fertile durante la notte; il rilevamento dello sperma, utilizzando uno striscio vaginale la mattina seguente, è stato utilizzato per confermare il primo giorno di gravidanza. Tutti i ratti sono stati alloggiati individualmente nella struttura Animal Care, tenuti in condizioni controllate con un fotoperiodo luce / buio di 12 ore e hanno fornito cibo commerciale e acqua del rubinetto ad libitum. Gli animali utilizzati a scopo

sperimentale il 20 ° giorno di gravidanza sono stati sottoposti a eutanasia con inalazione di isoflurano seguita da decapitazione a ghigliottina di piccoli animali. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in conformità alle Linee Guida Europee per la cura e l'uso degli animali da laboratorio (Direttiva 2010/63 / UE) e sono stati approvati dal Comitato Etico locale dell'Università della Calabria e dal Ministero della Salute italiano. (n.74 / 2018-PR).



Figura 13. Ratto Sprague Dawley

5.2 Preparazione e isolamento dei tessuti:

Immediatamente dopo l'eutanasia dell'animale, l'utero e il suo sistema vascolare sono stati rimossi in blocco e posti in una capsula di Petri contenente soluzione salina fisiologica HEPES fredda (4 ° C) (HEPES-PSS). Ogni singolo feto e ogni singola placenta sono stati accuratamente sezionati, separati l'uno dall'altro e dall'utero, ripuliti da membrane e cordone ombelicale e pesati. Questi stessi tessuti sono stati preparati e inviati anche presso il dipartimento di dell'Università di Siena, per ulteriori analisi. In particolare, presso questo dipartimento sono stati inviati:

Tessuti fetali:

I feti sono stati prelevati dall'utero e dopo prelievo di sangue dall'arteria carotidea con una piccola siringa eparinizzata per estrarne il siero, sono stati immediatamente immersi in un becher contenente soluzione fisiologica fredda, HEPES PSS a 4 ° C.

Tessuti placentari:

Oltre ai feti dall'utero sono state prelevate due placenti che seguono due tipi di processi diversi. Una di esse viene posta in una provetta da 15 mL e immediatamente congelato a -80 ° C per la successiva estrazione di proteine e analisi western blot.

5.4 Estrazione di proteine e analisi Western blot:

Gli altri tessuti placentari di ratto, che sono stati prelevati e inseriti in flacon da 15 ml e direttamente conservati a -20, sono stati lisati nel tampone di lisi del reagente di estrazione delle proteine dei mammiferi (MPER) ® (Thermo Fisher Scientific) con l'aggiunta dell'1% (v / v) di Halt™ Protease e cocktail monouso con inibitore della fosfatasi (Thermo Fisher Scientific). Per l'estrazione delle proteine di membrana e citoplasma, è stato utilizzato il kit di frazionamento proteico subcellulare per cellule coltivate (Thermo Fisher Scientific). Il contenuto proteico è stato determinato mediante il test Bradford e 30 µg di proteine totali sono state caricate su elettroforesi su gel di acrilammide / bis-acrilammide al 10% in condizioni di tensione costante 135 V per 75 min in tampone TGS (25 mM Tris, 190 mM glicina, 0,1% (w / v) SDS). Le proteine sono state trasferite elettricamente su membrane di nitrocellulosa e quindi bloccate in latte in polvere non grasso al 5% in soluzione salina tamponata con Tris pH 7,2 (TBS) contenente Tween20 allo 0,1% per 1 ora a temperatura ambiente. Le membrane sono state quindi incubate con anticorpo policlonale di coniglio anti-GLUT1 (Thermo Fisher Scientific) o subunità ATPasi trasportatrice sodio / potassio alfa-1 (ATPA1) (Thermo Fisher Scientific) diluito 1: 1000 in 3% p / v latte in polvere non grasso in TBS-Tween e anti-human e rat-actin o GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) (alla diluizione di 1: 3000 nel 3% p / v di latte in polvere non grasso in TBS-Tween) per una notte a 4 C. Successivamente, le membrane sono state lavate e incubate per 1 ora a temperatura ambiente con l'appropriata IgG coniugata con perossidasi di rafano (BioRad, Hercules, CA, USA). La reazione è stata rivelata utilizzando il reagente chemiluminescente (BioRad) e le membrane digitalizzate con CHEMIDOC Quantity One 1D (BioRad).

5.5 Isolamento e preparazione dei vasi sanguigni:

Le arterie uterine arcuate (UAs) e le arterie mesenteriche del terzo ordine (MAs) aventi diametri simili (250-300 μm a 50 mmHg), sono state isolate rispettivamente dal mesometrio e dal mesentere. Le arterie sono state sezionate senza il tessuto adiposo e connettivo circostante e trasferite in una camera per arterie per poi essere analizzate grazie ad un arteriografo per piccoli vasi (Instrumentation and Model Facility, University of Vermont, Burlington, VT, USA). Dal tessuto uterino, inoltre, è stata prelevata l'arteria principale, posta in RNAsi free e conservata a -80°C , al fine poi di subire il processo di omogeneizzazione per gli studi relativi all'espressione di alcuni geni selezionati.

5.6 Studi di reattività:

A livello dell'arteriografo le arterie sono state equilibrate per 30-45 minuti in HEPES-PSS e testate con una concentrazione crescente di KCl (20-80 mM), quindi risciacquate con HEPES-PSS. Le stesse arterie sono state riequilibrate e precostruite con KCl per produrre una riduzione del 40-50% del diametro del lume (Colton I., 2012) prima dell'esposizione all'acetilcolina in un intervallo di concentrazioni tra 10^{-9} e 10^{-5} M. Alla fine di ogni esperimento, i vasi sono stati trattati con una soluzione rilassante contenente il bloccante dei canali Ca^{2+} di tipo L (10 μM) e l'inibitore della fosfodiesterasi, chiamato papaverina (100 μM), per assicurare la massima vasodilatazione, permettendoci di registrare il diametro del lume passivo e, quindi, di normalizzare i dati.

5.7 Isolamento dell'RNA ed espressione genica:

Dopo l'omogeneizzazione dell'arteria uterina principale, prelevata e conservata in RNAsi Free, è stato isolato l'RNA totale mediante la procedura acido fenolo-cloroformio, utilizzando il reagente Trizol e seguendo le istruzioni del produttore (Sigma-Aldrich Corp. Milano, Italia). L'RNA è stato sciolto in acqua e quantificato, il primo filamento cDNA sintetizzato in tampone trascrittasi da 1 μg di RNA totale utilizzando 200 U RevertAid H-Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, Milano, Italia), 200 ng di oligo (dT) 18-mer, 1 mM dNTP (ThermoFisher Scientific, Milano, Italia), 100 U RNasi

inibitore (ThermoFisher Scientific, Milano, Italia) in un volume finale di 20 μ l. La RT-PCR quantitativa è stata eseguita in triplicato in un volume finale di 15 μ L contenente 0,3 μ M di ciascun primer, 1x SybrGreen PCR Master Mix e i campioni sono stati eseguiti e analizzati dal sistema in tempo reale CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Monza, Italia) utilizzando il protocollo termico descritto in precedenza (Grasselli E., 2015). Le coppie di primer e le condizioni di analisi sono riportate nella Tabella S1. La quantità relativa di mRNA target è stata calcolata utilizzando il metodo Cq comparativo e normalizzata per l'espressione della gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). I dati sono riportati come quantità relativa di mRNA (espressione relativa) rispetto ai controlli (Pfaffl M.W. , 2001).

È interessante notare che tutti i primer inclusi in questo studio sono stati testati per determinare l'intervallo di efficienza di amplificazione tra il 90-110%. In breve, l'RNA di controllo (ETOH) è stato sottoposto a diluizioni seriali di cinque volte (non diluito; 1:5; 1:25; 1:125; 1:625; 1:3125) e la RT-PCR quantitativa è stata eseguita in triplicato seguendo il stesso protocollo sopra indicato in questa sezione.

5.8 Farmaci e soluzioni:

La soluzione HEPES-PSS è costituita dai seguenti componenti in mM: 141,8 NaCl; 4,7 KCl; 1,7 MgSO₄; 0,5 EDTA; 2,8 CaCl₂; 10,0 HEPES; 1,2 KH₂PO₄; 5,0 Glucosio. Tutti i prodotti chimici per le soluzioni HEPES-PSS sono stati acquistati da Fisher Scientific (Rodano, Italia). L'acetilcolina, e la papaverina sono state acquistate presso l'azienda Sigma Chemical Co. (Milano, Italia). I primer per NOS3 sono stati acquistati da Bio-rad (UniqueAssayID: qRnoCID0005021).

5.9 Analisi statistica:

La vasocostrizione al KCl è stata calcolata come riduzione del diametro dei vasi dopo l'equilibrio ed espressa in percentuale. La vasodilatazione indotta da acetilcolina è stata espressa come percentuale del diametro completamente rilassato (a 50 mmHg) determinato in soluzione rilassante. Tutti i dati sono presentati come media \pm SEM, dove n è il numero di arterie (uguale anche al numero di animali). Le differenze nelle risposte tra i gruppi sono state determinate dall'analisi della varianza a una o due vie (ANOVA) (non misure ripetute) come indicato nelle legende delle figure, i valori di p <0,05 sono stati considerati

significativi. Il software utilizzato per la quantificazione dell'RNA è Biorad MAESTRO che ha funto da interfaccia con la qPCR.

MATERIALI SUPPLEMENTARI

Tabella S1. Coppie di primer utilizzate per l'analisi RT-Q-PCR.

PRIMER NAME	Primer sequence (5' → 3')	Annealing temperature (°C)	Product lenght (bp)	Accession ID	Amplification efficiency
GAPDH Fwd	GACCCCTTCATTGACCTCAAC	60	136	<u>DQ403053</u>	<u>103%</u>
GAPDH Rev	CGCTCCTGGAAGATGGTGATGGG				
PPAR γ Fwd	CGGAGTCCTCCCAGCTGTTCGCC	60	116	<u>Y12882</u>	<u>97%</u>
PPAR γ Rev	GGCTCATATCTGTCTCCGTCTTC				
ER α Fwd	CATCGATAAGAACCGGAGGA	60	150	<u>AB477039</u>	<u>95%</u>
ER α Rev	TCTGACGCTTGTGCTTCAAC				
ER β Fwd	GAAGCTGAACCACCAATGT	60	150	<u>AB190770</u>	<u>107%</u>
ER β Rev	CAATCATGTGCACCAGTTCC				
VEGF Fwd	TTTCGGGAACTAGACCTCTCACC	60	109	<u>NC 005108.4</u>	<u>101%</u>
VEGF Rev	CTTCATGTCAGGCTTTCTGGATT				
COX Fwd	TGTATGCTACCATCTGGCTTCGG	57	94	<u>AF233596.1</u>	<u>95%</u>
COX Rev	GTTTGGAACAGTCGCTCGTCATC				

PRIMER NAME	Primer sequence (5' → 3')	Annealing temperature (°C)	Product lenght (bp)	Accession ID	Amplificatio n efficiency
GAPDH Fwd	GACCCCTTCATTGACCTCAAC	60	136	<u>DQ403053</u>	<u>103%</u>
GAPDH Rev	CGCTCCTGGAAGATGGTGATGGG				
PPAR γ Fwd	CGGAGTCCTCCCAGCTGTTCGCC	60	116	<u>Y12882</u>	<u>97%</u>
PPAR γ Rev	GGCTCATATCTGTCTCCGTCTTC				
ER α Fwd	CATCGATAAGAACCGGAGGA	60	150	<u>AB477039</u>	<u>95%</u>
ER α Rev	TCTGACGCTTGTGCTTCAAC				
ER β Fwd	GAAGCTGAACCACCAATGT	60	150	<u>AB190770</u>	<u>107%</u>
ER β Rev	CAATCATGTGCACCAGTTCC				
VEGF Fwd	TTTCGGGAACTAGACCTCTCACC	60	109	<u>NC 005108.4</u>	<u>101%</u>
VEGF Rev	CTTCATGTCAGGCTTTCTGGATT				
COX Fwd	TGTATGCTACCATCTGGCTTCGG	57	94	<u>AF233596.1</u>	<u>95%</u>
COX Rev	GTTTGGAACAGTCGCTCGTCATC				

I primer per NOS3 sono stati acquistati da Bio-rad (UniqueAssayID : qRnoCID0005021)

Risultati:

L'effetto correlato al trattamento con le diverse dosi di BPA e con Etoh (il solvente in cui viene preparato il BPA) è stato analizzato su prodotti della gravidanza ovvero feti e placenti, che sono stati prelevati il 20° giorno di gravidanza. In particolare, sono state analizzate le variazioni indotte da questa sostanza sul numero di feti, e sul peso sia dei feti che delle placenti.

L'influenza del BPA su questi parametri è stata riassunta nella Tabella 1. Dove si può vedere che il BPA non ha alcun effetto sul numero di feti nati da animali trattati con le tre diverse dosi di BPA rispetto al controllo. Questa stessa sostanza, però, ha un effetto sul peso fetale, nel senso che questo risulta, dai nostri dati, significativamente aumentato ($p < 0,05$) nel gruppo di trattamento 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ rispetto al controllo. Un altro aspetto importante che emerge dalla tabella 1 è dato dal fatto che, invece, il peso placentare è notevolmente diminuito ($P < 0,01$) sia nel gruppo di trattamento 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ che nel gruppo 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ rispetto al controllo.

Tabella 1. Prodotti della gravidanza

	ETOH (n=7)	BPA 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (n=6)	BPA 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (n=8)	BPA 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (n=7)	P Value
Numero Feti (n)	13.0 \pm 0.79	13.0 \pm 0.89	13.1 \pm 0.81	13.1 \pm 0.94	NS
Peso Fetale (g)	2.15 \pm 0.02	2.34 \pm 0.11*	2.13 \pm 0.03	2.19 \pm 0.02	ETOH Vs BPA2.5 * $p = 0.0158$
Peso Placentare (g)	0.50 \pm 0.01	0.48 \pm 0.01**	0.51 \pm 0.01	0.45 \pm 0.003**	ETOH Vs BPA2.5 ** $p = 0.0066$ ETOH Vs BPA250 ** $p = 0.0050$
Rapporto (Peso Placentare/ Fetale)	0.23 \pm 0.004	0.20 \pm 0.006***	0.24 \pm 0.008	0.21 \pm 0.003***	ETOH Vs BPA2.5 *** $p = 0.0008$ ETOH Vs BPA250 *** $p = 0.0002$

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Per indagare se una maggiore efficienza placentare, con conseguente aumento del peso fetale alla nascita, potesse riflettere una maggiore capacità della placenta di trasportare il glucosio, è stata esaminata l'espressione del trasportatore placentare GLUT1 e la sua localizzazione tissutale. I dati del western blot riportati nella Figura 13 A mostrano una banda proteica di 45-55 kDa, corrispondente a GLUT1 sia nel controllo che nei gruppi BPA. L'analisi densitometrica contro l'actina ha rivelato una sovraregolazione statisticamente significativa dell'espressione di GLUT1 nei ratti alimentati con BPA 2.5 e 250 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{giorno}$ rispetto al gruppo di controllo, trattato con etanolo (ETOH) (Figura 2B).

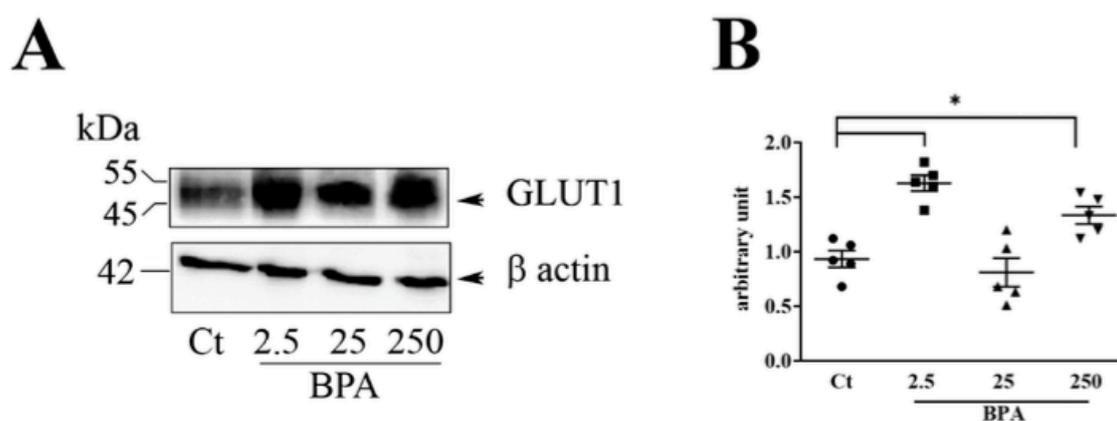


Figura 14. Effetto del BPA sul livello di proteina GLUT1 nelle placente di ratti gravidi. (A) immunoblot e (B) analisi densitometrica, eseguita su placente prelevate da ratti gravidi alimentati con diverse concentrazioni di BPA ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) 2.5, 25, 250 o Control (Ct) 0.1%. (Control: Ct n = 5 per ciascun trattamento). L'analisi statistica è stata realizzata attraverso ANOVA * $p < 0.05$.

Una seconda serie di dati riguarda l'influenza del BPA sulla funzione delle arterie uterine negli animali in gravidanza. L'immagine sottostante mostra un corno dell'utero di ratto in cui sono messe in evidenza le arterie utilizzate al fine di condurre gli esperimenti.

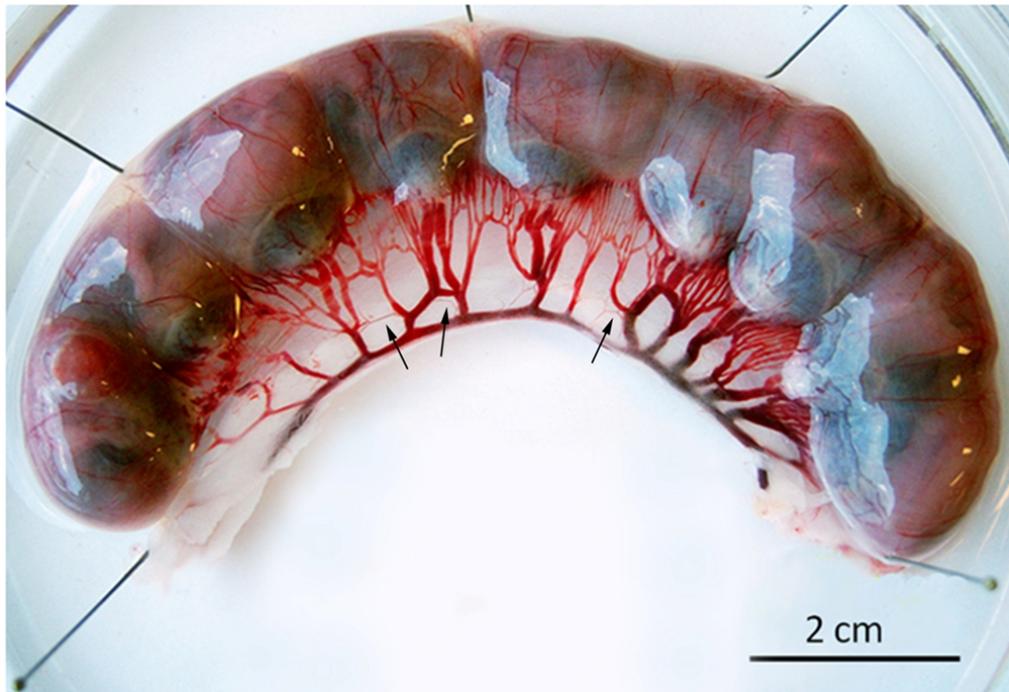


Figura 16. Corno uterino in gravidanza. Questa Immagine mostra uno dei due corni uterini di ratto gravido. Presenta diverse unità fetoplacentari e si può ben osservare anche il sistema vascolare materno. Le frecce indicano le arterie uterine (UAs) arcuate, utilizzate nel corso degli esperimenti.

Per valutare l'effetto del BPA sulla funzione delle arterie arcuate uterine isolate da femmine di ratto trattate con Etoh rispetto a quelle trattate con BPA alle tre diverse concentrazioni, sono state testate dosi crescenti di KCl HEPES sulle stesse arterie uterine. verificare il coinvolgimento del BPA nell'alterazione della vasocostrizione provocata dalle cellule muscolari. Ciò che emerge, ed è evidente, nella figura 17 è che il BPA non ha alcun effetto sulle cellule muscolari.

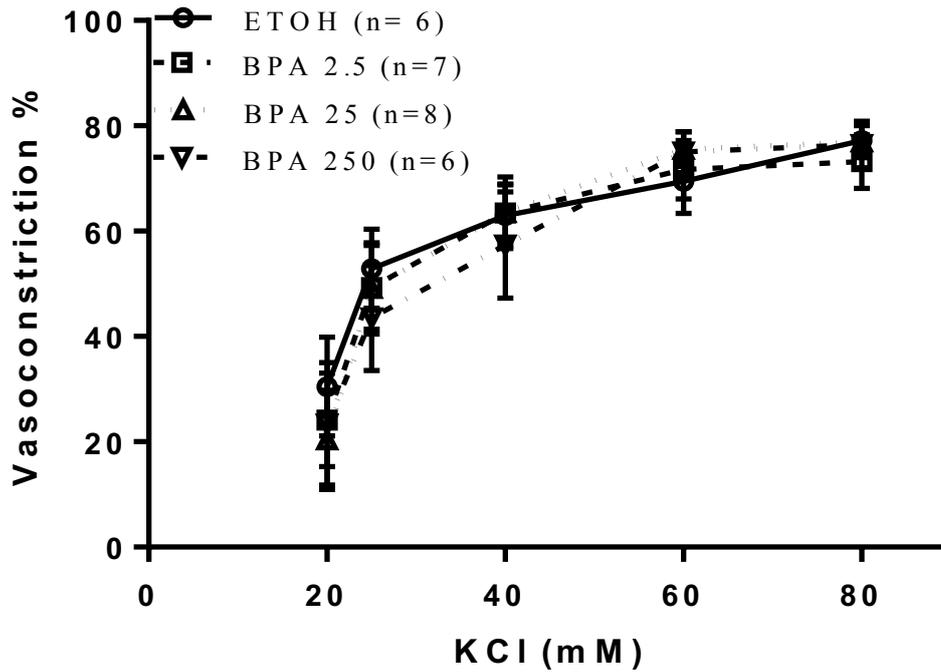


Figura 17. Effetti del Bisfenolo A (BPA) sulla contrazione delle arterie uterine. Il grafico mostra la contrazione indotta dal cloruro di potassio (KCl) nelle arterie uterine isolate da ratti gravidi trattati con veicolo del BPA, ovvero etanolo (ETOH) o con Bisfenolo A (BPA) a diverse concentrazioni espresse in $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$: 2.5; 25 e 250. I dati sono riportati come $\text{Media} \pm \text{SEM}$, n = numero di arterie. L'analisi dei dati è stata determinata mediante ANOVA a due vie.

Un altro studio funzionale ha coinvolto il test delle arterie uterine arcuate, sia quelle trattate con Etoh che quelle trattate con diverse dosi di BPA, con acetilcolina (Ach), in questo caso per determinare l'effetto del BPA sulle cellule endoteliali. vascolare. I dati riportati nel grafico sottostante mostrano una riduzione dose-dipendente della vasodilatazione indotta da BPA a tutte e tre le concentrazioni di trattamento, ma significativa solo alle dosi 2.5 e 250 rispetto al controllo.

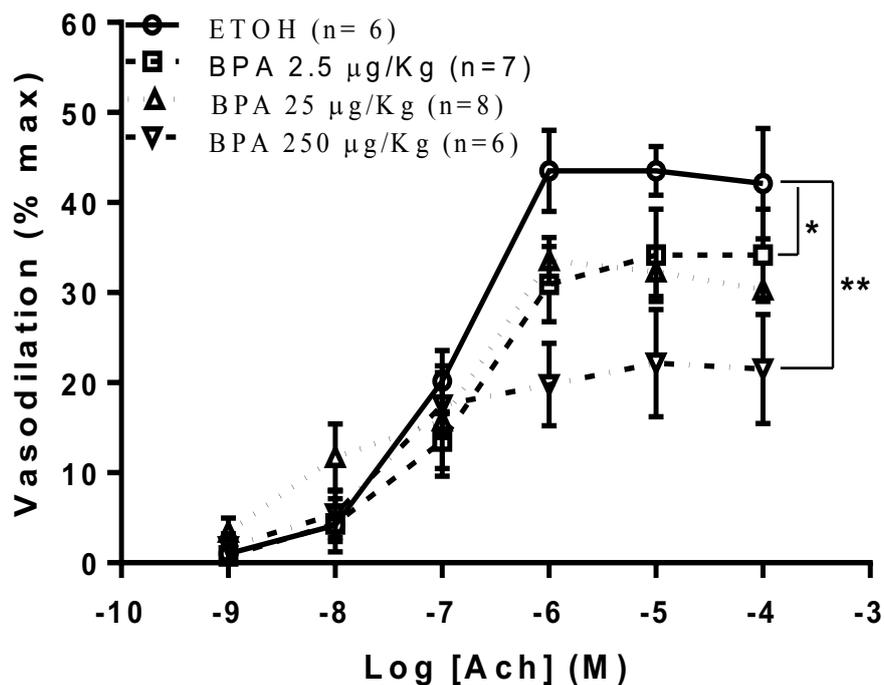


Figure 18. Effetto del bisfenolo A (BPA) sulla dilatazione delle arterie uterine. Questo grafico mostra la vasodilatazione dell'acetilcolina nelle arterie uterine isolate da ratti gravidi trattati con il veicolo BPA ovvero l' etanolo (ETOH), o con bisfenolo A (BPA) a diverse concentrazioni espresse in $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$: 2.5; 25 e 250. I dati sono riportati come Media \pm SEM e n = numero di arterie. Le differenze nelle risposte tra i gruppi sono state determinate mediante ANOVA a due vie ($p < 0.05$, $p < 0.001$).

A sostegno di questo risultato, la figura 19 mostra che nelle arterie uterine l'espressione dell'ossido nitrico sintasi (NOS3), enzima di fondamentale importanza coinvolto nel rimodellamento vascolare e, quindi, induttore della vasodilatazione delle arterie uterine, è significativamente ridotta nei ratti trattati con BPA rispetto ai controlli.

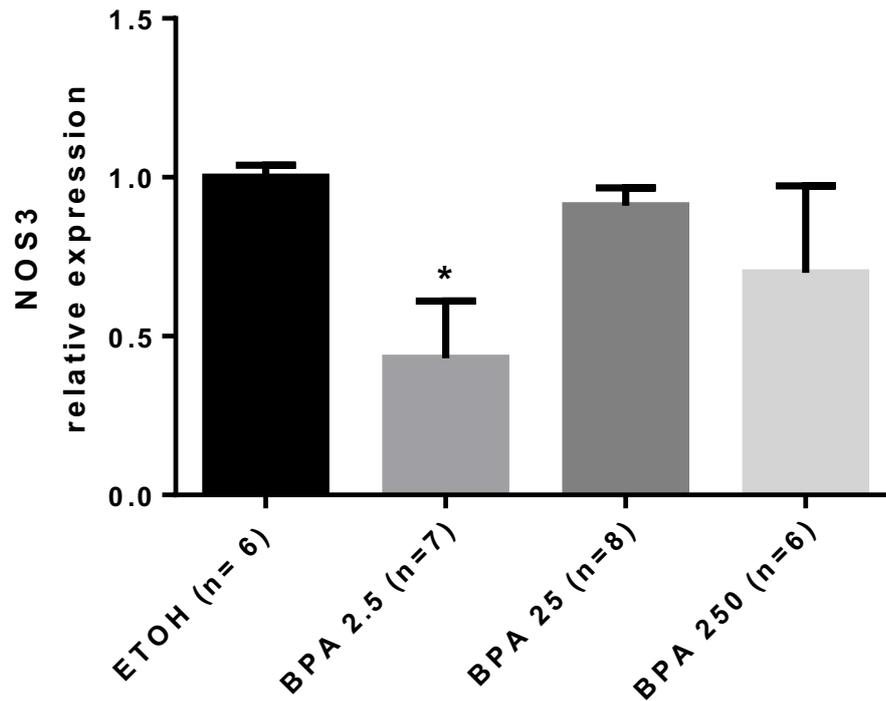


Figura 19. Effetto del Bisfenolo A (BPA) sull'espressione dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (NOS3). Il grafico mostra l'espressione di NOS3 nelle arterie uterine (UAs) isolate da ratti gravidi trattati con il veicolo BPA ovvero l' etanolo (ETOH), o con bisfenolo A (BPA) a diverse concentrazioni espresse in $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$: 2.5; 25 e 250. I dati sono riportati come Media \pm SEM e n = numero di arterie. Le differenze nelle risposte tra i gruppi sono state determinate dall'ANOVA a una via ($p < 0.05$).

Un altro gruppo di dati, invece, riguarda studi condotti per valutare come varia la struttura vascolare a seguito del trattamento con le tre diverse dosi di BPA 2.5; 25 e 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$ rispetto ai controlli, trattati con Etoh. La figura 20 si riferisce al diametro passivo delle arterie uterine arcuate. Come si può vedere dall'immagine, il diametro passivo è significativamente ridotto, sia nel gruppo 2.5 che nel gruppo di trattamento 250, rispetto al controllo ($p < 0.01$). La figura 21, invece, mostra come varia un altro parametro strutturale vascolare importante ovvero la distensibilità, come si evince dalla figura, la distensibilità si riduce in modo significativo nei gruppi di trattamento con BPA 2.5 e 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$ ($*p < 0.05$).

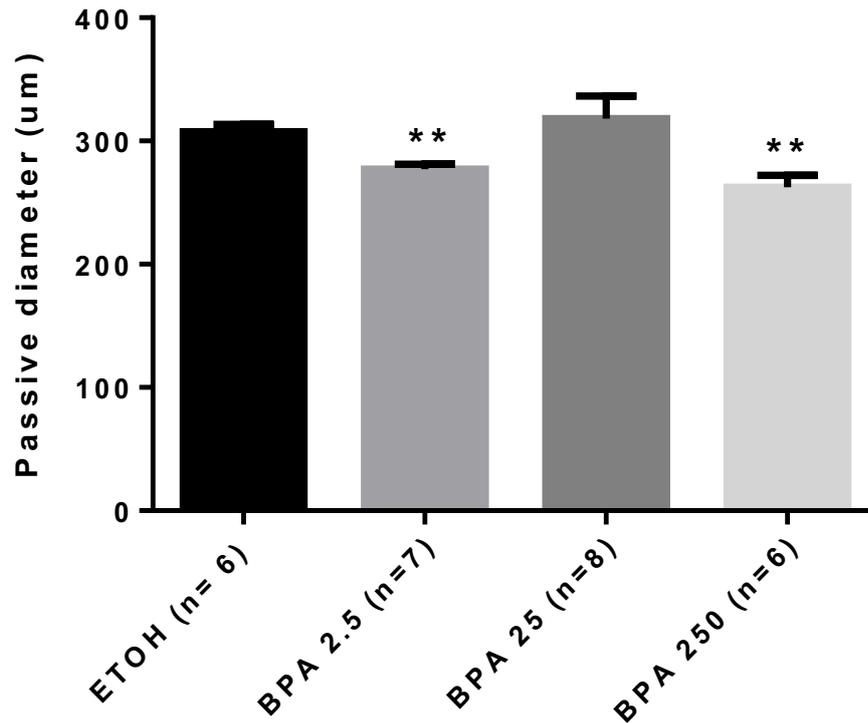


Figura 20. Effetto del bisfenolo A (BPA) sul diametro passivo delle arterie uterine. Il grafico mostra le variazioni del diametro passivo a 50 mmHg di pressione intraluminale in UAs isolate da ratti gravidi trattati con il veicolo, ovvero etanolo (ETOH), o con BPA alle diverse concentrazioni in $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$: 2.5; 25 e 250. I dati sono riportati come Media \pm SEM e n = numero di arterie. Le differenze nelle risposte tra i diversi gruppi sono state determinate dall'ANOVA ad una via ($p < 0.01$).

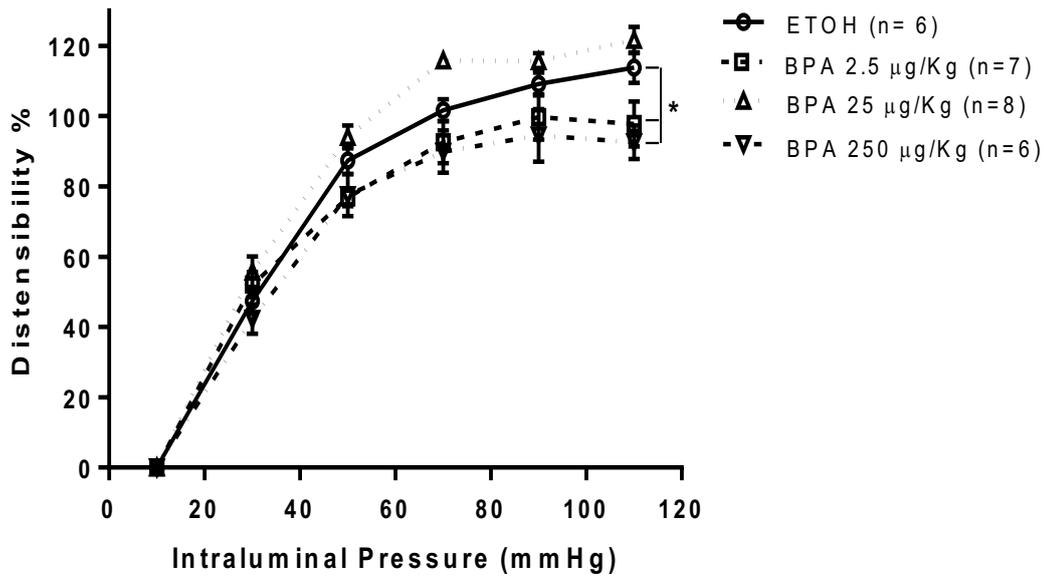


Figura 21. Effetto del bisfenolo A (BPA) sulla distensibilità delle arterie uterine.

Il seguente grafico mostra la distensibilità in risposta a variazioni di pressione intraluminale (10,30,50,70,90,110 mmHg) delle arterie uterine isolate da femmine di ratto in gravidanza, trattate con etanolo sciolto in acqua (ETOH, che rappresenta il veicolo del BPA) o con Bisfenolo A (BPA) anch'esso somministrato nell'acqua a differenti concentrazioni (2.5, 25, 250 µg/Kg/Die di peso corporeo). Dal grafico si osserva un lieve aumento di distensibilità nel gruppo di trattamento 25 µg/Kg/Die rispetto al controllo che non è però significativo, mentre nei gruppi 2.5 µg/Kg/Die e 250 µg/Kg/Die la distensibilità, rispetto al controllo, si riduce in modo significativo * $p < 0.05$. I dati sono riportati come MEDIA \pm SEM e n= numero degli esperimenti.

Per determinare se il BPA influisce sulla circolazione sistemica, abbiamo anche considerato i suoi effetti sulle arterie mesenteriche di ratte gravide (MAs). Come mostrato nella Figura 22, la vasocostrizione di KCl, la vasodilatazione indotta da acetilcolina (Ach) e i diametri del lume passivo non sono stati influenzati negli animali esposti a BPA rispetto al controllo.

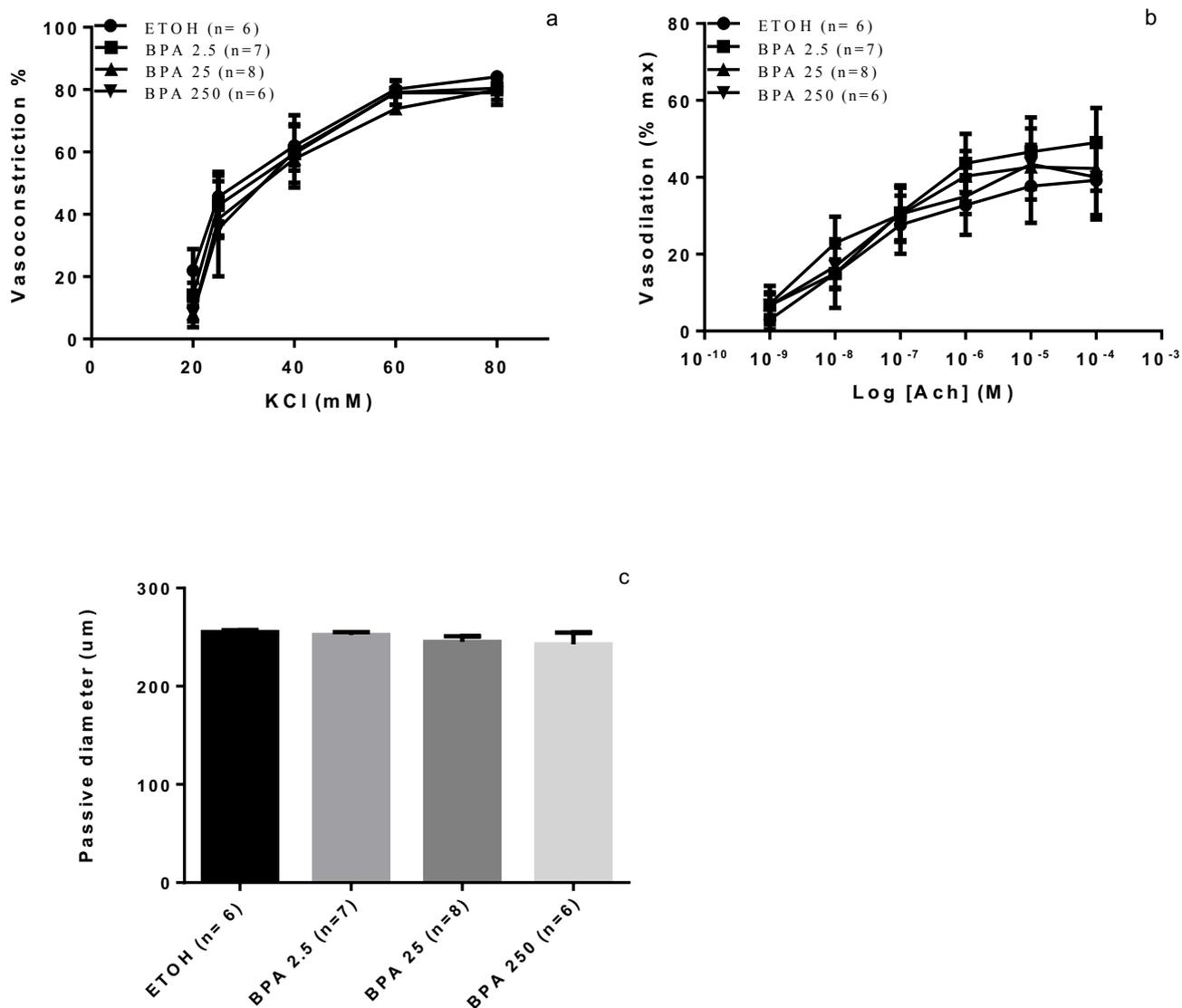


Figura 22. Effetto del bisfenolo A (BPA) sulle arterie mesenteriche. I grafici mostrano la contrazione indotta da KCl (a), la vasodilatazione indotta dall'acetilcolina (b) e il diametro passivo a 50 mmHg di pressione intraluminale nelle arterie mesenteriche isolate da ratti gravidi trattati con veicolo BPA ,ovvero l'etanolo (ETOH), o con BPA a diverse concentrazioni espresse in $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$: 2.5; 25 e 250. I dati sono riportati come Media \pm SEM e n = numero di arterie. Le differenze nelle risposte tra i gruppi sono state determinate dall'ANOVA a una via.

Inoltre, per approfondire il possibile meccanismo d'azione del BPA è stata valutata l'espressione di determinati geni selezionati, come ad esempio i geni che codificano per i recettori degli estrogeni α e β ($\text{ER}\alpha$ e β), il gene che codifica per il recettore attivato dal proliferatore del perossisoma- γ ($\text{PPAR-}\gamma$), il gene che codifica per la citochina angiogenica

Fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e, in fine, il gene che codifica per l'enzima infiammatorio cicloossigenasi-2 (COX-2). Tutti oltre a rappresentare potenziali bersagli per il BPA sono coinvolti nelle funzioni endoteliali. I risultati, riportati nella Figura 23, mostrano che il BPA ha indotto una significativa down regolazione dei livelli di mRNA per ER α e PPAR- γ e una sovraregolazione dei livelli di mRNA per ER β , mentre mRNA di VEGF e COX-2 non sono stati influenzati dal trattamento con BPA.

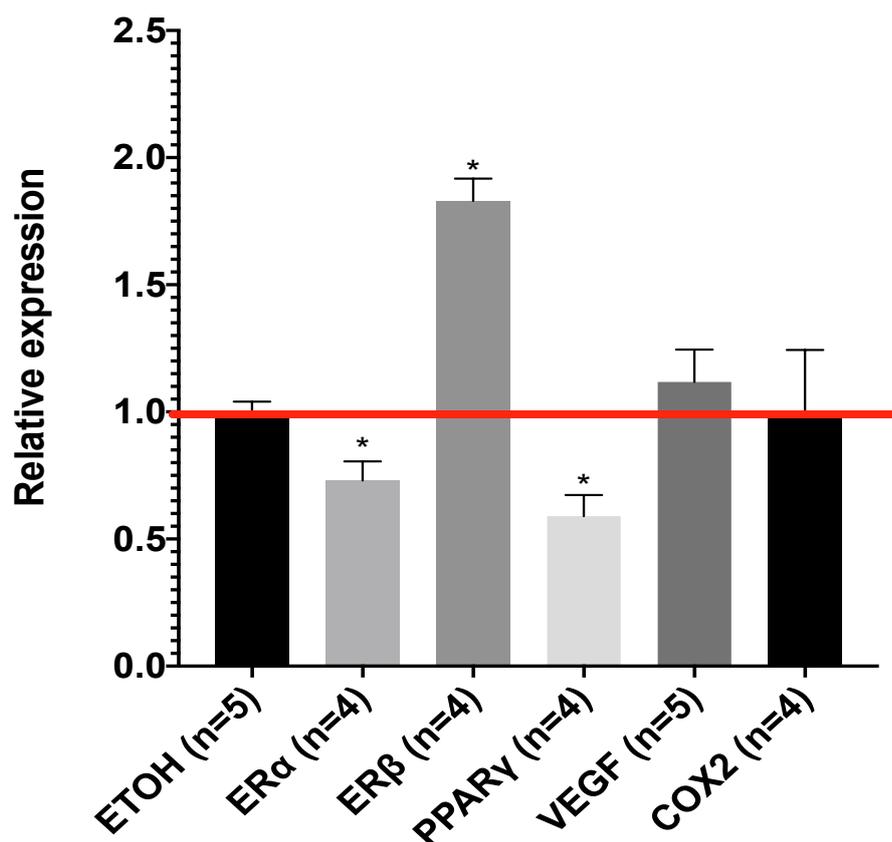


Figura 23. Effetto del Bisfenolo A (BPA) sull'espressione di geni selezionati. Il grafico mostra l'espressione del recettore alfa degli estrogeni (ER α); del recettore beta degli estrogeni (ER β); del Recettore gamma attivato dal proliferatore di perossisomi (PPAR γ); del Fattore di Crescita Endoteliale Vascolare (VEGF) e delle Cicloossigenasi (COX2) nelle arterie uterine isolate da ratti controllo, trattati con etanolo, ETOH, e da ratti trattati con BPA 2.5 μ g/kg/giorno. I dati sono riportati come Media \pm SEM e n = numero di arterie. L'analisi dei dati è stata determinata mediante ANOVA a una via.

Discussioni:

I risultati ottenuti da questo lavoro hanno mostrato che nel sistema vascolare uterino di ratti gravidi il BPA induce diverse avversità come ad esempio la disfunzione endoteliale, la riduzione del diametro del lume vascolare e della distensibilità vascolare oltre che la compromissione del normale sviluppo feto-placentare. Inoltre quello che si evince dai dati ottenuti, è che il BPA non avrebbe alcun effetto sulla vascolatura mesenterica (sistemica) indicando che le arterie uterine (riproduttive) rappresentano un bersaglio specifico per questa sostanza.

Un aspetto molto importante che emerge dai dati ottenuti è rappresentato dal fatto che il BPA agisce in modo concentrazione-dipendente e mostra i suoi effetti più significativi alle dosi massima e minima ovvero 250 e 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$. Questo suggerisce una risposta a forma di U invertita che, sembrerebbe essere proprio tipica di molti interferenti endocrini (Vandenberg LN., 2012).

I nostri dati relativi ai prodotti della gravidanza hanno dimostrato che il numero dei feti negli animali trattati con BPA, rispetto al controllo, non cambia in maniera significativa. Quello che, invece, emerge dai nostri risultati è che è alterato, in particolare alle dosi 2,5 e 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$ il rapporto tra il peso placentare e il peso fetale, che è espressione dell'efficienza della placenta. Risulta, inoltre, dai dati da noi ottenuti che alle stesse concentrazioni, ovvero 2,5 e 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$ sia significativamente ridotto rispetto al controllo anche il peso delle placenti. Questo dato suggerisce che il BPA altera il normale sviluppo dell'unità feto placentare e compromette l'esito della gravidanza. Risultati simili sono stati riportati in altri studi condotti su topi in gravidanza ma anche studi condotti su cellule placentari in coltura in cui si è appunto visto che il trattamento con BPA ha indotto alterazioni degenerative della placenta (Tachibana T., 2007; Benachour N., 2009). La disfunzione placentare può, quindi, tradursi in vivo in esiti avversi della gravidanza come preeclampsia e IUGR o, addirittura, interruzione anticipata della gravidanza con gravi conseguenze sia per la madre sia per il feto (Benachour N., 2009).

Dai nostri dati emerge, inoltre che, sebbene il BPA abbia ridotto il peso delle placenti in maniera significativa alle dosi 2,5 e 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$, il peso fetale risulti aumentato sia alla dose 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$ sia alla dose 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$, ma significativamente alla dose 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$. Questo effetto, può essere spiegato da un altro risultato molto interessante che è emerso dalla nostra sperimentazione ovvero l'aumento del trasportatore del glucosio di tipo 1 GLUT-1 a livello della placenta (Benincasa L., 2020), una vera e propria azione compensatoria da parte della placenta per far sì che, appunto, il feto non entri in sofferenza

e non riduca le proprie dimensioni. Diversi altri rapporti presenti in letteratura hanno dimostrato che una placenta troppo piccola o comunque non completamente sviluppata rispetto ad una placenta normale è perditrice di una serie di complicanze cliniche come l'ipertensione materna; il diabete gestazionale; e la sofferenza fetale in generale (Naeye R.L., 1987; Molteni R.A., 1978; Robertson C.M., 2002; Fox G.E., 1991; Eriksson J., 2000). I dati presenti in letteratura su questo argomento sono in contrasto tra loro, uno studio condotto da Anna M. Nuzzo et al., ad esempio, afferma che la placenta risponde a condizioni avverse come l'ipossia adattando la sua capacità di trasferimento del substrato per mantenere la crescita e lo sviluppo fetale. I dati ottenuti da questo studio mostrano che vi è un aumento della superficie placentare e del sangue capillare fetale che potrebbe essere un adattamento compensatorio per aumentare o mantenere la capacità di trasporto della placenta, proteggendo la crescita fetale (Nuzzo A.M., 2018). Analizzando i dati da noi raccolti non sono state valutate possibili associazioni tra una placenta più piccola e la malattia materna nei ratti esposti al BPA rispetto al controllo, questa possibilità richiede ulteriori indagini.

La normale crescita placentare e il corretto sviluppo fetale, come detto precedentemente, dipendono principalmente dal corretto flusso sanguigno utero-placentare che aumenta progressivamente e significativamente con il progredire della gravidanza (Palmer S.K., 1992) grazie alla crescita circonferenziale del sistema vascolare uterino (Osol G., 2019). Pertanto l'obiettivo principale che si è posto questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto del BPA sul sistema vascolare uterino per comprendere se possa esserci un effetto a monte e, dunque, sul sistema vascolare, causa poi di tutte le gravi conseguenze sui prodotti e sull'esito della gravidanza. I dati ottenuti dagli esperimenti relativi agli studi di reattività hanno mostrato che nelle arterie uterine arcuate il BPA alle dosi 2,5 e 250 µg/kg/giorno riduce la vasodilatazione indotta dall'acetilcolina (Ach), fattore noto per essere mediato dall'NO e infatti, come si può osservare dalla figura 19 l'espressione di NOS3, enzima responsabile della produzione di NO, è significativamente ridotta proprio alla dose 2,5 µg/kg/. Il fatto che ci sia una riduzione dell'espressione di NOS3, e conseguentemente una riduzione dell'espressione di NO e una riduzione della vasodilatazione in risposta a dosi crescenti di nei gruppi di trattamento 2,5 e 250 µg/kg/giorno BPA, suggerisce che il BPA induca una disfunzione endoteliale a livello delle arterie uterine arcuate. Inoltre una riduzione dell'espressione di NOS3 e, quindi, di NO è anche responsabile della riduzione del diametro passivo delle AU, tant'è vero che dai nostri dati emerge che questo alle dosi 2,5 e 250 µg/kg/giorno è significativamente ridotto. Il tono vascolare è criticamente influenzato dall'ossido nitrico (NO) derivato dall'attività della NOS3 che contribuisce alla quiescenza uterina e che controlla il flusso sanguigno utero-placentare (Krause B.J., 2013),

dunque, una ridotta biodisponibilità di NO è coinvolta nelle alterazioni sia funzionali sia strutturali della vascolatura uterina. I dati qui presentati concordano con alcuni studi condotti precedentemente sia su arterie carotidee di topi, sia su cellule di macrofagi in colture cellulari, in entrambi viene dimostrata una compromissione della produzione di NO proprio da parte del BPA (Young Kim, J., 2003). Il ruolo dell'NO nella regolazione del tono vascolare è come un gas solubile che si diffonde dall'endotelio alla muscolatura liscia vascolare, promuovendo la produzione di cGMP che alla fine determina il rilassamento della muscolatura liscia. Eventi di fosforilazione in più posizioni su eNOS, insieme a livelli elevati di $[Ca^{2+}]$ determinano in gran parte l'uscita endoteliale di NO. Il ruolo dell'NO nell'adattamento alla gravidanza è stato ampiamente rivisto (Boeldt DS., 2011). Da notare che, mentre è vero che i livelli di espressione di eNOS sono aumentati durante la gravidanza nell'endotelio dell'arteria uterina, i cambiamenti nella segnalazione di Ca^{2+} sono l'innescò necessario per la produzione di NO. In presenza di BPA i nostri risultati mostrano che forse questa sostanza ha un'influenza sulla produzione di NO, inducendo di conseguenza un'alterazione della vasodilatazione delle arteriole. Esistono numerosi articoli scientifici in letteratura che mostrano come non solo il BPA ma anche altri interferenti endocrini come il BPS (analogo del BPA) o gli ftalati (ad esempio DHEP e MHEP) inducano una serie di alterazioni dello sviluppo fetale e placentare (Grindler NM, 2018; Strakovsky RS, 2018; Philippat C., 2019; Martinez-Razo LD , 2021) ma non sono chiari i meccanismi di azione con cui tali interferenti endocrini agiscano. Un altro importante dato da noi ottenuto è relativo alla riduzione da parte del BPA alle dosi 2,5 e 250 della distensibilità vascolare, che è un parametro regolato dai fattori della matrice extracellulare. Questo dato non è stato da noi approfondito, ma dai dati presenti in letteratura quello che si può pensare è che il BPA possa avere un effetto a livello delle MMPs, importanti proteasi che mantengono l'equilibrio di alcuni fattori fondamentali quali ad esempio collagene ed elastina. Uno squilibrio di questi fattori, infatti, potrebbe determinare un aumento della rigidità vascolare e quindi una riduzione di flusso utero-placentare. Questi dati insieme, ovvero: la disfunzione endoteliale, la riduzione del diametro passivo e della distensibilità vascolare a livello delle arterie uterine in seguito al trattamento con BPA ci porta a pensare che possano essere la causa di un ridotto peso e di una ridotta efficienza della placenta.

Per avere una prima visione del possibile meccanismo d'azione con cui il BPA può esplicare i propri effetti altro obiettivo dello studio è stato quello di valutare l'espressione di alcuni fattori coinvolti nel processo di vasodilatazione. Proprio per questo motivo è stata valutata l'azione del BPA sull'espressione degli estrogeni in quanto sebbene i meccanismi alla base della vasodilatazione uterina associata alla gravidanza non siano ancora completamente

compresi, si sa da dati presenti in letteratura che gli estrogeni rappresentano i principali fattori che intervengono nel processo di vasodilatazione e rimodellamento vascolare insieme, conseguentemente ai recettori estrogenici ER-A ed ER-B (Mandalà M., 2021). Essi, nello specifico, risultano essere elevati e stimolano la vasodilatazione grazie a specifici recettori estrogenici ERs presenti, nelle arterie uterine proprio grazie alla sovraregolazione di NOS3 (Bai J., 2020; Veille J.C., 1996; Chen, D.B., 2004; Mandalà M., 2020;) e nei citotrofoblasti. Inoltre alcuni fattori quali, ad esempio, PPAR- γ (Polikandriotis J.A., 2005; Duan S.Z., 2008; Yu J., 2010), piuttosto che VEGF (Grummer M.A., 2009) svolgono un ruolo molto importante di regolazione dell'espressione di NOS3 proprio con l'obiettivo di migliorare la funzione vascolare e, quindi, determinare gli effetti vasodilatatori. Nello specifico PPAR- γ recettore γ attivato dai proliferatori dei perossisomi nel momento in cui è over-espresso o in seguito a trattamento con acido retinoico che rappresenta il suo ligando, determina un'over produzione di NO endoteliale basale. VEGF, invece è stato dimostrato che nel corso della gravidanza regola, in parte, l'angiogenesi endoteliale e la vasodilatazione e, nello specifico, i recettori di VEGF determinano un aumento dell'espressione di NOS3 e, conseguentemente di NO.

Esistono alcuni dati i quali evidenziano proprio un cross talk tra ER- α PPAR- γ e VEGF (Keller H., 1995; Soares R., 2002). Il BPA essendo un perturbatore endocrino può esercitare la propria azione attraverso una varietà di vie di signaling a seconda del tipo di cellule interessate, del tipo di animale, delle condizioni di esposizione (Masaharu M., 2018) Nel modello sperimentale da noi utilizzato questa molecola a livello dell'arteria uterina principale sembra interferisca proprio con l'espressione di ER- α PPAR- γ ma non con l'espressione dell' mRNA di VEGF e di COX2. Questa riduzione dell'espressione di mRNA di ER- α PPAR- γ potrebbe rappresentare la via di signaling attraverso cui il BPA induce, probabilmente, la disfunzione endoteliale e le diverse complicazioni relative alla gravidanza, anche perché alcuni studi presenti in letteratura hanno dimostrato come la disregolazione di ER- α PPAR- γ , durante la gravidanza provochi IUGR e PE (Gokina N.I., 2013; Yin G., 2013;).

Conclusioni:

Il presente lavoro suggerisce che l'esposizione al BPA aumenta il rischio di disfunzione endoteliale nelle arterie uterine attraverso una varietà di potenziali meccanismi e svolge un ruolo fondamentale nella progressione e nell'esito della gravidanza. Al contrario il BPA non

ha alcuna influenza sulle arterie mesenteriche suggerendo che agisce in modo vascolare-dipendente, questo può essere dato dal diverso adattamento del letto vascolare alla gravidanza (Morris E.A., 2002; Buhimschi I.A., 2001).

In conclusione i nostri dati hanno mostrato per la prima volta che l'esposizione materna al BPA mira in modo specifico al flusso sanguigno utero-placentare compromettendo lo sviluppo fetto-placentare. Meccanismi molecolari specifici come una riduzione dell'espressione di NOS3; ER- α PPAR- γ possono essere alla base degli esiti avversi che il BPA può avere in gravidanza.

Oltre a rivelare un nuovo possibile meccanismo d'azione del BPA, questo studio è un'ulteriore prova degli effetti dannosi di questa sostanza chimica per lo sviluppo fetale e, in generale, per la gravidanza. Considerata la vasta conoscenza circa la distribuzione del BPA nell'ambiente e circa la contaminazione degli individui con questa ambigua e pericolosa sostanza chimica appare urgente sollecitare l'interesse del pubblico a limitare l'esposizione al BPA nella popolazione in generale ma soprattutto nelle donne in stato fertile e in stato di gravidanza proprio per garantire la salute delle generazioni future.

Referenze:

- Adamsons K., Myers RE. Circulation in the intervillous space; obstetrical considerations in fetal deprivation. In: Gruenwald P, editor. The placenta and its maternal supply line. Effects of insufficiency on the fetus. Lancaster: Medical and Technical Publishing Co. Ltd. 1975. p. 158–77.
- Albrecht ED., Bonagura TW., Burleigh DW., Enders AC., Aberdeen GW., Pepe GJ. Suppression of extravillous trophoblast invasion of uterine spiral arteries by estrogen during early baboon pregnancy. *Placenta* 2006, 27:483–90.
- Annibale DJ., Rosenfeld CR., Stull JT., Kamm KE. Protein content and myosin light chain phosphorylation in uterine arteries during pregnancy. *Am J Physiol Cell Physiol* 1990, 259, C484– C489.
- Aplin JD. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 1991, 99, 681-692.
- Assali NS., Douglass RA. Jr, Baird WW., Nicholson DB., Suyemoto R. Measurement of uterine blood flow and uterine metabolism. IV. Results in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1953, 66, 248– 253.

- Assali NS., Rauramo L., Peltonen T. Measurement of uterine blood flow and uterine metabolism VIII. Uterine and fetal blood flow and oxygen consumption in early human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1960, 79, 86–98.
- Assali NS., Rauramo L., Peltonen T. Measurement of uterine blood flow and uterine metabolism VIII. Uterine and fetal blood flow and oxygen consumption in early human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1960, 79, 86–98.
- Atkinson DE., Boyd RDH., Sibley CP. Placental transport. In *The Physiology of Reproduction*, (ed. NEILL, J. D.). Raven. 2016, pp. 2787-2846.
- Babischkin JS., Bonagura TW., Udoff LC., Vergara CO., Johnson HW., Atlas RO et al. Estrogen stimulates the human endometrium to express a factor(s) that promotes vascular smooth muscle cell migration as an early step in microvessel remodeling. *Endocrine* 2009, 35, 81–8.
- Bai J, Qi Q-R., Li Y., Day R., Makhoul J., Magness RR.; Chen D-B. Estrogen Receptors and Estrogen-Induced Uterine Vasodilation in Pregnancy. *Int J Mol Sci.* 2020, 21,4349.
- Bai X., Greenwood SL., Glazier JD., Baker PN., Sibley CP., Taggart MJ., Fyfe GK. Localization of TASK and TREK, two- pore domain K⁺ channels, in human cytotrophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig* 2005, 12, 77-83.
- Bai X., Lacey HA., Greenwood SL., Baker PN., Turner MA., Sibley CP., Fyfe GK. TASK channel expression in human placenta and cytotrophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig* 2006, 13, 30-39.
- Balakrishnan B., Henare K., Thorstensen EB., Ponnampalam AP., Mitchell MD. Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am J Obstet Gynecol.* 2010, 202, 393.e1-7.
- Balkovetz DF., Leibach FH., Mahesh VB., Devoe LD., Cragoe EJ., JR., Ganapathy V. Na⁺-H⁺ exchanger of human placental brush- border membrane: identification and characterization. *American Journal of Physiology* 1986, 251, C852-C860.
- Barker D.J. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin. Obstet. Gynecol.* 2006, 49, 270–283.
- Baschat AA., Hecher K. Fetal growth restriction due to placental disease. *Semin. Perinatol.* 2004, 28, 67–80.
- Belkacemi L., Bedard I., Simoneau L., Lafond J. Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review. *Cell Calcium* 2005, 37, 1-8.
- Ben Driss A., Benessiano J., Poitevin P., Levy BI., Michel JB. Arterial expansive remodeling induced by high flow rates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1997, 272, H851–H858.

- Benachour N., Aris A. Toxic effects of low doses of Bisphenol- A on human placental cells. *Toxicol and appl Pharmacol.* 2009, 241, 322-328.
- Benincasa L., Mandalà M., Paulesu L., Barberio L., Ietta F. Prenatal Nutrition Containing Bisphenol A affects Placenta Glucose Transfer: Evidence in Rats and Human Trophoblast. *Nutrients* 2020, 12, 1375.
- Bernstein IM., Meyer MC., Osol G., Ward K. Intolerance to volume expansion: a theorized mechanism for the development of preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1998, 92, 306–8.
- Bewley S., Cooper D., Campbell S. Doppler investigation of utero- placental blood flow resistance in the second trimester: a screening study for pre-eclampsia and intrauterine growthretardation. *Br J Obstet Gynaecol* 1991, 98, 871–9.
- Biadasiewicz K., Sonderegger S., Haslinger P., Haider S., Saleh L., Fiala C., Pollheimer J., Knofler M. Transcription factor AP-2alpha promotes EGF-dependent invasion of human trophoblast. *Endocrinology* 2011, 152, 1458–1469.
- Birdsey TJ., Boyd RD., Sibley CP., Greenwood SL. Microvillous membrane potential (Em) in villi from first trimester human placenta: comparison to Em at term. *American Journal of Physiology* 1997, 273, R1519- R1528.
- Bissonnette JM., Black JA., Wickham WK., Acott KM. Glucose uptake into plasma membrane vesicles from the maternal surface of human placenta. *J Membr Biol.*1981, 58, 75-80.
- Bjellin L., Sjoquist PO., Carter AM. Uterine, maternal placental and ovarian blood flow throughout pregnancy in the guinea pig. *Zeitschrift fur Geburtshilfe und Perinatologie* 1975, 179, 179–187.
- Boeldt DS., Yi FX. , Bird IM. eNOS activation and NO function: pregnancy adaptive programming of capacitative entry responses alters nitric oxide (NO) output in vascular endothelium--new insights into eNOS regulation through adaptive cell signaling. *J Endocrinol.* 2011, 210, 243-58.
- Borke JL., Caride A., Verma AK., Kelley LK., Smith CH., Penniston JT., Kumar R. Calcium pump epitopes in placental trophoblast basal plasma membranes. *American Journal of Physiology* 1989, 257: c341-c346.
- Brosens IA. The utero-placental vessel satterm the distribution and extent of physiological changes. *Trophoblast Res.* 1988, 3, 61–7.
- Brodsky D., Christou H. Current concepts in intrauterine growth restriction. *J. Intensive Care Med.* 2004, 19, 307–319.

- Brosens JJ., Pijnenborg R., Brosens IA. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol.* 2002,187, 1416–1423.
- Brownbill P., Edwards D., Jones C., Mahendran D., Owen D., Sibley C., Johnson R., Swanson P., Nelson DM. Mechanisms of alphafetoprotein transfer in the perfused human placental cotyledon from uncomplicated pregnancy. *J. Clin. Invest.* 1995, 96, 2220 – 2226.
- Brownbill P., Edwards D., Jones C., Mahendran D., Owen D., Sibley C., Johnson R., Swanson, P., Nelson DM. Mechanisms of alphafetoprotein transfer in the perfused human placental cotyledon from uncomplicated pregnancy. *J Clin Invest* 1995, 96, 2220-2226.
- Brownbill P., Mahendran D., Owen D., Swanson P., Thornburgm KL., Nelson DM., Sibley CP. Denudations as paracellular routes for alphafetoprotein and creatinine across the human syncytiotrophoblast. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000, 278, R677-R683.
- Bruce NW. The distribution of blood flow to the reproductive organs of rats near term. *J Reprod Fertil* 1976, 46, 359–362
- Burstyn I., Martin WJ., Beesoon S.; Bamforth F., Li Q., Yasui Y., Cherry MN. Maternal Exposure to Bisphenol-A and Fetal Growth Restriction: A Case-Referent Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2013, 10, 7001-7014.
- Buhimschi IA., Hall G., Thompson LP., Weiner CP. Pregnancy and estradiol decrease GTPase activity in the guinea pig uterine artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001, 281, H2168-75.
- Burstyn I., Martin JW., Beeson S., Bamforth F, Li Q., Yasui Y., Cherry NM. Maternal exposure to bisphenol-A and fetal growth restriction: a case- referent study. *Int J Environ Res Public Health.* 2013, 10, 700-14.
- Burton GJ. The fine structure of the human placenta as revealed by scanning electron microscopy. *Scan. Microsc.* 1987, 1, 1811 – 1828.
- Burton GJ., Watson AL. The structure of the human placenta: implications for initiating and defending against viral infections. *Rev. Med. Virol.* 1997, 7, 219 – 228.
- Buus CL., Pourageaud F., Fazzi GE., Janssen G., Mulvany MJ., De Mey JG. Smooth muscle cell changes during flow-related remodeling of rat mesenteric resistance arteries. *Circ Res.* 2001, 89, 180–186.

- Cantonwine DE., Ferguson KK., Mukherjee B., McElrat TF., Meeker JD. Urinary Bisphenol A Levels during Pregnancy and Risk of Preterm Birth. *Environ Health Perspect* 2015, 123, 895-901.
- Carter AM. Placental oxygen consumption. Part I: in vivo studies-a review. *Placenta* 21(Suppl. A), 2000, S31 – S37.
- Caton D., Kalra PS. Endogenous hormones and regulation of uterine blood flow during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1986, 250:R365–R369.
- Ceiler DL., De Mey JG. Chronic N^G-nitro-L-arginine methyl ester treatment does not prevent flow- induced remodeling in mesenteric feed arteries and arcading arterioles. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 2000, 20, 2057–2063.
- Celia G., Osol G. Uterine venous permeability in the rat is altered in response to pregnancy, vascular endothelial growth factor, and venous constriction. *Endothelium* 2005, 12, 81–8.
- Celia G., Osol G. Venoarterial communication as a mechanism for localized signaling in the rat uterine circulation. *Am J Obstet Gynecol.* 2002, 187, 1653–9.
- Cetin I., Giovannini N., Alvino G., Agostoni C., Riva E., Giovannini M., et al. Intrauterine growth restriction is associated with changes in polyunsaturated fatty acid fetal and maternal relationships. *Pediatr Res.* 2002, 52, 750e5.
- Changwon Y., Gwonhwa S., Whasun L. A mechanism for the effect of endocrine disrupting chemicals on placentation. *Chemosphere* 2019, 231, 326-336.
- Chen DB., Bird IM., Zheng J., Magness RR. Membrane estrogen receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway mediates acute activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen in uterine artery endothelial cells. *Endocrinology* 2004, 145,113–25.
- Chen DB., Bird IM., Zheng J., Magness RR. Membrane estrogen receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway mediates acute activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen in uterine artery endothelial cells. *Endocrinology* 2004, 145, 113-25.
- Chipperfield AR., langridge-Smith JE., Steele LW. Sodium entry into human placental microvillous (maternal) plasma membrane vesicles. *Q J Exp Physiol.*1988, 73, 399-411.
- Christensen HN. Interorgan amino acid nutrition. *Physiol Rev.* 1982, 62, 1193-1233.
- Cipolla M., Osol G. Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. *Am J Obstet Gynecol.* 1994, 171, 805–811.

- Cipolla MJ., Binder ND., Osol G. Myoendometrial versus placental uterine arteries: structural, mechanical, and functional differences in late-pregnant rabbits. *Am J Obstet Gynecol.* 1997, 177, 215– 221.
- Clarson LH., Glazier JD., Greenwood SL., Jones CJ., Sides MK., Sibley CP. Activity and expression of Na(+)-K(+)-ATPase in human placental cytotrophoblast cells in culture. *J Physiol.* 1996, 497 (Pt 3): 735-743.
- Clarson LH., Roberts VH., Greenwood SL., Elliott AC. ATP-stimulated Ca(2+)-activated K(+) efflux pathway and differentiation of human placental cytotrophoblast cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002, 282, R1077-R1085.
- Cnossen JS., Morris RK., Ter Riet G., Mol BW., Van Der Post JA., Coomarasamy A., Zwinderman AH., Robson SC., Bindels PJ., Kleijnen, J. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *Cmaj* 2008, 178, 701-11.
- Coan PM., Vaughan OR., Sekita Y., Finn SL., Burton GJ., Constancia M., Fowden AL. Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. *J. Physiol.* 2010, 588, 527 – 538.
- Colton I., Mandalà M., Morton. J., Davidge S.T., Osol G. Influence of constriction, wall tension, smooth muscle activation and cellular deformation on rat resistance artery vasodilator reactivity. *Cell Physiol Biochem.* 2012, 29, 883-92.
- Comar CL. Radiocalcium studies in pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 1956, 64: 281-298.
- D'Angelo G., Osol G. Modulation of uterine resistance artery lumen diameter by calcium and G protein activation during pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1994, 267, H952–H961.
- Dobson PD., Kell DB. Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? *Nat Rev Drug Discov.* 2008, 7, 205-220
- Dowell RT., Kauer CD. Maternal hemodynamics and uteroplacental blood flow throughout gestation in conscious rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1997, 19, 613–25.
- Dowell RT., Kauer CD. Maternal hemodynamics and uteroplacental blood flow throughout gestation in conscious rats. *Meth Find Exp Ciin Pharmacol.* 1997, 19, 613– 625.
- Duan, SZ.; Usher, MG.; Mortensen, RM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature. *Circ Res.* 2008, 102, 283–294.

- Dumont O., Loufrani L., Henrion D. Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2007, 27, 317–324.
- Edlow AG.; Chein M.; Smith N.A.; Lu C.; McElrath T.F. Bisphenol A exposure: Concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters. *Reprod toxicol.* 2012, 34, 1-7.
- Edman CD., Toofanian A., MacDonald PC., Gant NF. Placental clearance rate of maternal plasma androstenedione through placental estradiol formation: an indirect method of assessing uteroplacental blood flow. *Am J Obstet Gynecol* 1981, 141, 1029–1037.
- Edwards D., Jones CJ., Sibley CP., Nelson DM. Paracellular permeability pathways in the human placenta: a quantitative and morphological study of maternal-fetal transfer of horseradish peroxidase. *Placenta* 1993, 14, 63-73.
- Erami C., Zhang H., Tanoue A., Tsujimoto G., Thomas SA., Faber JE. Adrenergic catecholamine trophic activity contributes to flow-mediated arterial remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005, 289, H744–H753.
- Erami C., Zhang H., Tanoue A., Tsujimoto G., Thomas SA., Faber JE. Adrenergic catecholamine trophic activity contributes to flow-mediated arterial remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005, 289:H744–H753.
- Eriksson J., Forsen T., Tuomilehto J., Osmond C., Barker D. Foetal and childhood growth and hypertension in adult life. *Hypertension.* 2000, 36, 790–4.
- Fisher GJ., Kelley LK., Smith CH. ATP-dependent calcium transport across basal plasma membranes of human placental trophoblast. *Am J Physiol.* 1987, 252, C38-C46.
- Forbes TR., Glassen G. Steroid compounds and the dilatation of ovarian and uterine veins in the mouse. *Am J Obstet Gynecol.* 1972, 113, 678–80.
- Ford SP., Reynolds LP., Ferrell CL. Blood flow, steroid secretion and nutrient uptake of the gravid uterus during the periparturient period in sows. *J Anim Sci.* 1984, 59, 1085–1091.
- Ford SP., Stice SL. Effects of the ovary and conceptus on uterine blood flow in the pig. *J Reprod Fertil Suppl* 1985, 33, 83–90.
- Fowden AL., Sferruzzi-Perri AN., Coan PM., Constancia M., Burton GJ. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. *J. Physiol.* 2009, 587, 3459 – 3472.
- Fox GE., Van WR., Resau JH., Sun CJ. The effect of immersion formaldehyde fixation on human placental weight. *Arch Pathol Lab Med.* 1991,115, 726–8.

- Gauderat G., Picard-Hagen N., Toutain PL., Corbel T., Viguié C., Puel S., Lacroix MZ., Mindeguia P., Bousquet-Melou A., Gayrard V. Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol A. *Environmental International* 2016, 86, 52-59.
- Gauster M., Huppertz B. The paradox of caspase 8 in human villous trophoblast fusion. *Placenta* 2010, 31, 82–88.
- Genuis SJ., Beesoon S., Birkholz D., Lobo RA. Human excretion of bisphenol A: blood urine, and sweat (BUS) study. *J Environ Public Health* 2012, 2012, 185731.
- Ginther OJ. Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. *J Anim Sci.* 1974, 39, 550–64.
- Girling JE., Lederman FL., Walter LM., Rogers PA. Progesterone, but not estrogen, stimulates vessel maturation in the mouse endometrium. *Endocrinology* 2007, 11, 5433–41.
- Glazier JD., Atkinson DE., Thornburg KL., Sharpe PT., Edwards D., Boyd RD., Sibley CP. Gestational changes in Ca²⁺ transport across rat placenta and mRNA for calbindin9K and Ca(2+)-ATPase. *Am J Physiol.* 1992, 263, R930-R935.
- Glazier JD., Cetin I., Perugino G., Ronzoni S., Grey AM., Mahendran D., et al. Association between the activity of the system A amino acid transporter in the microvillous plasma membrane of the human placenta and severity of fetal compromise in intrauterine growth restriction. *Pediatr Res.* 1997, 42, 514e9.
- Gokina NI., Chan S-L., Chapman AC., Oppenheimer K., Jetton TL., Cipolla MJ. Inhibition of PPAR γ during rat pregnancy causes intrauterine growth restriction and attenuation of uterine vasodilation. *Front Physiol.* 2013, 23,4-187.
- Gokina NI., Mandala M., Osol G. Induction of localized differences in rat uterine radial artery behavior and structure during gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 2003, 189, 1489–1493.
- Grandas OH., Mountain DH., Kirkpatrick SS., Cassada DC., Stevens SL., Freeman MB., Goldman MH. Regulation of vascular smooth muscle cell expression and function of matrix metalloproteinases is mediated by estrogen and progesterone exposure. *J Vasc Surg.* 2009, 49, 185-91.
- Grasselli E., Voci A., Demori I., Vecchione G., Compalati A.D., Gallo G., Goglia F. De Matteis R., Silvestri E., Vergani L. Triglyceride mobilization from lipid droplets sustains the anti-ateatotic action of Iodothyronines in cultured rat hepatocytes. *Front Physiol.* 2015, 6, 418.

- Greenwood SL., Brown PD., Edwards D., Sibley CP. Patch clamp studies of human placental cytotrophoblast cells in culture. *Trophoblast Research* 1993b, 7, 53-68.
- Greenwood SL., Clarson LH., Sides MK., Sibley, CP. Membrane potential difference and intracellular cation concentrations in human placental trophoblast cells in culture. *J Physiol.* 1996, 492 , 629-640.
- Greiss FC. Jr, Anderson SG. Uterine blood flow during early ovine pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1970, 106, 30–38.
- Griendling KK., Fuller EO., Cox RH. Pregnancy-induced changes in sheep uterine and carotid arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1985, 248, H658–H665.
- Grummer MA., Sullivan JA., Magness RR., Bird IM. Vascular endothelial growth factor acts through novel, pregnancy-enhanced receptor signalling pathways to stimulate endothelial nitric oxide synthase activity in uterine artery endothelial cells. *Biochem J* 2009, 417, 501-511
- Grindler NM., Vanderlinden L., Karthikraj K., Teal S., Polotsky AJ., Powell TL., Yang IV., Jansson T. Exposure to phthalate, an endocrine disrupting chemical, alters the first trimester placental methylome and transcriptome in women. *Sci Rep.* 2018, 8, 6086.
- Guenther AE., Conley AJ., Van Orden DE., Farley DB., Ford SP. Structural and mechanical changes of uterine arteries during pregnancy in the pig. *J Anim Sci.* 1988, 66, 3144–3152.
- Hammer ES., Cipolla MJ. Arterial wall hyperplasia is increased in placental compared with myoendometrial radial uterine arteries from late-pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol.* 2005, 192, 302– 308.
- Hart MV., Hosenpud JD., Hohimer AR., Morton MJ. Hemodynamics during pregnancy and sex steroid administration in guinea pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*1985, 249, R179–R185.
- Hediger MA., Romero MF., Peng JB., Rolfs A., Takanaga H., Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch.* 2004, 447, 465-468.
- Hees H., Moll W., Wrobel KH., Hees I. Pregnancy-induced structural changes and trophoblastic invasion in the segmental mesometrial arteries of the guinea pig (*Cavia porcellus* L.). *Placenta* 1987, 8, 609–627.
- Hempstock J., Cindrova-Davies T., Jauniaux E., Burton GJ. Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: a morphological and immunohistochemical study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2004, 2, 58.

- Hollestelle SC., De Vries MR., Van Keulen JK., Schoneveld AH., Vink A., Strijder CF., Van Middelaar BJ., Pasterkamp G., Quax PH., De Kleijn DP. Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling. *Circulation* 2004, 109, 393–398.
- Ikezuki Y., Tsutsumi O., Takai Y., Kamei Y., Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human reproduction (Oxford, England)* 2002, 17, 2839–2841.
- Inoue H., Tsuruta A., Kudo S., Ishii T., Fukushima Y., Iwano H., et al Bisphenol A glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats. *Drug Metab Dispos.* 2004, 33, 55–59.
- Inoue H., Yokota H., Makino T., Yuasa A., Kato S. Bisphenol A glucuronide, a major metabolite in rat bile after liver perfusion. *Drug Metab Dispos.* 2001, 29, 1084–1087.
- Isaka K., Usuda S., Ito H., Sagawa Y., Nakamura H., Nishi H., Suzuki Y., Li YF., Takayama M. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta.* 2003, 24, 53–64.
- Ismail A., Nawaz Z. Nuclear hormone receptor degradation and gene transcription: an update. *IUBMB Life* 2005, 57, 483–90.
- Iwaki T., Yamamoto K., Matsuura T., Sugimura M., Kobayashi T., Kanayama N. Alteration of integrins under hypoxic stress in early placenta and choriocarcinoma cell line BeWo. *Gynecol Obstet Invest.* 2004, 57, 196–203.
- Jangwoo L.; Kyungho C.; Jeongim P.; Hyo-Bang M.; Gyuyeon C.; Jeong J.L.; Eunsook S.; Hai-joong K.; So-Hee E.; Gun-Ha K.; Geum J.C.; Sung K.K.; Sungjoo K.; Su Young K.; Seunghyo K.; Soyong E.; Sooran C.; Young D.K.; Sungkyoon Kim. Bisphenol A distribution in serum, urine, placenta, breast milk, and umbilical cord serum in a birth panel of mother-neonate pairs. *Sci Total Environ.* 2018, 626, 1494-1501.
- Jansson T., Ekstrand Y., Wennergren M., Powell TL. Placental glucose transport in gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol.* 2001, 184, 111-116.
- Jansson T., Scholtbach V., Powell TL. Placental transport of leucine and lysine is reduced in intrauterine growth restriction. *Pediatr Res.* 1998, 44, 532e7.
- Jansson T., Wennergren M., Illsley NP. Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993, 771554e62.
- Jansson T., Ylve´n K., Wennergren M., Powell TL. Glucose transport and system A activity in syncytiotrophoblast microvillous and basal membranes in intrauterine growth restriction. *Placenta* 2002, 23,392-9.

- Jeyakumar M., Webb P., Baxter JD., Scanlan TS., Katzenellenbogen JA. Quantification of ligand- regulated nuclear receptor corepressor and coactivator binding, key interactions determining ligand potency and efficacy for the thyroid hormone receptor. *Biochemistry* 2008, 47, 7465–76
- Johansson M., Glazier JD., Sibley CP., Jansson T., Powell TL. Activity and protein expression of the Na⁺/H⁺ exchanger is reduced in syncytiotrophoblast microvillous plasma membranes isolated from preterm intrauterine growth restriction pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002, 87, 5686- 9564.
- Johnson LW., Smith CH. Monosaccharide transport across microvillous membrane of human placenta. *Am J Physiol.* 1980, 238, C160-C168.
- Johnson LW., Smith CH. Glucose transport across the basal plasma membrane of human placental syncytiotrophoblast. *Biochim Biophys Acta* 1985, 815, 44-50.
- Joost HG., Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/ polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol.* 2001, 18, 247-256.
- Jose SO., Ramadoss J., Koch JM., Jiang Y., Zheng J., Magness RR. Estradiol-17 beta and its cytochrome P450- and catechol-O- methyltransferase-derived metabolites stimulate proliferation in uterine artery endothelial cells: role of estrogen receptor-alpha versus estrogen receptor-beta. *Hypertension* 2010, 55, 1005–11.
- Karsdorp VH., Van Vugt JM., Van Geijn HP., Kostense PJ., Arduini D., Montenegro, N., Todros T. Clinical significance of absent or reversed end diastolic velocity waveforms in umbilical artery. *Lancet* 1994, 344, 1664-1668.
- Kaufmann P., Black S., Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003, 69, 1–7.
- Kaufmann P., Schroder H., Leichtweiss HP. Fluid shift across the placenta: II. Fetomaternal transfer of horseradish peroxidase in the guinea pig. *Placenta* 1982, 3, 339-348.
- Keller H., Givel F., Perroud M., Wahli W. Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. *Mol Endocrinol.* 1995, 9, 794-804.
- Kelley LK., Smith CH., King BF. Isolation and partial characterization of the basal cell membrane of human placental trophoblast. *Biochim Biophys Acta* 1983, 734, 91-98.

- Kertschanska S., Kosanke G., Kaufmann, P. Is there morphological evidence for the existence of transtrophoblastic channels in the human placental villi? *Trophoblast Research* 1994, 8, 581-596.
- Keyes LE., Majack R., Dempsey EC., Moore LG. Pregnancy stimulation of DNA synthesis and uterine blood flow in the guinea pig. *Pediatr Res.* 1997, 41, 708–15.
- Keyes LE., Moore LG., Walchak SJ., Dempsey EC. Pregnancy-stimulated growth of vascular smooth muscle cells: importance of protein kinase c-dependent synergy between estrogen and platelet-derived growth factor. *J Cell Physiol.* 1996, 166, 22–32.
- King BF. Absorption of peroxidase-conjugated immunoglobulin G by human placenta: an in vitro study. *Placenta* 1982, 3, 395–406.
- Kinyamu HK., Archer TK. Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in mdm2 protein expression. *Mol. Cell. Biol.* 2003, 23, 5867–81.
- Kohn MC., Melnick RL. Biochemical origins of the non-monotonic receptor-mediated dose-response. *J. Mol. Endocrinol.* 2002, 29, 113–23.
- Kramer MS. The epidemiology of adverse pregnancy outcomes: an overview. *J. Nutr.* 2003, 133, 1592S–1596S.
- Krause BJ., Garrasco-Wong I., Caniuguir A., Carvajal J., Farías M., Casanello P. Endothelial eNOS/arginase imbalance contributes to vascular dysfunction in IUGR umbilical and placental vessels. *Placenta* 2013, 34, 20-8.
- Kudo Y., Boyd CAR. Human placental amino acid transporter genes: expression and function. *Reproduction* 2000, 124, 593-600.
- Kuramiz H., Natsui J., Sugawara K., Itoh S., Tanaka S. Electrochemical evaluation of the interaction between endocrine disrupter chemicals and estrogen receptor using 17, beta-estradiol labeled with daunomycin. *Anal Chem.* 2002, 7, 533-8.
- Kurebayashi H., Nagatsuka S., Nemoto H., Noguchi H., Ohno Y. Disposition of low doses of ¹⁴C-bisphenol A in male, female, pregnant, fetal, and neonatal rats. *Arch Toxicol.* 2005, 79, 243–252.
- Lager S., Powell TL. Regulation of nutrient transport across the placenta. *J. Pregnancy* 2012, 2012, 179827.
- Lang U., Baker RS., Braems G., Zygmunt M., Kunzel W., Clark KE. Uterine blood flow: a determinant of fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003, 110, S55–S61.
- Langille BL. Arterial remodeling: relation to hemodynamics. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996, 74, 834– 841.

- Langille BL., O'Donnell F. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 1986, 231, 405–407.
- Lees MH., Hill JD., Ochsner AJ., Thomas CL., Novy MJ. Maternal placental and myometrial blood flow of the rhesus monkey during uterine contractions. *Am J Obstet Gynecol* 1971, 110, 68–81
- Li Q., Davila J., Kannan A., Flaws JA., Bagchi MK., Bagchi IC. Chronic exposure to Bisphenol A affects uterine function during early pregnancy in mice. *Endocrinology* 2016, 157, 1764-74.
- Longo S., Bollani L., Decembrino L., Di Comite A., Angelini M., Stronati M. Short-term and long-term sequelae in intrauterine growth retardation (IUGR). *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2013, 26, 222–225.
- Loufrani L., Henrion D. Role of the cytoskeleton in flow (shear stress)-induced dilation and remodeling in resistance arteries. *Med Biol Eng Comput* 2008, 46, 451–460.
- Lunell NO., Nylund LE, Lewander R., Sarby B. Uteroplacental blood flow in pre-eclampsia measurements with indium-113m and a computer-linked camera. *Clin. Exp. Hypertens B.* 1982, 1, 105–117.
- Lyall F. Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy: a review. *Placenta* 2005, 26, S31–S36.
- Magnusson AL., Waterman IJ., Wennergren M., Jansson T., Powell TL. Triglyceride hydrolase activities and expression of fatty acid binding proteins in human placenta in pregnancies complicated by IUGR and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89, 4607e14.
- Mahendran D., Donnai P., Glazier JD., D'Souza SW., Boyd RDH., Sibley CP. Amino acid (System A) transporter activity in microvillous membrane vesicles from the placentas of appropriate and small for gestational age babies. *Pediatr Res.* 1993, 34, 661e5.
- Makinoda S., Moll W. Deoxyribonucleic acid synthesis in mesometrial arteries of guinea pigs during oestrous cycle, pregnancy and treatment with oestradiol benzoate. *Placenta* 1986, 7, 189–198.
- Mandalà M. Influence of estrogens on uterine vascular adaptation in normal and preeclamptic pregnancies. *Int J Mol Sci.* 2020, 8, 21, 2592.
- Mannelli C., Szóstek A.Z., Lukasik K., Carotenuto C., Ietta F., Romagnoli R., Ferretti C., Paulesu L. Wołczynski S., Skarzynski DJ. Bisphenol A modulates receptivity and secretory function of human decidual cells: An in vitro study. *Reproduction* 2015, 150, 115–125.

- Martínez-Razo LD., Martínez-Ibarra A., Vázquez-Martínez ER., Cerbón M. The impact of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and Mono(2-ethylhexyl) Phthalate in placental development, function, and pathophysiology. *Environ Int.* 2021, 146, 106228.
- Masaharu M., Kang J.H. Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. *Biotechnol Adv.* 2018, 36, 311-327.
- Mateev SN., Mouser R., Young DA., Mecham RP., Moore LG. Chronic hypoxia augments uterine artery distensibility and alters the circumferential wall stress-strain relationship during pregnancy. *J Appl Physiol.* 2006,100, 1842–1850.
- Matsumoto J., Yokota H., Yuasa A. Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyl- transferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ Health Perspect* 2002, 110, 193–196.
- Mayhew TM., Jackson MR., Boyd PA. Changes in oxygen diffusive conductances of human placental during gestation (10 – 41 weeks) are commensurate with the gain in fetal weight. *Placenta* 1993, 14, 51 – 61.
- Maynard SE., Venkatesha S., Thadhani R., Karumanchi SA. Soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia. *Pediatr Res.* 2005, 57, 1–7.
- McNamara H., Hutcheon JA., Platt RW., Benjamin A., Kramer MS. Risk factors for high and low placental weight. *Paediatric and perinatal epidemiology.* 2014, 28, 97–105.
- Merchant SJ., Davidge ST. The role of matrix metalloproteinases in vascular function: implications for normal pregnancy and pre-eclampsia. *Bjog.* 2004, 111, 931–939.
- Metcalfe J., Romney SL., Ramsey LH., Reid DE., Burwell CS. Estimation of uterine blood flow in normal human pregnancy at term. *J Clin Invest.* 1955, 34,1632–1638.
- Moe AJ. Placental amino acid transport. *Am J Physiol.* 1995, 268, C1321-C1331.
- Moll W. Structure adaptation and blood flow control in the uterine arterial system after hemochorial placentation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003,110, S19–S27.
- Moll W., Espach A., Wrobel KH. Growth of mesometrial arteries in guinea pigs during pregnancy. *Placenta* 1983, 4, 111–123.
- Moll W., Kunzel W. The blood pressure in arteries entering the placentae of guinea pigs, rats, rabbits, and sheep. *Pflugers Arch.* 1973, 338, 125–131.
- Molteni RA., Stys SJ., Battaglia FC. Relationship of fetal and placental weight in human beings: fetal/placental weight ratios at various gestational ages and birth weight distributions. *J Reprod Med.* 1978, 21, 327–34.

- Morani A., Warner M., Gustafsson J-A. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *J. Intern. Med.* 2008, 264, 128–42.
- Moriyama K., Tagami T., Akamizu T., Usui T., Saijo M., Kanamoto N., et al. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002, 87, 5185–90.
- Morris EA., Mandalà M., Ko NL., Osolo G. Postpartum Persistence of Maternal Uterine Vascular Gestational Adaptation in Rodents. *Reprod Sci.* 2020, 27, 611-620.
- Mossman HW. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Contrib. Embryol.* 1937, 26, 129 – 246.
- Müller J.E., Meyer N., Santamaria CG., Schumacher A., Luque EH., Zenclussen ML.; Rodriguez HA., Zenclussen AC. Bisphenol A exposure during early pregnancy impairs uterine spiral artery remodeling and provokes intrauterine growth restriction in mice. *Sci Rep.* 2018, 15, 8, 9196.
- Müller JE., Meyer N., Santamaria CG., Schumacher A., Luque EH., Zenclussen ML., Rodriguez HA., Zenclussen AC. Bisphenol A exposure during early pregnancy impairs uterine spiral artery remodeling and provokes intrauterine growth restriction in mice. *Sci rep.* 2018, 15, 8, 9196.
- Myers JE., Merchant SJ., Macleod M., Mires GJ., Baker PN., Davidge ST. MMP-2 levels are elevated in the plasma of women who subsequently develop preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2005 24, 103–115.
- Mylona P., Clarson H., Greenwood SL., Sibley CP. Expression of the Kir2.1 (inwardly rectifying potassium channel) gene in the human placenta and in cultured cytotrophoblast cells at different stages of differentiation. *Mol Hum Reprod.* 1998, 4, 195-200.
- Naeye RL. Do placental weights have clinical significance? *Hum Pathol.* 1987, 18, 387–91.
- Nanaev A., Chwalisz K., Frank HG., Kohnen G., Hegele-Hartung C., Kaufmann P. Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of extravillous trophoblast. *Cell Tissue Res.* 1995, 282, 407–421.
- Narciso L., Ietta F., Romagnoli R., Paulesu L., Mantovani A., Tait S. Effects of Bisphenol A on endogenous retroviral envelopes expression and trophoblast fusion in BeWo cells. *Reprod. Toxicol.* 2019, 89, 35–44.

- Natoli AK., Medley TL., Ahimastos AA., Drew BG., Thearle DJ., Dilley RJ., Kingwell BA. Sex steroids modulate human aortic smooth muscle cell matrix protein deposition and matrix metalloproteinase expression. *Hypertension* 2005, 46, 1129–1134.
- Nelson DM., Crouch EC., Curran EM., Farmer DR. Trophoblast interaction with fibrin matrix. Epithelialization of perivillous fibrin deposits as a mechanism for villous repair in the human placenta. *Am J Pathol.* 1990, 136, 855-865.
- Nelson SH., Steinsland OS., Suresh MS., Lee NM. Pregnancy augments nitric oxide-dependent dilator response to acetylcholine in the human uterine artery. *Hum Reprod.* 1998, 13, 1361–1367.
- Nelson SH., Steinsland OS., Wang Y., Yallampalli C., Dong YL., Sanchez JM. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ Res* 2000, 87, 406– 411.
- Nienartowicz A., Link S., Moll W. Adaptation of the uterine arcade in rats to pregnancy. *J Dev Physiol.* 1989,12, 101–108.
- Nishikawa M., Iwano H., Yanagisawa R., Koike N., Inoue H., Yokota H. Placental Transfer of Conjugated Bisphenol A and Subsequent Reactivation in the Rat Fetus. *Environ Health Perspect* 2010, 118, 1196-203.
- Norberg S., Powell TL., Jansson T. Intrauterine growth restriction is associated with a reduced activity of placental taurine transporters. *Pediatr Res.* 1998, 44, 233e8.
- Nuzzo AM, Camm EJ., Sferruzzi-Perri AN., Ashmore TJ., Yung H., Cindrova-Davies T., Spiroski A-M., Sutherland MR., Logan A., Austin-Williams S., Burton GJ., Rolfo A., Todros T., Murphy MP., Giussani DA. Placental Adaptation to Early-Onset Hypoxic Pregnancy and Mitochondria-Targeted Antioxidant Therapy in a Rodent Model. *Am J Pathol.* 2018, 188, 2704-2716.
- Odorisio T., Schietroma C., Zaccaria ML., Cianfarani F., Tiveron C., Tatangelo L. et al. Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. *J Cell Sci.* 2002, 115, 2559–67.
- Ong SS., Baker PN., Mayhew TM., Dunn WR. Remodeling of myometrial radial arteries in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2005, 192, 572–579.
- Osol G., Barron C., Gokina N., Mandala M. Inhibition of nitric oxide synthases abrogates pregnancy- induced uterine vascular expansive remodeling. *J Vase Res. J Vasc Res.* 2009, 46, 478-86.
- Osol G., Celia G., Gokina N., Barron C., Chien E., Mandala M. et al. Placental growth factor is a potent vasodilator of rat and human resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008, 243, 1381–7.

- Osol G., Cipolla M. Pregnancy-induced changes in the three-dimensional mechanical properties of pressurized rat uteroplacental (radial) arteries. *Am J Obstet Gynecol.* 1993,168, 268–274.
- Osol G., Ko LN., Mandalà M. Plasticity of the Maternal Vasculature During Pregnancy. *Annu Rev Physiol.* 2019, 10, 81:89-111.
- Padmanabhan V., Siefert K., Ransom S., Johnson T., Pinkerton J., Anderson L., et al. Maternal bisphenol-A levels at delivery: A looming problem? *J Perinatol.* 2008, 28, 258–63.
- Page KL., Celia G., Leddy G., Taatjes DJ., Osol G. Structural remodeling of rat uterine veins in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2002, 187, 1647–1652.
- Palmer SK., Zamudio S., Coffin C., Parker S., Stamm E., Moore LG. Quantitative estimation of human uterine artery blood flow and pelvic blood flow redistribution in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1992, 80, 1000–1006.
- Panti AA., Ekele BA., Nwobodo EI., Yakubu A. The relationship between the weight of the placenta and birth weight of the neonate in a Nigerian Hospital. *Nigerian medical journal: journal of the Nigeria Medical Association.* 2012, 53, 80–84.
- Paolini CL., Marconi AM., Ronzoni S., Di Noio M., Fennessey PV., Pardi G., et al. Placental transport of leucine, phenylalanine, glycine, and proline in intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86, 5427e32.
- Pasterkamp G., Galis ZS., de Kleijn DP. Expansive arterial remodeling: location, location, location. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 2004, 24, 650–657.
- Paulesu L., Rao CV., Ietta F., Pietropolli A., Ticconi C. hCG and Its Disruption by Environmental Contaminants during Human Pregnancy. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 914.
- Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res.* 2001, 29, e45.
- Philippat C., Heude B., Botton J., Alfaidy N., Calafat AM., Slama R., Eden mother-Child Cohort study group. *Environ Health Perspect* 2019, 127, 17002.
- Pijnenborg R., Bland JM., Robertson WB., Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 1983, 4, 397-413.
- Pijnenborg R., Robertson WB., Brosens I., Dixon G. Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta* 1981, 2, 71– 91.
- Pijnenborg R., Vercruyse L., Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006, 27, 939–58

- Pinney SE., Mesaros CA., Snyder NW., Busch CM., Xiao R., Aijaz S., Ijaz N., Blair IA., Manson JM. Second trimester amniotic fluid bisphenol A concentration is associated with decreased birth weight in term infants. *Reprod toxicol.* 2017, 67, 1-9.
- Polikandriotis, JA.; Mazzella, LJ.; Rupnow, HL.; Hart, CM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005, 25, 10–1816.
- Possomato-Vieira JS., Khalil RA. Mechanisms of endothelial dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia. *Adv Pharmacol.* 2016, 77, 361-431.
- Powell TL., Illsley NP. A novel technique for studying cellular function in human placenta: gestational changes in intracellular pH regulation. *Placenta* 1996, 17, 661-668.
- Pupo M., Pisano A., Lappano R., Santolla MF., De Francesco EM., Abonante S., Rosano C., Maggiolini M. Bisphenol A Induces Gene Expression Changes and Proliferative Effects through GPER in Breast Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. *Environ Health Perspect.* 2012, 120, 1177-82.
- Pustovrh MC., Jawerbaum A., White V., Capobianco E., Higa R., Martinez N., Lopez-Costa JJ., Gonzalez E. The role of nitric oxide on matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 in placenta and fetus from diabetic rats. *Reproduction* 2007, 134, 605–613.
- Qiu Q., Yang M., Tsang BK., Gruslin A. EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways. *Reproduction.* 2004, 128, 355–363.
- Raffetto JD., Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2008, 75, 346–359.
- Ramsey EM., Donner MW. Placental vasculature and circulation. *Anatomy, physiology, radiology, clinical aspects, atlas and textbook.* Stuttgart: Georg Thieme 1980. p. 101.
- Rekonen A., Luotola H., Pitkanen M., Kuikka J., Pyorala T. Measurement of intervillous and myometrial blood flow by an intravenous Xe method. *Br J Obstet Gynaecol.* 1976, 83, 723–728.
- Rice PA., Rourke JE., Nesbitt EL., JR. In vitro perfusion studies of the human placenta. IV. Some characteristics of the glucose transport system in the human placenta. *Gynecol Invest.* 1976, 7, 213-221.
- Robertson CM., Svenson LW., Kyle JM. Birth weight by gestational age for Alberta liveborn infants, 1985 through 1998. *J Obstet Gynaecol Can.* 2002, 24, 138–48.

- Romero J., Ventura F., Gomez M. Characterization of paint samples used in drinking water reservoirs: identification of endocrine disruptor compounds. *J. Chromatogr. Sci.* 2002, 40, 191–197.
- Rosenfeld CR., Morriss FH. Jr, Makowski EL., Meschia G., Battaglia FC. Circulatory changes in the reproductive tissues of ewes during pregnancy. *Gynecol Invest.* 1974, 5, 252–268.
- Rosenfeld CR., Morriss FH., Makowski EL., Meschia G., Battaglia FC. Circulatory changes in the reproductive tissues of ewes during pregnancy. *Gynecol Invest* 1974, 5, 252–68.
- Rote NS., Wei BR., Xu C., Luo L. Caspase 8 and human villous cytotrophoblast differentiation. *Placenta* 2010, 31, 89 – 96.
- Rudic RD., Shesely EG., Maeda N., Smithies O., Segal SS., Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest.* 1998, 101, 731–736.
- Salam RA., Das JK., Bhutta ZA. Impact of intrauterine growth restriction on long-term health. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2014, 17, 249–254.
- Saleem T., Sajjad N., Fatima S., Habib N., Ali SR., Qadir M. Intrauterine growth retardation—small events, big consequences. *Ital. J. Pediatr.* 2001, 37, 41.
- Saura M., Marquez S., Reventun P., Olea-Herrero N., Arenas MI., Toledano R MG., Gomez-Parrizas M., Muñoz-Moreno C., Gonzalez-Santander M., Zaragoza C., Bosch RJ. Oral administration of bisphenol A induces high blood pressure through angiotensin II/CaMKII-dependent uncoupling of eNOS. *Faseb J.* 2014, 28, 4719-28.
- Schiffers PM., Henrion D., Boulanger CM., Colucci-Guyon E., Langa-Vuves F., van Essen H., Fazzi GE., Levy BI., De Mey JG. Altered flow-induced arterial remodeling in vimentin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 2000, 20, 611–616.
- Schönfelder G., Wittfoht W., Hopp H., Talsness CE., Paul M., Chahoud I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal–fetal–placental unit. *Environ Health Perspect.* 2002, 110, A703–7.
- Schug TT., Janesick A., Blumberg B., Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2011, 127, 204–215.
- Shekhar S., et al. Detection of phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) from maternal blood plasma and amniotic fluid in Indian population. *General and comparative endocrinology.* 2017, 241, 100–107.
- Shennan DB., Boyd CA. Ion transport by the placenta: a review of membrane transport systems. *Biochim Biophys Acta* 1987, 906, 437-457.

- Sibley CP. et al. Placental-specific insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2004, USA 101, 8204 – 8208.
- Sibley CP., Glazier JD., Greenwood SL., Lacey H., Mynett K., Speake P., Jansson T., Johansson M., Powell TL. Regulation of placental transfer: the Na(+)/H(+) exchanger—a review. *Placenta* 2002, 23, S39-S46.
- Sideri M., De Virgillis G., Rainoldi, R., Remotti G. The ultrastructural basis of the nutritional transfer: evidence of different patterns in the plasma membranes of the multilayered placental barrier. *Trophoblast Research* 1983, 1, 15-26.
- Smith GC., Fretts RC. Stillbirth. *Lancet* 2007, 370, 1715–1725.
- Soares R., Reis-Filho JS, Gartner F., Schmitt FC. Vascular endothelial growth factor, transforming growth factor-alpha, and estrogen receptors: possible cross-talks and interactions. *Am J Pathol.* 2002, 160, 381-2.
- Soto AM., Sonnenschein C. The two faces of janus: sex steroids as mediators of both cell proliferation and cell death. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001, 93, 1673–5.
- Soto AM., Sonnenschein C., Chung KL., Fernandez MF., Olea N., Olea Serrano F. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect* 1995, 103, 113–122.
- Spagnoletti A., Paulesu L., Mannelli C., Ermini L., Romagnoli R., Cintonino M., Ietta F. Low concentrations of Bisphenol A and para-Nonylphenol affect extravillous pathway of human trophoblast cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015, 412, 56.
- Sprague BJ., Phernetton TM., Magness RR., Chesler NC. The effects of the ovarian cycle and pregnancy on uterine vascular impedance and uterine artery mechanics. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009, 144, 170–8.
- St-Louis J., Sicotte B., Beausejour A., Brochu M. Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction* 2006, 131, 331–339.
- St-Louis J., Sicotte B., Bedard S., Brochu M. Blockade of angiotensin receptor subtypes in arcuate uterine artery of pregnant and postpartum rats. *Hypertension* 2001, 38, 1017–1023.
- Stewart EA., Nowak RA. New concepts in the treatment of uterine leiomyomas. *Obstet Gynecol.* 1998, 92, 624–7.
- Strakovsky RS., Schantz SL. Using experimental models to assess effects of bisphenol A (BPA) and phthalates on the placenta: challenges and perspectives. *Toxicol Sci.* 2018, 166, 250-268.

- Stulc J. Extracellular transport pathways in the haemochorial placenta. *Placenta* 1989, 10, 113-119.
- Su MT., Tsai PY., Tsai HL., Chen YC., Kuo PL. miR-346 and miR-582-3p-regulated EG-VEGF expression and trophoblast invasion via matrix metalloproteinases 2 and 9. *Biofactors*. 2017, 43, 210–219.
- Tabata M., Negishi H., Yamaguchi T., Makinoda S., Fujimoto S., Moll W. The effects of the proliferation of the radial arteries of the placenta on oxygen transport to the fetal guinea pig. *Adv Exp Med Biol*. 1988, 222, 675–81.
- Tachibana T., Wakimoto Y., Nakamuta N., Phichitraslip T., Wakitani S., Kusakabe K., Hondo E., Kiso Y. Effects of Bisphenol A (BPA) on Placentation and Survival of the Neonates in Mice. *J Reprod Dev*. 2007, 53, 509-14.
- Tai LK., Okuda M., Abe J., Yan C., Berk BC. Fluid shear stress activates proline-rich tyrosine kinase via reactive oxygen species-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vase Biol*. 2002, 22, 1790– 1796.
- Takao Y., Lee HC., Kohra S., Arizono K. Release of bisphenol A from food can lining upon heating. *Journael of Health Science* 2002, 48, 331-334.
- Takayanagi S., Tokunaga T., Liu X., Okada H., Matsushima A., Shimohigashi Y. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett*. 2006, 1,167, 95-105.
- Tessier DR., Ferraro ZM., Gruslin A. Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity. *Placenta* 2013, 34, 205 – 211.
- Thaler I., Manor D., Itskovitz J., Rottem S., Levit N., Timor-Tritsch I., Brandes JM. Changes in uterine blood flow during human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1990, 162, 121–125.
- Thornburg KL., Burry KJ., Adams AK., Kirk EP., Faber JJ. Permeability of placenta to inulin. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1988, 158, 1165 – 1169.
- Thornburg KL., Jacobson SL., Giraud GD., Morton MJ. Hemodynamic changes in pregnancy. *Semin Perinatol*. 2000, 24, 11–14.
- Tibbetts TA., Mendoza-Meneses M., O'Malley BW., Conneely OM. Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biol. Reprod*. 1998, 59, 1143–52.
- Timms BG., Howdeshell KL., Barton L., Bradley S., Richter CA., vom Saal FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102, 7014–7019.

- Tobias JH., Cooper C. PTH/PTHrP activity and the programming of skeletal development in utero. *J Bone Miner Res.* 2004, 19, 177-182.
- Tronc F., Mallat Z., Lehoux S., Wassef M., Esposito B., Tedgui A. Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 2000, 20, E120–E126.
- Tuttle JL., Nachreiner RD., Bhuller AS., Condict KW., Connors BA., Herring BP., Dalsing MC., Unthank JL. Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density, and eNOS expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001, 281, H1380–H1389.
- Van der Heijden OW., Essers YP., Fazzi G., Peeters LL., De Mey JG., van Eys GJ. Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase- deficient mice. *Biol Reprod.* 2005, 72, 1161–1168.
- Van der Heijden OW., Essers YP., Simkens LH., Teunissen QG., Peeters LL., De Mey JG., van Eys GJ. Aging blunts remodeling of the uterine artery during murine pregnancy. *J Soc Gynecol Invest.* 2004, 11, 304–310.
- Vandenberg LN., Chahoud I., Heindel JJ., Padmanabhan V., Paumgarten F. JR., Schoenfelder G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to Bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2010, 118, 1055–1070.
- Vandenberg LN., Colborn T., Hayes TB., Heindel JJ., Jacobs DR., Lee D-H., et al. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr. Rev.* 2012, 33, 378–455.
- Vandenberg LN., Hauser R., Marcus M., Olea N., Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol.* 2007, 24, 139–77.
- Vandenberg LN., Maffini M V., Sonnenschein C., Rubin BS., Soto AM. Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. *Endocr. Rev.* 2009, 30, 75–95.
- Veille JC., Li P., Eisenach JC., Massmann AG., Figueroa JP. Effects of estrogen on nitric oxide biosynthesis and vasorelaxant activity in sheep uterine and renal arteries in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* 1996, 174, 1043-9.
- Walsh B. The perils of plastic. *Time* 2010, 12, 175, 44-6, 48, 50.
- Wetherill YB., Akingbemi BT., Kanno J., McLachlan J., Nadal A., Sonnenschein C., et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod. Toxicol.* 2007, 24, 178–98.
- Whitney EA., Ducsay CA., Valenzuela GJ. Is uterine blood flow controlled locally or systemically in the pregnant rabbit? *Am J Obstet Gynecol.* 1993, 169, 1507–1509.

- Willis DM., O'Grady JP., Faber JJ., Thornburg KL. Diffusion permeability of cyanocobalamin in human placenta. *Am. J. Physiol.* 1986, 250, R459 – R464.
- Yin G., Zhu X., Guo C., Yang Y., Han T., Chen L., Yin W., Gao P., Zhang H., Geng J., Liang L. Differential expression of estradiol and estrogen receptor α in severe preeclamptic pregnancies compared with normal pregnancies., *Mol Med Rep.* 2013, 7, 981-5.
- Young Kim J., Gwang Jeong H. Down-regulation of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α expression by bisphenol A via nuclear factor- κ B inactivation in macrophages. *Cancer Lett.* 2003,196, 69-76.
- Yu J., Zhang Z., Li Z., Feng X., He L., Liu S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) agonist improves coronary artery endothelial function in diabetic patients with coronary artery disease. *J Int Med Res.* 2010, 38, 86–94.
- Yunzen Y., Tang Y., Xiong Y., Feng L., Li X. Bisphenol A exposure alters placentation and causes preeclampsia-like features in pregnant mice involved in reprogramming of DNA methylation of WNT2. *The Faseb Journal* 2018, 33, 2732-2742.
- Zalko D., Jacques C., Duplaln H., Bruel S., Perdu E. Viable skin efficiently and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 2011, 82, 424-30.

RINGRAZIAMENTI:

La prima persona che voglio ringraziare è il mio supervisore il Prof. Maurizio Mandalà, lo ringrazio per la sua pazienza, professionalità, generosità e per tutto quello che in questi anni ha fatto per me e per far sì che io affrontassi il dottorato con serenità. Lo ringrazio per esserci stato nei momenti di sconforto ma soprattutto nei momenti di gioia e di soddisfazione, per avermi insegnato ad amare ciò che stavo facendo, la ricerca, e per avermi accompagnato senza abbandonarmi mai in questo splendido viaggio. Oltre a lui ringrazio tutte le persone con cui ho lavorato, il mio TEAM e dico “mio” perché per me è stato una seconda casa, una seconda famiglia con cui ho vissuto momenti felici e anche di sconforto, ringrazio tutti i tesisti che hanno lavorato al mio fianco ma soprattutto due ancora per me ovvero Rossana e Mariacarmela, senza la loro presenza, senza il rapporto meraviglioso che abbiamo creato e la sinergia che c'è sempre stata tra noi tutto questo non sarebbe stato lo stesso.

Ringrazio Giandomenico, il mio amore grande, perché durante questo percorso mi ha ascoltata, mi ha sostenuta, mi ha capita, mi ha aiutata a superare i momenti difficili, che non sono mancati, per l'amore che ogni singolo istante mi dà, ma soprattutto lo ringrazio perché durante questi anni mi ha donato la cosa più bella e più importante Mattia, che senza saperlo ha reso la mia vita più bella, più luminosa e per questo il mio ringraziamento più grande va a lui per i suoi sorrisi inconsapevoli che mi fanno tornare il sorriso alla fine di una giornata stancante, per la gioia che mi regala ogni volta che mi chiama MAMMA, per essere arrivato nelle nostre vite e averle rese migliori, e per aver reso noi felici.

Ringrazio la mia mamma perché è tutto per me, un'amica, una confidente, una sostenitrice, una nonna meravigliosa. La ringrazio perché non smette mai di credere in ciò che faccio e di darmi il suo supporto sempre. Con lei ringrazio tutta la mia meravigliosa famiglia. I Miei suoceri, Giorgia perché CI SONO e questo è quello che conta. I miei zii, i miei cugini, tutti loro lontani e vicini, perché siamo così uniti che in fondo lontani non ci sentiamo mai. Ringrazio tutti perché ciascuno di loro, a modo suo, ha contribuito alla mia crescita e perché gli voglio un bene pazzo.

Ringrazio le miei amiche e non occorre che io le nomini una per una, loro sanno tutto quello che hanno fatto per me e quanto io sia grata a tutto ciò.

In fine ringrazio due angeli che so che mi sostengono da lì su e che mi mancano tantissimo Papà e Zio Angelo, sarebbe stato bello condividere anche questo traguardo insieme.

