UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

Andrea Tumminia

EFFETTI CLINICI E PLACENTARI DELL'IPERGLICEMIA IN GRAVIDANZA IN DONNE CON DIABETE MELLITO

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN

BIOMEDICINA TRASLAZIONALE (XXX CICLO)

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Lorenzo Malatino

Relatore: Chiar.mo Prof. Sebastiano Squatrito

Tutor: Chiar.ma Prof.ssa Laura Sciacca

A.A. 2016 / 2017

INDICE

INTRODUZIONE

1. Iperglicemia in gravidanza

2. Effetti dell'iperglicemia in gravidanza

    2a. Effetti sulla gestante

    2b. Effetti sul prodotto del concepimento

3. La placenta umana

3a. Insulina e recettore insulinico

3b. Fattori di crescita insulino-simili

3c. Effetti placentari dell'iperglicemia

SCOPO DELLO STUDIO

MATERIALI E METODI

RISULTATI

DISCUSSIONE

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

1. Iperglicemia in gravidanza

L'iperglicemia in gravidanza comprende essenzialmente due condizioni: il diabete gestazionale e tutte le forme pregravidiche di iperglicemia fino al diabete (1). Si parla di iperglicemia pregravidica quando le alterazioni del metabolismo dei carboidrati sono già presenti prima del concepimento. Tali alterazioni includono: diabete mellito di tipo 1, diabete mellito di tipo 2, altre alterazioni del metabolismo dei carboidrati quali alterata tolleranza al glucosio e alterata glicemia a digiuno (1). Mentre nel diabete mellito di tipo 1 l'unica terapia possibile è quella insulinica, nelle altre forme di diabete in gravidanza la scelta della terapia dipende dal livello di iperglicemia osservata e può essere o solo dietetica o con insulina associata.

Il diabete gestazionale (GDM) è un'intolleranza ai carboidrati che insorge in gravidanza generalmente nel secondo o nel terzo trimestre. Anche in questo caso la scelta della terapia dipende dal livello di iperglicemia osservata e può essere sia dietetica che insulinica. Insieme hanno una frequenza di circa il 6-7% di cui il 97% è costituito dal GDM mentre circa il 3% è costituito dal diabete pregravidico.

2. Effetti dell'iperglicemia in gravidanza

2a. Effetti sulla gestante

Il diabete mal compensato o misconosciuto è associato a un aumentato rischio di *aborto*.

È stato osservato anche un modesto aumento del volume del liquido amniotico in tutte le gestanti diabetiche, ma un *polidramnios* notevole sicuramente non può essere imputabile esclusivamente al diabete, bensì potrebbe essere dovuto ad altre cause come la presenza di malformazioni fetali o le gravidanze gemellari.

Anche la frequenza della *gestosi* è maggiore nelle donne diabetiche: quasi triplicata rispetto alla popolazione normale. Inoltre, secondo lo studio di Ekbom e il Copenaghen Pre-eclampsia in Diabetic Pregnancy Study Group del 1999, la comparsa in una diabetica di microalbuminuria indicherebbe un rischio aumentato di gestosi in una futura gravidanza.

Vi è inoltre un aumentato rischio di *distacco intempestivo di placenta* normalmente inserita, di *parto pretermine* e di *ipocinesia uterina*. Per tutti questi motivi la *mortalità materna* rimane ancora superiore rispetto alla popolazione normale.

Le donne affette da diabete gestazionale presentano un elevato rischio di sviluppare la *sindrome metabolica*, il *diabete mellito di tipo 2* e le *malattie cardiovascolari* nel corso della vita (2).

2b. Effetti sul prodotto del concepimento

Il problema delle embriopatie e fetopatie causate dal diabete è strettamente collegato alla mortalità perinatale; questa dipende dalla gravità del diabete ma anche dall'epoca gestazionale in cui avviene il parto.

A differenza dei ciò che accade nel diabete pregravidico, nei nati da madre con diabete gestazionale il rischio di malformazioni fetali non è aumentato.

Gli effetti negativi di tipo antropometrico del diabete materno sul prodotto del concepimento comprendono la macrosomia (25%) e il ritardato accrescimento tardivo (10%).

Si definiscono *macrosomi* tutti i nati con peso pari o superiore a 4 kg, sono invece definiti *grandi per epoca gestazionale (Large for Gestational Age, LGA)* i nati con peso pari o superiore al 90° percentile per età gestazionale. Macrosomia o LGA possono essere la conseguenza di un diabete non perfettamente compensato ove si osserva una protratta iperglicemia nella seconda metà della gravidanza, soprattutto nelle ultime dieci settimane.

Il glucosio materno raggiunge il feto attraverso la placenta mediante un meccanismo di diffusione facilitata mediata da trasportatori; la glicemia fetale è più bassa di quella materna di circa 20-30 mg/dl e rispecchia proporzionalmente le oscillazioni glicemiche materne. L'insulina e gli ormoni contro regolatori, invece, non passano la placenta se non in una piccolissima percentuale biologicamente insignificante. Un feto di madre diabetica scompensata riceve quindi una quantità abnorme di glucosio che va a stimolare la sua secrezione di insulina. Durante l'ottava settimana di gestazione il pancreas fetale comincia a secernere insulina e nella seconda metà della gravidanza è sviluppato a tal punto da potere far fronte ad un'eventuale iperglicemia.

L'insulina è un ormone anabolizzante e per questo motivo il feto iperinsulinemico tende ad aumentare di peso e potrebbe presentare al momento della nascita un'eccessiva adiposità, visceromegalia, accrescimento delle spalle e dell'addome sproporzionato rispetto alle dimensioni del cranio con conseguente aumentato rischio di *distocia di spalla*.

Quindi si può concludere che la causa della macrosomia nel nato da madre diabetica è duplice: metabolica (iperglicemia) ed endocrina (iperinsulinismo fetale reattivo).

Bisogna, infatti, considerare l'ipersecrezione insulinica del feto come un meccanismo di difesa verso l'eccessiva immissione di nutrienti di provenienza materna.

Il *ritardato accrescimento tardivo* è un'altra complicanza antropometrica della gravidanza complicata da diabete, ma è associato per lo più a fenomeni di vasculopatia materna e quindi di insufficienza placentare, complicata o meno da gestosi.

Il neonato da madre diabetica può, inoltre, presentare tutta una serie di alterazioni dell'adattamento alla vita extrauterina come l'*ipoglicemia neonatale*, l'*ipocalcemia*, la *policitemia*, l'*iperbilirubinemia*, la *cardiomiopatia ipertrofica*, la *sindrome da distress respiratorio*.

L'*ipoglicemia neonatale* è, secondo l'American Accademy of Pediatrics quella condizione in cui il nato a termine presenta una glicemia ematica inferiore a 40 mg/dl (3, 4) e si riscontra nel 25-40% dei nati da madre diabetica. Questa condizione è sovente associata a una pronunciata iperglicemia materna durante il parto e si presenta nei neonati con ipertrofia delle cellule beta delle isole pancreatiche a cui improvvisamente viene a mancare il sovrabbondante apporto di glucosio attraverso la placenta durante la vita intrauterina.

L'*ipocalcemia*, situazione in cui la calcemia è inferiore a 7 mg/dl, compare in circa il 50% dei nati da madre diabetica. Verosimilmente tale condizione è dovuta a una ridistribuzione del calcio tra il compartimento extracellulare e quello intracellulare, in seguito ad un episodio di acidosi metabolica. Frequentemente l'ipocalcemia si associa a ipomagnesemia e a iperfosfatemia.

Il 30% dei nati da madre diabetica presenta *policitemia* definita da un ematocrito superiore al 65%, verosimilmente dovuto a un aumento di secrezione di eritropoietina conseguente a ripetuti episodi di ipossia endouterina. In rapporto alla policitemia o indipendentemente da essa, il 25% di questi neonati presenta *iperbilirubinemia*.

Un'altra complicanza è la *sindrome da distress respiratorio neonatale*, patologia caratterizzata dall'alterazione degli scambi alveolo-capillari secondario alla carenza di surfactante maturo. La carenza di sufactante è dovuta all'iperinsulinemia fetale.

Altra temibile complicanza legata al diabete pregravidico è la morte precoce e tardiva embrionale/fetale e la morte neonatale la cui frequenza è direttamente correlata al compenso glicemico materno (5).

3. La placenta umana

La placenta è l'organo di connessione materno fetale necessario per la respirazione, la nutrizione e la protezione autoimmunitaria del feto. La formazione della placenta inizia intorno al 10° giorno con lo sviluppo delle cellule trofoblastiche le quali invadendo i vasi uterini formano delle lacune ematiche; successivamente entro tali lacune si formeranno i villi coriali; infine si formeranno i vasi fetali placentari che favoriranno gli scambi materno-fetali.

Al termine della gravidanza, la placenta si presenta come un disco di 16-18 cm di diametro e di spessore al centro di 3-4 cm che si riduce nelle parti periferiche; il peso, di circa 600 gr, è direttamente proporzionale a quello del feto. La faccia materna (o uterina) appare di colore rosso-grigiastro con piccole macchie chiare disseminate e presenta dai 15 a 20 lobi o *cotiledoni*, tra loro divisi da solchi; dalla faccia fetale, rivestita dalla membrana amniotica, si diparte il cordone ombelicale nel cui spessore decorrono i vasi sanguiferi che collegano la circolazione materna a quella fetale. I vasi cordonali sono tre: due arterie che drenano il sangue venoso fetale e una vena che porta sangue arterioso dalla placenta al feto.

La placenta ha anche molteplici funzioni endocrine che consistono nell'elaborazione di ormoni di tipo gonadotropo, estrogeno e luteinico.

3a. Insulina e recettore insulinico

Il recettore dell'insulina esiste in due isoforme (IR-A e IR-B) generate da uno splicing alternativo dell'esone 11 del gene di IR: IR-A (che non ha l'esone 11) è l'isoforma prevalentemente espressa nella placenta e nei tessuti fetali (6)

Inoltre, nella placenta sono presenti recettori ibridi (etero-tetrameri), formati da un emi-recettore dell'insulina (in entrambe le isoforme) combinato con un emi-recettore dell'IGF-I (IR / IGF-IR) (7, 8, 9).

IGF-I può legarsi ai recettori ibridi con un'affinità simile a quella per IGF-IR (8, 9); mentre l'insulina, se è presente a elevate concentrazioni, può legare sia i recettori ibridi sia IGF-IR sebbene con minore affinità rispetto a IR.

L'espressione di IR placentare, a differenza dell'espressione di IGF-IR, ha una distribuzione spazio-temporale, cioè l'espressione cambia a seconda dell'epoca gestazionale: nel 1° trimestre è prevalentemente espresso nelle membrane del sinciziotrofoblasto, diretto alla circolazione materna, mentre nel 3° trimestre è prevalentemente espresso nell'endotelio placentare diretto alla circolazione fetale (10).

Le modifiche spazio-temporali di espressione di IR nella placenta fanno supporre che nel 1° trimestre di gravidanza i processi insulino-dipendenti siano influenzati prevalentemente dall'insulina materna,

mentre successivamente siano influenzati maggiormente dall'insulina fetale.

L'IR-A lega ad alta affinità non solo l'insulina ma anche l'IGF-II, importante fattore di crescita fetale (6, 11, 12).

Schematicamente vi sono due vie di trasduzione del segnale intracellulare a valle di IGF-IR e IR: la *via prevalentemente metabolica*, mediata dalla *fosfo-inositol-chinasi 3 (PI3-K)* e la *via prevalentemente mitogena*, mediata dalla *MAP-chinasi (MAPK)* (13).

Fisiologicamente nel trofoblasto IR attiva prevalentemente MAPK, mentre nell'endotelio è prevalentemente attivata PI3K/AKT (14).

In quasi tutte le cellule, l'attivazione delle due vie è regolata da una tirosin-fosfatasi SHP-2 (15) presente anche nelle cellule placentari che può regolare lo sviluppo fetale. Un'altra fosfatasi che sembra essere coinvolta nella regolazione e nello sviluppo placentare è la MPK-4 la quale regola l'attivazione della via MAPK modulando il segnale indotto dall'interazione dell'IGF con il suo recettore.

Da quanto detto si evince un'importante influenza dell'asse IGF nel regolare molti aspetti dello sviluppo placentare, anche se ulteriori studi sono necessari per ottenere una migliore comprensione di questo complesso sistema.

L'insulina inibisce la secrezione di hCG nel primo trimestre (16). Inoltre, l'insulina stimola espressione di alcune metalloproteinasi della matrice (MT1-MMP e MMP 14) (17), responsabili della migrazione cellulare e dell'invasione tissutale. In vivo, l'espressione MT1-MMP nel primo trimestre correla con l'insulina placentare materna nel diabete mellito di tipo 1. Ciò indica che i cambiamenti placentari morfologici e funzionali nel diabete pregravidico possono avere la loro origine già all'inizio della gravidanza (10).

E' stata osservata una maggiore crescita vascolare nella placenta delle donne con GDM (18) che potrebbe essere causata dall'iperinsulinemia fetale secondaria all'iperglicemia fetale. Ciò suggerisce il coinvolgimento dell'insulina nell'aumento dell'angiogenesi placentare (19).

I meccanismi con cui l'insulina influenza l'angiogenesi sono stati studiati in cellule endoteliali venose umane (20). L'insulina attiva l'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) che attiva un fattore inducibile dall'ipossia (HIF-1). HIF-1 regola l'espressione del fattore di crescita vasculo-endoteliale A (VEGF-A), un noto induttore dell'angiogenesi. Il recettore per VEGF (VEGF-R) è abbondantemente espresso nell'endotelio arterioso placentare (22).

L'insulina regola i processi metabolici; la sintesi del glicogeno nelle cellule endoteliali è sovra-regolata dall'insulina (22) pertanto il

glicogeno si deposita maggiormente intorno ai vasi placentari nelle donne con diabete (23). La funzione di questi depositi di glicogeno è sconosciuta, anche se si può ipotizzare che siano utili a fornire energia alle cellule endoteliali per gli scambi e la funzione contrattile.

3b. I fattori di crescita insulino-simili

I fattori di crescita insulino-simili, IGF-I e IGF-II, sono due polipeptidi a catena singola i quali presentano similitudini con la pro-insulina (24). Essi, insieme all'insulina, risultano essere i maggiori regolatori della placenta e della crescita fetale.

Le azioni di IGF-I e di IGF-II sono mediate principalmente dal legame con il recettore per IGF-I (IGF-IR); IGF-II si lega ad alta affinità anche con il recettore dell'insulina (isoforma A) che media quindi le azioni dell'insulina e di IGF-II.

L'interazione ligando-recettore è mediata da una famiglia di proteine leganti, chiamate IGF-binding proteins (IGFBP), che sono deputate al trasporto attraverso l'endotelio ai tessuti. Se ne conoscono sei tipi e sono prodotte principalmente dal fegato (24).

E' ormai chiaro che IGF-I e IGF-II, insieme a insulina, siano coinvolti nella mediazione della crescita, della differenziazione, della sopravvivenza, e del metabolismo di quasi ogni organo del corpo (25). Entrambi sono sintetizzati, oltre che dal fegato, dalla placenta e

dal feto. Negli ultimi anni, numerosi studi hanno evidenziato l'importanza questi ormoni per la crescita e lo sviluppo fetale; ad esempio la misurazione dei livelli di IGF-I nel sangue del cordone ombelicale di neonati sani ha dimostrato che il peso alla nascita è positivamente correlato con i livelli di IGF-I (26, 27). Inoltre i livelli di IGF-I sono risultati bassi nel cordone di neonati piccoli per età gestazionale (SGA) e aumentati in quello di neonati grandi per età gestazionale (LGA) (28). D'altra parte anche un elevato livello di IGFBP-1 circolante, con normale IGF-I, è sufficiente a determinare alterazioni della crescita fetale (29) e altre complicanze come la preeclampsia (26).

Un processo fondamentale regolato da IGF-I e IGF-II durante la gravidanza è il trasporto degli aminoacidi (30, 31, 32), in linea con il loro ruolo come fattori di crescita importanti per il feto. Nel GDM si osserva una maggiore sovra-regolazione dei trasportatori placentari di aminoacidi stimolati da IGF-I e IGF-II (30).

L'IGF-I e l'IGF-II inducono i loro effetti sulla proliferazione, differenziazione e sopravvivenza cellulare, principalmente legandosi e attivando il recettore IGF-IR. L'IGF-II attiva anche l'isoforma A del recettore dell'insulina IR-A (6, 11). L'attivazione determina prima auto-fosforilazione di residui tirosina nella subunità intracellulare del recettore e successivamente l'attivazione di vie di

segnalazione a valle (25). IGF-II si lega al recettore del mannosio 6 fosfato (IGF-IIR) che non ha attività tirosin-chinasica né una auto-fosforilazione del sito e pertanto sembra che la funzione primaria di questo recettore sia di eliminare l'IGF-II dalla circolazione ematica (33, 34).

Sembra quindi che la famiglia delle IGF abbia un ruolo nel turnover delle cellule della placenta.

IGF-I e IGF-II sono presenti in quasi tutti i tipi di cellule della placenta già a partire dalla 6ª settimana di gestazione (35) e sembrano essere coinvolti in quasi tutti gli aspetti dello sviluppo e della funzione placentare. Un recente lavoro mostra che entrambi migliorano la proliferazione e la sopravvivenza dei fibroblasti placentari (36). Anche IGF-IR è localizzato in tutti i tipi cellulari placentari (37, 38); questo suggerisce l'ipotesi che una riduzione del numero dei recettori per IGF-I placentari contribuisca al ritardo di crescita intrauterino (IUGR).

Il recettore per l'IGF-I presenta omologia strutturale con il recettore per l'insulina anch'esso espresso nella placenta.

3c. Effetti placentari dell'iperglicemia

I meccanismi alla base degli effetti regolatori della crescita placentare nell'iperglicemia non sono stati ancora ben chiariti. E' riportato in letteratura che la placenta delle donne diabetiche presenta delle alterazioni strutturali e funzionali (39) e che il sistema insulina/IGF ha un ruolo in queste alterazioni (10).

Il GDM e il diabete mellito di tipo 1 sono caratterizzati da una disregolazione di diversi fattori crescita con cambiamento dei loro livelli circolanti non solo nella madre, ma anche nel feto e nella placenta. Questi fattori includono: l'insulina, IGF-I, IGF-II, IGFBP1 e IGFBP3 (10). A tali alterazioni si possono aggiungere modifiche a carico dei recettori che riguardano l'espressione, l'attivazione, la trasduzione del segnale e l'affinità recettoriale (10). Tali modifiche potrebbero alterare il rilascio di nutrienti placentari al feto. I dati a proposito sono scarsi.

E' riportato che donne obese con GDM trattate solo con dieta hanno un numero di IR più alto a livello del trofoblasto di donne GDM trattate anche con insulina, anche se in modo non significativo (40).

E' inoltre riportato nelle placente a termine di donne con ipertensione gestazionale ed iperinsulinemiche, un ridotto legame recettoriale dell'insulina, un aumentato legame recettoriale di IGF-I, una ridotta affinità recettoriale di IR e IGF-IR, una maggiore espressione

dell'isoforma B del recettore insulinico (IR-B), un numero maggiore di recettori ibridi insulina/IGF-I rispetto alle donne con ipertensione gestazionale normoinsulinemiche e rispetto ai controlli (41).

In donne con diabete mellito tipo 1 è stata trovata anche una correlazione positiva tra livelli nel cordone ombelicale di IGFBP3 ed IGF-I e la macrosomia (42, 43). Inoltre, i valori di emoglobina glicata (HbA1c) della madre correlano con i livelli di IGF-I e IGF-II del cordone ombelicale, che a loro volta correlano con il peso alla nascita (44).

Quindi, la disregolazione dei fattori di crescita e dei loro recettori, quale può aversi in donne diabetiche, potrebbe essere responsabile dell'aumentata crescita della placenta e del feto, dell'ipervascolarizzazione placentare e di un alterato trasporto di nutrienti al feto (10).

Nonostante sia ormai consolidato in letteratura il ruolo di un buon compenso glico-metabolico (sia al momento del concepimento che durante la gravidanza) sugli outcome materno-fetali, è noto dalla esperienza clinica comune, come questi ultimi spesso non correlino perfettamente con la qualità del compenso glicemico materno. Ci sono donne diabetiche che mantengono per tutta la durata della gravidanza, un compenso glico-metabolico scadente e non sviluppano

complicanze materne e/o fetali/neonatali, come ad esempio la macrosomia. Viceversa donne, apparentemente ben compensate dal punto di vista metabolico, sviluppano macrosomia inaspettata. Alterazioni dell'espressione dei recettori dei fattori di crescita (insulina e IGF-I) e/o alterazioni post-recettoriali potrebbero avere un ruolo nelle suddette apparenti incongruenze cliniche.

A prescindere dal compenso glicemico, il Body Mass Index (BMI) pregravidico e l'incremento ponderale durante la gravidanza giocano un ruolo importante come fattori di rischio per una accelerata crescita fetale. Un ulteriore elemento di complessità è fornito dal possibile utilizzo in gravidanza di analoghi dell'insulina che sono molecole modificate in modo tale da ottenere, dopo iniezione nel sottocutaneo, gli effetti metabolici più rapidamente o più lentamente con conseguente migliore controllo metabolico. Nonostante l'insulina e i suoi analoghi non attraversino la placenta, giungono a livello placentare e ciò può determinare alterazioni strutturali e/o funzionali (quali modifiche dell'espressione dei fattori di crescita, alterazioni dell'angiogenesi, ecc.) che possono riflettersi sullo sviluppo fetale. E' stato inoltre riportato che in vitro gli analoghi ad azione prolungata (glargine e detemir) hanno un effetto mitogeno aumentato rispetto all'insulina e agli analoghi ad azione rapida (45, 46, 47, 48).

La placenta di donne diabetiche esposte a iperglicemia o ad insulina umana o ad analoghi dell'insulina può presentare un pattern di espressione di proteine diverso da quelle di placente di donne con un buon compenso glicemico o trattate solo con dieta. La diversa espressione di proteine può riguardare non solo i fattori del sistema IGF, ma anche i trasportatori del glucosio, i fattori dell'angiogenesi e i fattori di rimodellamento tissutale.

E' stato visto, in modello animale, che l'ambiente endouterino iperglicemico porta a una diminuzione della fosforilazione di ERK1/2 e di AKT durante lo sviluppo della placenta e questo potrebbe spiegare le anomalie dello sviluppo embrionale (49). Il diabete durante la gravidanza influenza le cellule Hofbauer, un sottotipo di macrofagi placentari, ad acquisire un fenotipo pro-infiammatorio (50). E' stata osservata un'alterazione a carico dei glicosaminoglicani nella matrice extracellulare della placenta di donne con diabete mellito gestazionale e nelle cellule trofoblastiche coltivate in condizioni di iperglicemia. Il trofoblasto è la prima linea cellulare che migra e si differenzia in vari tessuti come i vasi placentari e le membrane fetali pertanto tale alterazione può contribuire alla formazione di una struttura placentare aberrante che spiegherebbe, almeno in parte, le complicanze materne e fetali osservate nelle condizioni di iperglicemia (51).

La condizione di diabete in gravidanza è associata con una ridotta dilatazione endotelio-mediata delle arterie materne, sebbene i meccanismi cellulari sottostanti non siano noti. Nella placenta umana complicata da diabete mellito di tipo 1 si osserva un'aumentata angiogenesi dei vasi placentari (52, 53, 54, 55), dovuta ad un aumento dei livelli di VEGF-A e alla rottura delle giunzioni cellula-cellula (53, 54).

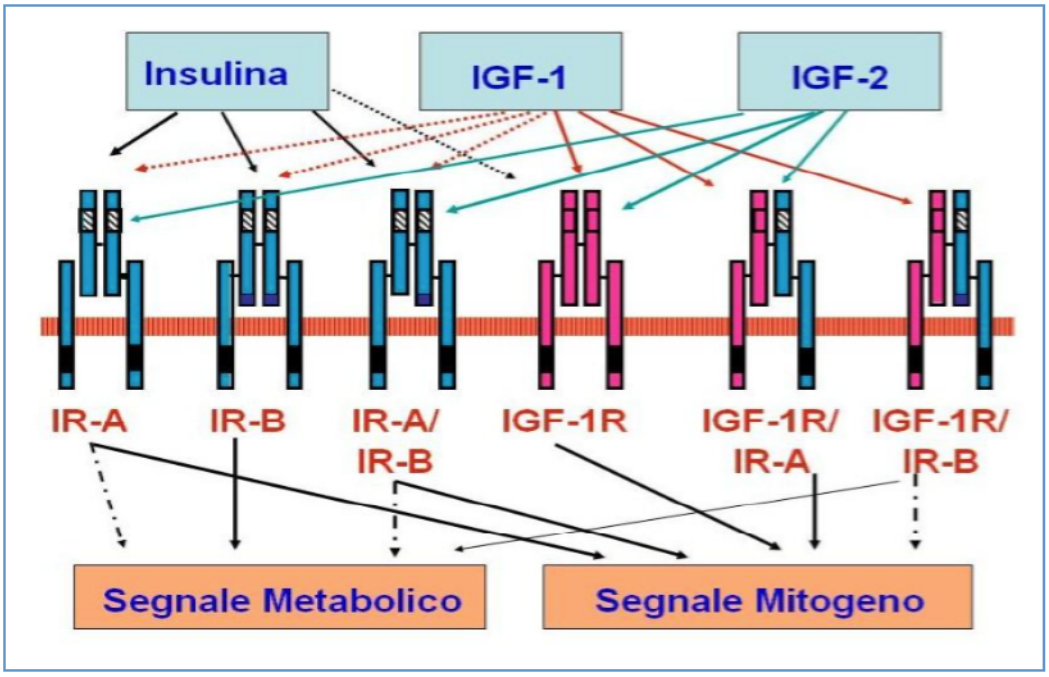

Figura 1. Schema rappresentativo del sistema insulina-IGF. La figura mostra le interazioni tra insulina, IGF-I e IGF-II e i recettori: dell'insulina (IR-A e IR- B), dell'IGF-I (IGF-IR) e ibridi (IR-A/IR-B, IGF-IR/IR-A e IGF-IR/IR-B) e le due vie di trasmissione del segnale a valle: l'**insulina** lega ad alta affinità IR-A, IR-B e i recettori ibridi IR-A/IR-B, mentre lega IGF-IR a bassa affinità. L'**IGF-I** lega ad alta affinità IGF-IR e i recettori ibridi IGF-IR/IR-A e IGF-IR/IR-B, mentre lega a bassa affinità IR-A, IR-B e i recettori ibridi IR-A/IR-B. L'**IGF-II** lega IR-A, IGF-IR e i recettori ibridi IRA/IR-B e IGF-IR/IR-A. IR-A, IGF-IR e i recettori ibridi IR-A/IR-B e IGF-IR/IR-A mediano prevalentemente effetti mitogeni. IR-B e i recettori ibridi IGF-IR/IR-B mediano prevalentemente effetti metabolici (56).

SCOPO DELLO STUDIO

Nelle donne diabetiche la placenta presenta delle alterazioni strutturali e funzionali potenzialmente correlabili a una disregolazione del sistema insulina/IGF che può essere responsabile di un alterato trasporto di nutrienti al feto e di un'aumentata crescita fetale. In queste donne la valutazione del sistema insulina/IGF placentare potrebbe, quindi, fornire importanti informazioni sui meccanismi delle complicanze fetali/neonatali e materne osservati e sulle patologie dell'età evolutiva/adulta dei bambini nati da madre diabetica. *Scopo dello studio è di valutare nella nostra casistica l'effetto del compenso glicemico sulla placenta in termini di espressione di IR, IGF-1R, correlandoli con il peso del neonato alla nascita*. Per questo scopo è stato necessario valutare il compenso glico-metabolico delle pazienti studiate dal momento del concepimento (per quelle affette da diabete mellito di tipo 1) o dal momento della diagnosi (per quelle affette da GDM) e per tutta la durata della gravidanza. E' stato inoltre effettuato lo studio della fosforilazione dei due tipi recettoriali e della trasmissione del segnale intracellulare tramite la fosforilazione di AKT (che media prevalentemente effetti metabolici) e la fosforilazione di ERK (che media prevalentemente effetti mitogeni).

MATERIALI E METODI

Sono state studiate donne in gravidanza suddivise in tre gruppi: donne con diabete mellito di tipo 1 (DMT1, n = 20) in trattamento insulinico multi-iniettivo o tramite microinfusore; donne con diabete gestazionale (GDM, n = 20); donne con gravidanza fisiologica come gruppo di controllo (GF, n = 40).

L'arruolamento è iniziato ad aprile 2012 ed è terminato a luglio 2016 in collaborazione con il reparto di Ginecologia e Ostetricia del nostro presidio ospedaliero (Ospedale Garibaldi-Nesima).

Per la diagnosi di GDM sono stati utilizzati i criteri IADPSG (International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups) (adottati dalla Società Italiana di Diabetologia e dall'Associazione Medici Diabetologi) (57, 58).

Tutte le pazienti con DMT1 sono state visitate ogni una o due settimane presso i nostri ambulatori per tutta la durata della gravidanza; alcune di queste hanno programmato la gravidanza pertanto sono state seguite anche prima del concepimento.

Tutte le pazienti con GDM sono state visitate ogni una o due settimane presso i nostri ambulatori dal primo accesso ambulatoriale (in genere alla diagnosi) fino alla fine della gravidanza.

Di tutte le gestanti, subito dopo il parto, sono stati raccolti i dati sull'esito della gravidanza ed è stata valutata l'eventuale presenza di complicanze materno-neonatali.

Le donne con gravidanza fisiologica sono state segnalate dall'U.O. di Ginecologia e Ostetricia. In esse è stata effettuata la valutazione anamnestica e delle complicanze materno-neonatali subito dopo il parto. Al momento del parto di tutte le donne dei tre gruppi è stato misurato il peso della placenta ed è stato prelevato un campione placentare di mm 10x10x10 dalla sede perifuniculare, privato della membrana amniotica.

A tutti i neonati è stata effettuata la valutazione auxologica in collaborazione con il reparto di Neonatologia del nostro presidio ospedaliero.

Nelle donne con DMT1 è stato valutato il compenso glicemico al momento del concepimento. Sulla base del valore di emoglobina glicata (HbA1c) peri-concepimento, è stato considerato buon compenso la presenza di valori di HbA1c < 7%, cattivo compenso la presenza di valori maggiori o uguali al 7%.

A tutte le donne è stata prescritta una dieta con apporto calorico e distribuzione di pasti secondo le raccomandazioni SID-AMD-ADI per l'alimentazione in gravidanza (58, 59).

Le donne con GDM che non hanno ottenuto un buon compenso glicemico con la terapia dietetica sono state trattate con analoghi dell'insulina a posologia e numero di somministrazioni variabili sulla base dei valori di glicemia capillare sia a digiuno sia postprandiali domiciliari.

Per quanto riguarda gli obiettivi glicemici nella gestione clinica della donna diabetica in gravidanza si fa ancora riferimento agli obiettivi indicati dall'American Diabetes Association (ADA) e fatti propri dalle maggiori società medico-scientifiche internazionali che sono i seguenti: a digiuno ≤ 95 mg/dl, 1 ora dopo il pasto ≤ 140 mg/dl, 2 ore dopo il pasto ≤ 120 mg/dl (su sangue capillare intero) (58, 60).

Per eliminare l'interferenza dell'obesità sull'interpretazione dei dati, sono state escluse le donne con BMI pregravidico ≥ 30 Kg/m^2.

In tutte le donne (gravidanza fisiologica, DMT1, GDM) arruolate sono stati valutati:

- Età;
- Peso pregravidico, altezza e BMI pregravidico;
- Incremento ponderale alla fine della gravidanza;
- Outcome materni (tipo di parto, eventuali complicanze);

- Outcome fetali (peso, lunghezza, indice ponderale, indice Apgar al 1° e al 5° minuto, complicanze neonatali, malformazioni).

La pressione arteriosa è stata controllata a ogni visita nelle pazienti con GDM e DMT1, mentre nelle donne con gravidanza fisiologica è stata esclusa anamnesticamente la presenza di ipertensione sia gestazionale che essenziale (pregravidica).

Per valutare la crescita staturo-ponderale fetale è stato utilizzato l'indice ponderale del Rohrer (peso alla nascita / altezza in cm^3 × 100). Il range di normalità va da 2.32 e 2.85 gr/cm^3. Valori ≥ 2.85 gr/cm^3 a termine indicano una crescita fetale aumentata in modo disarmonico con prevalente crescita in peso rispetto alla lunghezza.

Nelle donne con DMT1 è stato inoltre valutato:

- Il compenso glicemico al momento del concepimento (programmazione o meno della gravidanza) e in ogni trimestre, valutato come media di HbA1c e delle glicemie capillari domiciliari;
- La glicemia media alla 28ª settimana di gestazione, la glicemia media dell'ultimo controllo diabetologico e la glicemia media entro 6 ore dal parto.

- Lo stato della nefropatia e retinopatia diabetica in gravidanza;
- La crescita fetale (ecografia fetale morfologica e di accrescimento) e la flussimetria (indici di resistenza e di pulsatilità a livello di arterie ombelicali e uterine).

Nelle donne con GDM è stato inoltre valutato:

- Il compenso glicemico dal momento della diagnosi per tutta la gravidanza, valutato come media di HbA1c e delle glicemie capillari domiciliari;
- La glicemia media alla 28ª settimana di gestazione, la glicemia media dell'ultimo controllo, la glicemia media entro 6 ore dal parto.
- La necessità o meno di terapia insulinica per il mantenimento di un buon compenso glicemico durante la gravidanza;
- La crescita fetale (ecografia fetale morfologica e di accrescimento).

E' stato scelto di valutare la media giornaliera della glicemia capillare alla 28ª settimana di gestazione perché in media le donne GDM sono da noi visitate intorno a questa epoca e quindi è la prima valutazione che possiamo avere del compenso glicemico. Abbiamo così voluto analizzare se in tale epoca gestazionale precoce i valori glicemici

fossero in grado di influenzare, nelle placente a termine, l'espressione di IR, IGF-IR, la loro fosforilazione nonché l'espressione di ERK, e di AKT.

Preparazione campioni di tessuto placentare

I campioni di tessuto placentare sono stati prelevati subito dopo il secondamento dalla zona perifuniculare fetale, tagliati in piccoli pezzi (circa 1 cm^3) ed immediatamente congelati a -80 ° C.

Il tessuto placentare congelato è stato successivamente omogeneizzato con il Mikro Dismembrator U (B. Braun - Biotech International GmbH, Germania). Il tessuto, contenuto in apposite capsule, è stato mantenuto sempre congelato tramite azoto liquido. Il tessuto omogeneizzato è stato lisato in tampone di lisi contenente 50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10 mM fluoruro di sodio, 10% glicerolo, 1 mM MgCl2, 1 mM CaCl2, 2 mM PMSF, 2 mM sodio ortovanadato, 5 µg/ml Leupeptina, 5.9 µg/ml Aprotinina, Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Germania). Il lisato è stato incubato per un'ora a 4°C in rotazione continua e poi centrifugato a 14.000 g per 60 minuti. Il surnatante risultante è stato raccolto ed analizzato per quantizzare la concentrazione proteica con il metodo colorimetrico Bradford mediante lettura spettrofotometrica

a 595 nm (BioRad, Hercules, CA, USA), utilizzando l'albumina sierica bovina (BSA) come standard.

Espressione di IR, IGF-IR, ERK, AKT e fosforilazione di ERK e AKT

L'espressione delle proteine IR, IGF-IR, ERK, AKT e la fosforilazione di ERK e AKT è stata valutata tramite la metodica western blotting. Per valutare ciascuna proteina sono stati caricati 40 μg di proteine totali. L'elettroforesi, su gel di policrilamide a gradiente, è stata condotta a 200 V. Dopo la separazione tramite elettroforesi, le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa. Il trasferimento è avvenuto a 400 mA per un'ora. La membrana è stata incubata un'ora a temperatura ambiente in una soluzione 5% di latte in polvere disciolto in Tris-Buffered Saline e Tween 20 (TBST), per saturare i siti di legami aspecifici. Successivamente, la membrana è stata incubata 16-18 ore con l'anticorpo primario di interesse in particolare sono stati utilizzati anticorpi anti-IGF-IR subunità beta, anti-Akt, anti-fosfo-Akt (Ser473), anti-Erk1/2 p44/42 (extra-cellular signal- regulated kinase), anti-fosfo-Erk1/2 p44/42 (Cell Signaling Technology, Inc. Beverly, MA, USA). Per IR è stato utilizzato un anticorpo anti-IR subunità beta della Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

Dopo gli opportuni lavaggi con TBST è stato aggiunto l'anticorpo secondario coniugato con horseradish peroxidase (HRP). Le proteine sono state rivelate tramite chemiluminescenza.

Il segnale presente nelle lastre è stato quantificato mediante analisi densitometrica utilizzando il software ImageJ (1,42 q, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). L'analisi densitometrica è stata espressa in Unità Arbitrarie.

Le proteine IR, IGF-IR, ERK e AKT sono state normalizzate per contenuto totale di actina, invece la fosforilazione di ERK e AKT è stata normalizzata sul contenuto delle rispettive proteine.

Fosforilazione di IR e IGF-IR

Il lisato placentare, ottenuto come precedentemente indicato, è stato immunoprecipitato per valutare la fosforilazione di IR e IGF-IR. Brevemente, 1 mg di proteine lisate è stato incubato a 4°C in rotazione continua con l'anticorpo MA20 per IR oppure l'anticorpo AlphaIR3 per IGF-IR, preadsorbiti con proteina G per due ore a 4°C. Gli immunoprecipitati così ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica (SDS-PAGE) e trattati come descritto precedentemente. Per la rilevazione delle proteine fosforilate di interesse è stato utilizzato l'anticorpo primario monoclonale anti-fosfotirosina 4G10 (Lake Placid, NY, USA). Dopo gli opportuni

lavaggi con TBST è stato aggiunto l'anticorpo secondario HRP-coniugato. Le proteine sono state evidenziate tramite chemiluminescenza. La fosforilazione di IR e IGF-IR è stata normalizzata sul contenuto totale delle rispettive proteine.

Estrazione dell'RNA messaggero e RT-PCR delle isoforme del recettore insulinico

L'mRNA presente nel tessuto placentare congelato è stato successivamente estratto con 1 ml di TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) tramite lo strumento gentleMACSTM Dissociator (Miltenyi Biotec, Germany), utilizzando gli M-Tubes forniti dalla medesima ditta. Due mcg di RNA sono stati retrotrascritti in cDNA utilizzando il kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Il cDNA ottenuto è stato amplificato tramite metodica PCR utilizzando dei primer specifici rivolti verso l'isoforma A o B del recettore dell'insulina. L'intensità del segnale è stata quantificata tramite analisi densitometrica utilizzando il programma ImageJ (1.42 q, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Per ogni campione è stata calcolata la percentuale di espressione delle due isoforme del recettore insulinico.

Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il test ANOVA a una via per i dati quantitativi, il test Chi-quadrato di Pearson per i dati quantitativi, il test della regressione lineare o logistica per la correlazione tra due variabili (con outcome continuo o dicotomico, rispettivamente) e il test t di Student per il confronto tra due gruppi.

I dati quantitativi sono espressi come media ± deviazione standard (DS), quelli qualitativi come percentuale (%) sul totale. E' stato considerato significativo un valore di $p < 0.05$.

RISULTATI

Il nostro campione presenta un'età media di 27.2 ± 6.5 anni nel gruppo DMT1, di 33.6 ± 4.9 anni nel gruppo GDM e di 32.4 ± 6.2 anni nel gruppo gravidanza fisiologica, con una differenza significativa tra i tre gruppi ($p < 0.01$), per tale motivo l'analisi statistica è stata corretta per età.

Il BMI pregravidico è risultato di 24.3 ± 3.0 Kg/m^2 nel gruppo DMT1, di 24.1 ± 3.2 Kg/m^2 nel gruppo GDM e di 21.5 ± 3.2 Kg/m^2 nel gruppo delle gravidanze fisiologiche. Tutti e tre i valori depongono per una condizione di normopeso; ciononostante è presente una differenza significativa del BMI tra il gruppo delle gravidanze fisiologiche e gli altri due gruppi di pazienti ($p < 0.01$). Per tale motivo l'analisi statistica è stata corretta per BMI pregravidico.

L'epoca gestazionale media del parto è risultata significativamente minore nel gruppo DMT1 (37 ± 2 settimane), rispetto al gruppo GDM (38 ± 1 settimana) e al gruppo gravidanza fisiologica (39 ± 1 settimana) ($p < 0.05$). Pertanto i dati clinici, che potevano essere influenzati da tale differenza nell'analisi statistica (peso del neonato, indice ponderale del neonato, indice di Apgar al 1° e al 5° minuto,

peso della placenta), sono stati corretti per settimana gestazionale del parto.

La pressione arteriosa sistolica media è risultata simile nei tre gruppi (DMT1, GDM, gravidanza fisiologica: 108 ± 8, 110 ± 12, 115 ± 9 mmHg, rispettivamente). Anche la pressione arteriosa diastolica media è risultata simile nei tre gruppi (DMT1, GDM, gravidanza fisiologica: 66 ± 7, 68 ± 6, 70 ± 8 mmHg, rispettivamente).

***Compenso glico-metabolico pregravidico**:* sei pazienti con DMT1 su 20 (30.0%) mostravano un discreto compenso glicemico al momento del concepimento (HbA1c < 7%). Le restanti 14 pazienti (70.0%), invece, non avendo programmato la gravidanza, mostravano un valore di HbA1c ≥ 7% nel periodo peri-concepimento. Questo dato indica la necessità di implementare l'educazione terapeutica, al fine di ottenere una più efficace programmazione di gravidanza nelle donne con diabete pregravidico. Non è stata effettuata un'analisi dei dati dei due sottogruppi (donne che hanno programmato vs. donne che non hanno programmato la gravidanza) perché non sarebbero stati omogenei dal punto di vista numerico.

***Terapia praticata**:* l'85.0% (N = 17) delle pazienti con DMT1 praticava terapia insulinica multi-iniettiva, mentre il 15.0% (N = 3)

praticava terapia insulinica sottocutanea continua mediante microinfusore. Per quanto riguarda le pazienti con GDM, il 45% (N = 9) ha praticato terapia dietetica in gravidanza, mentre il 55% (N = 11) ha necessitato anche della terapia insulinica. E' stato effettuato un confronto tra questi due sottogruppi tramite il test t di Student per quanto riguarda l'espressione di IR, IGF-IR, ERK, AKT e la loro fosforilazione, ma non sono state trovate differenze significative.

Compenso glico-metabolico in gravidanza: le pazienti con DMT1 hanno mostrato, rispetto al gruppo GDM, una più elevata glicemia media alla 28ª settimana gestazionale (129 ± 26 mg/dl vs. 110 ± 13 mg/dl, $p < 0.05$), una più elevata glicemia media peri-parto (123 ± 47 mg/dl vs. 87 ± 14 mg/dl, $p < 0.01$), valori di HbA1c del terzo trimestre più elevati (6.5% ± 0.7 vs. 5.7% ± 0.2, $p < 0.01$), così come anche una glicemia media a digiuno del terzo trimestre più elevata (108 ± 20 mg/dl vs. 87 ± 10 mg/dl, $p < 0.01$).

La glicemia media capillare dell'ultimo controllo ambulatoriale, corretta per settimana gestazionale in cui è stato effettuato l'ultimo controllo ambulatoriale, è risultata non dissimile nei due gruppi: 115 ± 18 mg/dl nel gruppo DMT1 e 107 ± 14 mg/dl nel gruppo GDM. L'ultimo controllo ambulatoriale è avvenuto in media tra la 35ª e la 36ª settimana gestazionale.

Incremento ponderale delle gestanti al termine della gravidanza: l'incremento ponderale medio a termine della gravidanza è stato 14.3 ± 5.4 kg nelle pazienti con DMT1, 12.6 ± 3.5 kg nelle pazienti con GDM, 11.8 ± 4.4 kg nelle pazienti con gravidanza fisiologica (la differenza tra DMT1 e gravidanza fisiologica è risultata statisticamente significativa, $p < 0.05$).

Tipo di parto: il 70.0% delle pazienti con DMT1 (14 su 20) ha partorito con taglio cesareo. Tale percentuale è risultata notevolmente più elevata rispetto al gruppo delle pazienti con gravidanza fisiologica (35%) e al gruppo delle pazienti con GDM (45%), con una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$).

Indici antropometrici neonatali: l'indice ponderale medio dei bambini nati da madri con DMT1 (2.82 ± 0.5 gr/cm^3) è risultato significativamente più elevato rispetto all'indice ponderale medio dei bambini nati da madri normo-tolleranti (2.62 ± 0.2 gr/cm^3) e a quello dei bambini nati da madri con GDM (2.55 ± 0.2 gr/cm^3). Tale risultato potrebbe essere messo in relazione al peggiore compenso glico-metabolico delle donne con DMT1 durante la gravidanza, rispetto agli altri due gruppi.

Il peso dei neonati, corretto per settimana gestazionale del parto è risultato significativamente maggiore nel gruppo con DMT1, rispetto al gruppo GDM e al gruppo gravidanza fisiologica (3451 ± 820 vs. 3269 ± 527 vs. 3270 ± 359 gr rispettivamente, $p < 0.01$).

La lunghezza media dei neonati è risultata di 49.4 ± 2.0 cm nel gruppo DMT1, di 50.4 ± 2.1 cm nel gruppo GDM e di 50.1 ± 1.3 cm nel gruppo gravidanza fisiologica (differenze non statisticamente significative).

Il peso medio della placenta è risultato simile nei tre gruppi in particolare 549 ± 103 g nel gruppo DMT1, 593 ± 162 g nel gruppo GDM e 562 ± 91 g nel gruppo gravidanza fisiologica.

***Complicanze neonatali**:* nelle pazienti con DMT1 le complicanze neonatali più frequenti sono state la macrosomia fetale o la nascita di neonati *Large For Gestational Age (LGA)* (50.0%) e l'ipoglicemia neonatale (15.0%). La percentuale di macrosomia/LGA è invece risultata del 10% nelle gravidanze da madri con GDM e del 2.5% nelle gravidanze fisiologiche (percentuali significativamente più basse rispetto al gruppo DMT1). È utile ricordare che i dati di letteratura relativi alla gravidanza fisiologica danno una percentuale di macrosomia compresa tra il 5 e il 10% (61).

La percentuale di *prematurità* (intesa come parto espletato tra la 34ª e la 37ª settimana gestazionale) nelle pazienti con gravidanza fisiologica e nelle pazienti con GDM è stata rispettivamente del 2.5% e del 5%. Più elevata è stata invece la percentuale di prematurità riscontrata nel gruppo di donne DMT1 (25%) con una differenza statisticamente significativa ($p < 0.01$).

Nella nostra casistica si sono osservati solo due casi di neonati piccoli per epoca gestazionale (*Small for Gestational Age, SGA*): uno nel gruppo DMT1 e uno nel gruppo GDM. Una paziente con DMT1 ha partorito un neonato che ha avuto *distocia della spalla* (il neonato era LGA e la paziente non aveva programmato la gravidanza).

Nel gruppo delle gravidanze fisiologiche si è osservato un caso di labiopalatoschisi, nel gruppo GDM un caso di atresia intestinale, nel gruppo DMT1 un caso di labiopalatoschisi e un caso di trasposizione dei grossi vasi (in entrambi i casi, l'HbA1c al momento del concepimento era > 7%).

***Indici APGAR**:* non sono state riscontrate differenze statisticamente significative per quanto riguarda gli indici APGAR dei neonati da madri con DMT1, GDM o normotolleranti.

Complicanze microvascolari insorte in gravidanza: 3/20 delle pazienti con DMT1 (15%) presentava *nefropatia diabetica* (microalbuminuria con filtrato glomerulare conservato) prima della gravidanza; solo una delle 17 rimanenti ha sviluppato microalbuminuria durante la gravidanza; 5/20 delle pazienti con DMT1 (25%) presentavano *retinopatia diabetica non proliferante (da lieve a moderata)* prima della gravidanza, mentre 2 hanno sviluppato tale complicanza durante la gravidanza (forma non proliferante lieve). Non è stata osservata progressione della retinopatia e/o nefropatia preesistenti.

Altre complicanze materne: è stato registrato un solo caso di pre-eclampsia in una paziente con GDM. Non sono state riscontrate altre complicanze materne.

DIAGNOSI	FISIOLOGICHE	GDM	DMT1	P
ETA' (anni)	32.4 ± 6.2	33.6 ± 4.9	27.2 ± 6.5	**<0.01**
BMI PREGRAVIDICO (Kg/m^2)	21.5 ± 3.2	24.1 ± 3.2	24.3 ± 3.0	**<0.01**
PRESSIONE ARTERIOSA MASSIMA (mmHg)	115 ± 9	110 ± 12	108 ± 8	NS
PRESSIONE ARTERIOSA MINIMA (mmHg)	70 ± 8	68 ± 6	66 ± 7	NS
SETTIMANA GESTAZIONALE DEL PARTO	39 ± 1	38 ± 1	37 ± 2	**<0.05**
TAGLIO CESAREO (%)	35.0 (14/40)	45.0 (9/20)	70.0 (14/20)	**<0.05**
PESO NEONATO (gr)	3270 ± 359	3269 ± 527	3451 ± 820	**<0.01**
IPOGLICEMIA NEONATALE (%)	2.5 (1/40)	5 (1/20)	15.0 (3/20)	NS
INCREMENTO PONDERALE MATERNO (Kg)	11.8 ± 4.4	12.6 ± 3.5	14.3 ± 5.4	**<0.05**
MACROSOMIA + LGA (%)	2.5 (1/40)	10 (2/20)	50 (10/20)	**<0.01**
PREMATURITA' (%)	2.5 (1/40)	5 (1/20)	25.0 (5/20)	**<0.01**
LUNGHEZZA NEONATO (cm)	50.1 ± 1.3	50.4 ± 2.1	49.4 ± 2.0	NS
INDICE APGAR 1° MINUTO	8.9 ± 0.6	8.5 ± 1.0	8.3 ± 0.9	NS
INDICE APGAR 5° MINUTO	9.8 ± 0.5	9.6 ± 0.6	9.5 ± 0.8	NS
INDICE PONDERALE (gr/cm^3)	2.62 ± 0.2	2.55 ± 0.2	2.82 ± 0.5	**<0.05**
PESO PLACENTA (gr)	562 ± 91	593 ± 162	549 ± 103	NS
GLICEMIA MEDIA ULTIMO CONTROLLO (mg/dl)		107.1 ± 14.4	114.6 ± 18.7	NS
GLICEMIA 28ª SETTIMANA GESTAZIONALE (mg/dl)		109.8 ± 12.8	128.4 ± 26.1	**<0.05**
GLICEMIA MEDIA PERI-PARTO (mg/dl)		87.54 ± 14.4	122.6 ± 47.3	**<0.01**
SETTIMANA GESTAZIONALE ULTIMO CONTROLLO		36.2 ± 1.3	36.2 ± 1.3	NS
HbA1c III TRIMESTRE (%)		6.5 ± 0.7	5.7 ± 0.2	**<0.05**
GLICEMIA MEDIA A DIGIUNO III TRIMESTRE (mg/dl)		107.8 ± 19.9	86.8 ± 10.2	**<0.01**

Tabella 1. Caratteristiche dei tre gruppi di pazienti studiate. Dati espressi come media ± deviazione standard o come percentuale.

Risultati in vitro

Di seguito i risultati in vitro dell'espressione e della fosforilazione di IR, IGF-IR, ERK e AKT nei tre gruppi di donne studiate (Figura 2).

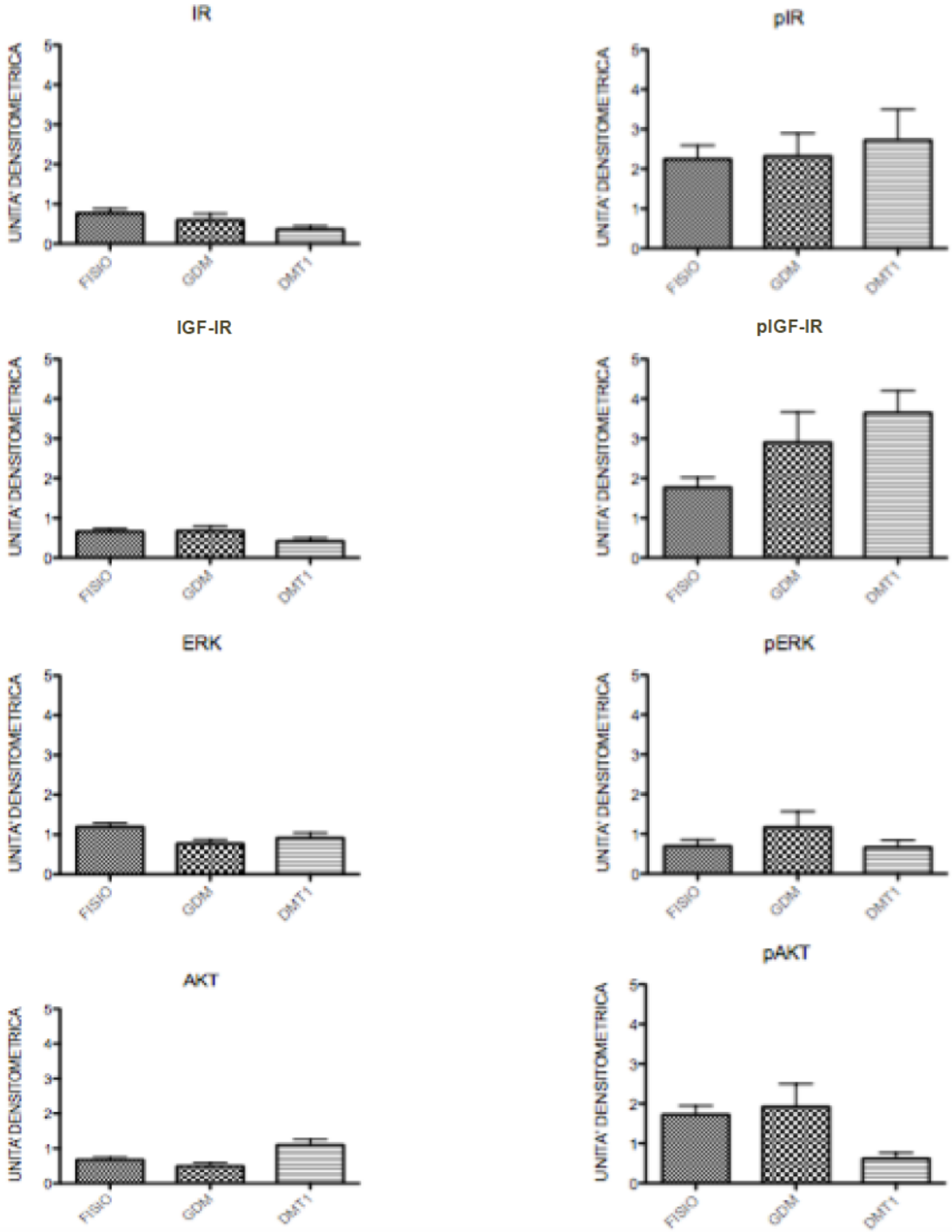

Figura 2. Risultati densitometrici dell'espressione di IR, IGF-IR, ERK e AKT e della fosforilazione di IR, IGF-IR, ERK e AKT nei tre gruppi.

L'analisi statistica ANOVA dei dati densitometrici, corretta per età, sesso, BMI pregravidico e settimana gestazionale del parto ha mostrato una minore espressione di IGF-IR ed una sua maggiore fosforilazione nel gruppo di donne DMT1 rispetto agli altri due gruppi ($p < 0.05$). Tale differenza significativa, però, viene meno se si corregge il dato statistico anche per il valore medio della glicemia peri-partum (Tabella 2). Inoltre, l'espressione di AKT è risultata significativamente maggiore nel gruppo di donne DMT1 ($p < 0.01$), mentre la sua fosforilazione ha mostrato valori significativamente più bassi ($P < 0.05$) rispetto agli altri due gruppi. A differenza di ciò che accade per l'espressione di IGF-IR e la sua fosforilazione, però, tali differenze permangono anche se il dato statistico viene corretto per la glicemia peri-partum (Tabella 2)

A prescindere dalla diagnosi è stato valutato se vi erano differenze significative tra le gravidanze complicate da *macrosomia o LGA* rispetto alle altre, nell'espressione di IR, IGF-IR, ERK e AKT e nella loro fosforilazione. In questo caso abbiamo riscontrato che l'espressione di AKT nel gruppo delle gravidanze complicate da macrosomia era significativamente maggiore rispetto alle gravidanze non complicate da macrosomia o LGA (Tabella 2).

A prescindere dalla diagnosi è stato, infine, valutato se vi erano differenze significative nell'espressione di IR, IGF-IR, ERK e AKT e

nella loro fosforilazione tra le donne con glicemia peri-parto (entro 6 ore dal parto) ≥120 mg/dl rispetto a quelle con glicemia peri-parto <120 mg/dl. I risultati della Tabella 2 mostrano che la fosforilazione di IGF-IR è significativamente maggiore nel gruppo di donne con glicemia peri-parto ≥120 mg/dl ($p < 0.01$).

	FISIOLOGICHE (N = 40)	GDM (N = 20)	DMT1 (N = 20)	P (corretto per età, BMI pre-, S.G. parto)	P (corretto per età, BMI pre-, S.G. parto, glic peri-partum)
IR	0.77 ± 0.1	0.60 ± 0.2	0.37 ± 0.1	0.12	0.79
pIR	2.25 ± 0.3	2.32 ± 0.6	2.72 ± 0.8	0.67	0.88
IGF-IR	0.66 ± 0.1	0.68 ± 0.1	0.42 ± 0.1	**0.03***	0.50
pIGF-IR	1.77 ± 0.2	2.90 ± 0.8	3.64 ± 0.6	**0.03***	0.49
AKT	0.68 ± 0.1	0.49 ± 0.1	1.10 ± 0.2	**0.008*,****	**0.004****
pAKT	1.72 ± 0.2	1.92 ± 0.6	0.60 ± 0.1	**0.04*,****	**0.03****
ERK	1.19 ± 0.1	0.77 ± 0.1	0.91 ± 0.1	0.09	0.67
pERK	0.69 ± 0.2	1.17 ± 0.4	0.67 ± 0.2	0.39	0.61

	MACROSOMIA NO	MACROSOMIA SI	
IR	0.68 ± 0.7	0.37 ± 0.1	0.11
pIR	2.24 ± 0.3	3.15 ± 1.1	0.26
IGF-IR	0.63 ± 0.5	0.45 ± 0.4	0.08
pIGF-IR	2.36 ± 1.4	3.35 ± 1.6	0.08
AKT	0.68 ± 0.5	1.01 ± 0.6	**0.04**
pAKT	1.63 ± 1.8	0.77 ± 0.8	0.11
ERK	1.02 ± 0.6	0.99 ± 0.6	0.74
pERK	0.83 ± 1.3	0.67 ± 0.7	0.85

	GLICEMIA PERIPARTUM < 120 mg/dl	GLICEMIA PERIPARTUM ≥ 120 mg/dl		
IR	0.62 ± 0.6	0.46 ± 0.4	0.98	
pIR	2.26 ± 2.4	2.35 ± 2.7	0.78	
IGF-IR	0.60 ± 0.5	0.39 ± 0.4	0.15	
pIGF-IR	2.14 ± 0.2	4.48 ± 0.9	**0.006**	
AKT	0.78 ± 0.1	1.00 ± 0.2	0.40	
pAKT	1.62 ± 0.2	0.70 ± 0.2	0.23	* DMT1 vs. FISIOLOGICHE
ERK	1.07 ± 0.6	0.85 ± 0.5	0.87	
pERK	0.75 ± 1.2	0.97 ± 0.9	0.22	** DMT1 vs. GDM

Tabella 2. Risultati densitometrici dell'espressione di IR, IGF-IR, ERK e AKT e della loro fosforilazione corretti per i possibili fattori confondenti.

Isoforme del recettore insulinico

È stata effettuata, inoltre, la valutazione delle isoforme del recettore insulinico (IR-A e IR-B) in un campione di 12 donne scelte random dalla popolazione di pazienti studiate (4 pazienti con gravidanza fisiologica, 4 con GDM e 4 con DMT1). Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nella percentuale di espressione delle due isoforme del recettore insulinico nei tre gruppi. L'espressione di IR-A è risultata pari a 74.3% ± 8.5 nel gruppo gravidanza fisiologica, 77.4% ± 9.8 nel gruppo GDM e 73.9% ± 12.2, nel gruppo DMT1; p= 0.9) Figura 2). E' prevalentemente espressa nelle placente delle donne studiate l'isofoma A.

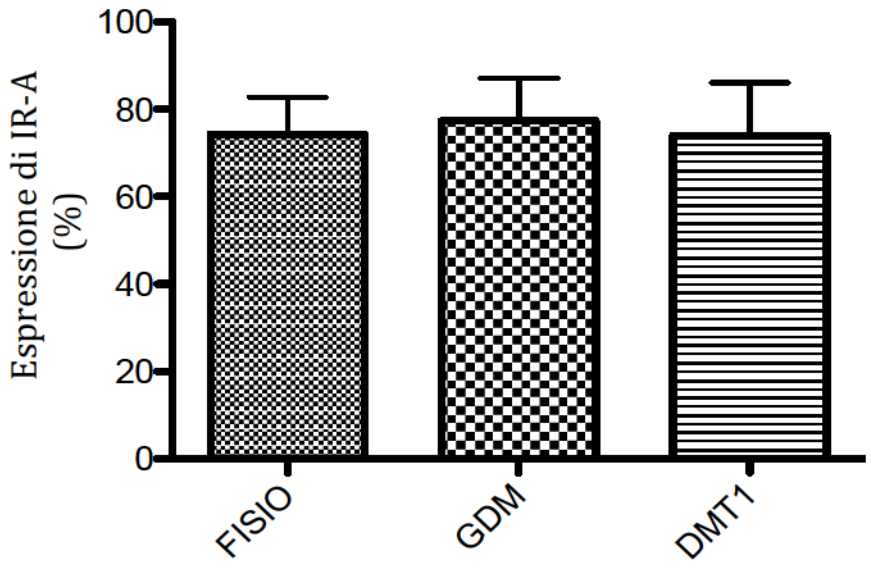

Figura 3. Percentuale di espressione dell'isoforma A (IR-A) del recettore insulinico nei tre gruppi di donne (gravidanza fisiologica, GDM, DMT1).

Analisi statistica di regressione lineare

A prescindere dalla diagnosi e quindi senza fare la distinzione dei tre gruppi è stata effettuata la correlazione tra le diverse variabili nei 3 gruppi. Applicando l'analisi statistica della regressione lineare si è osservato che il *peso del neonato* correla positivamente con l'emoglobina glicata del III trimestre ($p < 0.05$), con l'incremento ponderale della gestante a termine della gravidanza ($p < 0.05$), con il peso della placenta ($p < 0.01$) e correla negativamente con la glicemia peri-parto ($p < 0.05$). Invece non correla con l'espressione di IR, IGF-IR, ERK e AKT e con la loro fosforilazione (Figura 4).

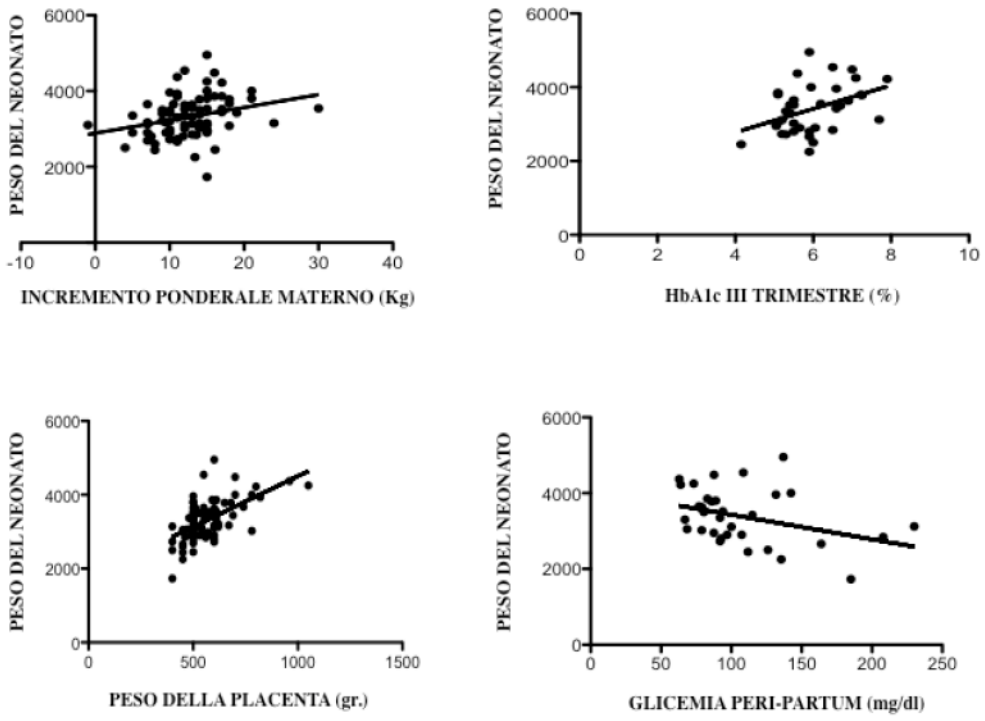

Figura 4. Correlazione tra il peso del neonato e l'incremento ponderale materno, l'HbA1c del III trimestre, il peso della placenta e la glicemia peri-partum.

L'indice ponderale del neonato correla positivamente con l'HbA1c del III trimestre ($p < 0.01$) e con il peso della placenta ($p < 0.01$), invece non correla con l'espressione di IR, IGF-IR, ERK e AKT e con la loro fosforilazione (Figura 5).

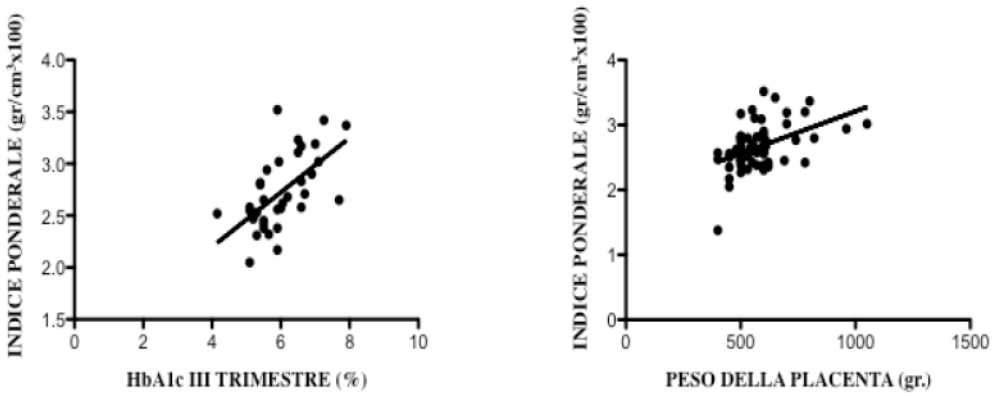

Figura 5. Correlazione tra l'indice ponderale del neonato, l'HbA1c del III trimestre e il peso della placenta.

Il peso della placenta correla positivamente con il peso del neonato ($p < 0.01$), con l'indice ponderale del neonato ($p < 0.01$), con l'emoglobina glicata peri-concepimento ($p < 0.05$), con l'HbA1c del I trimestre ($p < 0.05$), con l'HbA1c del III trimestre ($p < 0.05$); infine il peso della placenta correla negativamente con la glicemia peri-parto ($p < 0.05$), mentre non correla con l'espressione di IR, IGF-IR, ERK, AKT e con la loro fosforilazione (Figura 6).

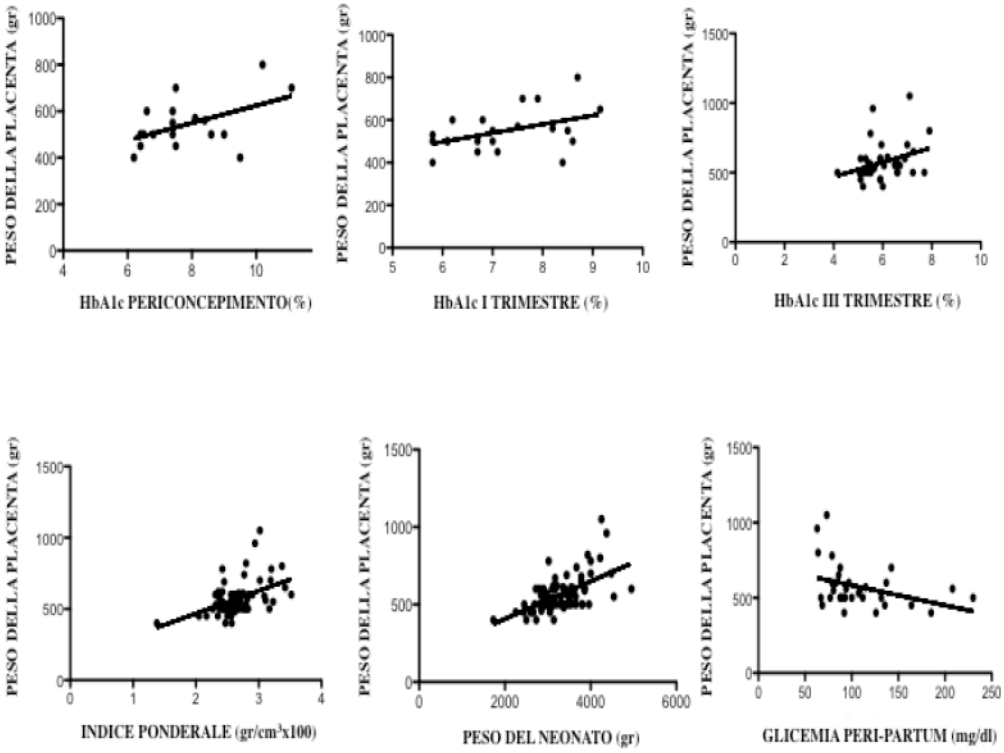

Figura 6. Correlazione tra peso della placenta e: HbA1c peri-concepimento, HbA1c I trimestre, HbA1c III trimestre, Indice ponderale del neonato, peso del neonato, glicemia peri-partum.

Inoltre, l'HbA1c peri-concepimento correla positivamente col peso placenta ($p < 0.05$) e correla inversamente con pAKT ($p < 0.05$) (Figura 7).

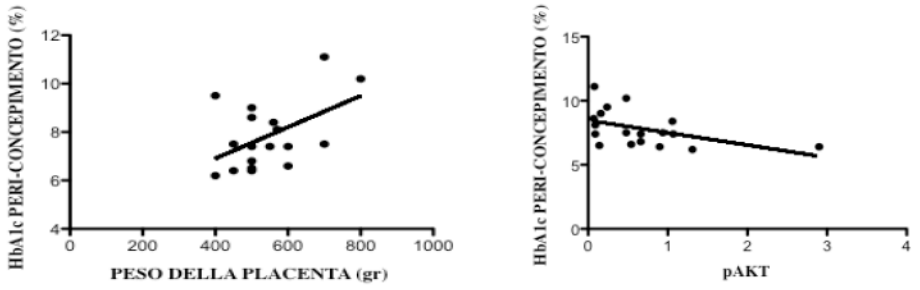

Figura 7. Correlazione tra HbA1c peri-concepimento e: peso della placenta, pAKT.

L'emoglobina glicata del I trimestre correla solo col peso placenta ($p < 0.05$) (Figura 8)

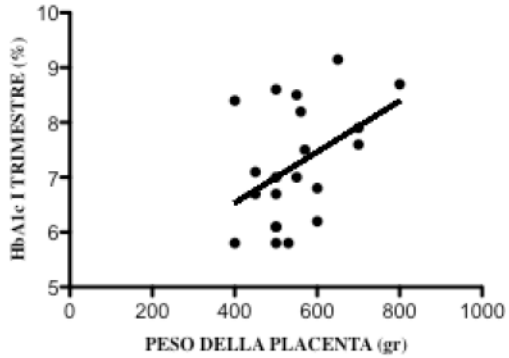

Figura 8. Correlazione tra HbA1c del I trimestre e peso della placenta.

L'HbA1c del II trimestre correla solo con l'espressione di AKT ($p< 0.05$) (Figura 9).

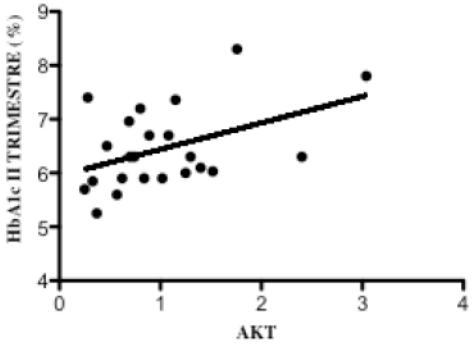

Figura 9. Correlazione tra HbA1c del II trimestre e l'espressione di AKT.

L'HbA1c del III trimestre correla con il peso del neonato ($p < 0.05$), con l'indice ponderale ($p < 0.01$), con il peso della placenta ($p< 0.05$), con AKT ($p < 0.05$), con la glicemia media dell'ultimo controllo ($p< 0.01$) e con la glicemia media alla 28ª settimana gestazionale ($p< 0.01$) (Figura 10).

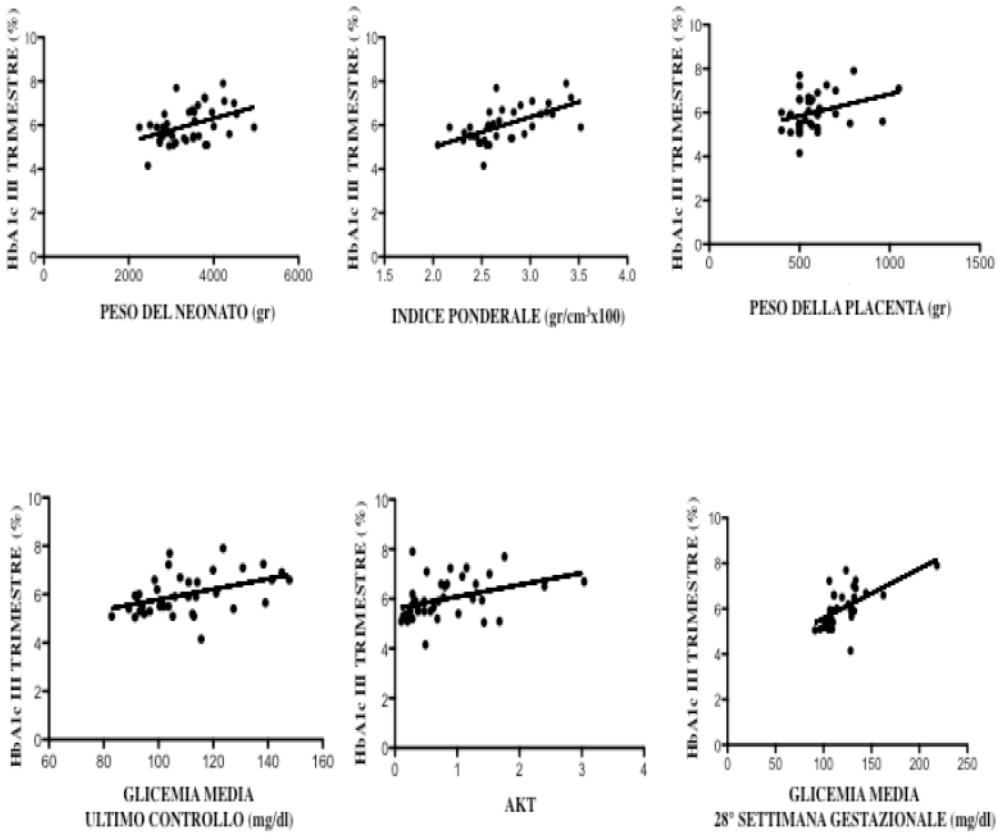

Figura 10. Correlazione tra HbA1c del III trimestre e: peso del neonato, indice ponderale, peso della placenta, glicemia media ultimo controllo, espressione di AKT e glicemia media alla 28ª settimana gestazionale.

La glicemia media peri-partum correla negativamente con il peso del neonato ($p < 0.05$) e con il peso della placenta ($p < 0.05$) (Figura 11).

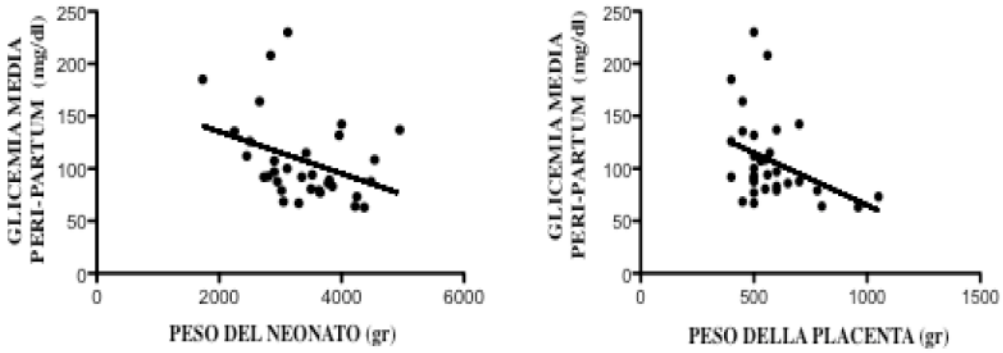

Figura 11. Correlazione tra glicemia media peri-partum e: peso del neonato e peso della placenta.

Il BMI pregravidico correla positivamente con AKT ($p < 0.05$) (Figura 12).

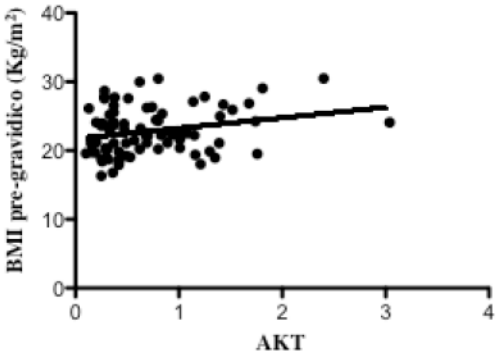

Figura 12. Correlazione tra BMI pre-gravidico ed espressione di AKT.

L'incremento ponderale della gestante, infine, correla positivamente solo con il peso del neonato ($p < 0.05$) (Figura 13).

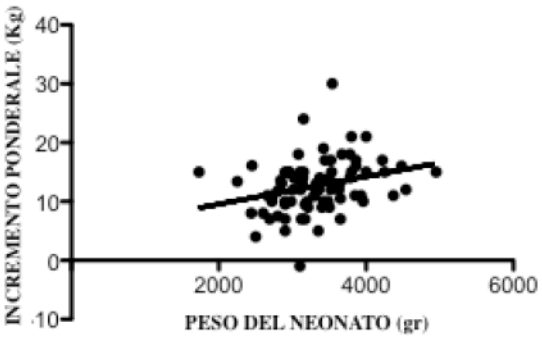

Figura 13. Correlazione tra incremento ponderale materno e peso del neonato

Analisi statistica di regressione logistica

E' stata inoltre indagata la correlazione tra i risultati in vitro (espressione di IR, IGF-IR, ERK, AKT e fosforilazione di IR, IGF-IR, ERK, AKT) e gli esiti neonatali sfavorevoli: ipoglicemia neonatale, prematurità, LGA/macrosomia, indice ponderale aumentato del neonato, SGA, Taglio Cesareo, attraverso un'analisi di regressione logistica: non è stato trovato alcun risultato statisticamente significativo.

DISCUSSIONE

E' riportato in letteratura che l'espressione di IR placentare cambia a seconda dell'epoca gestazionale: nel I trimestre è prevalentemente espresso nelle membrane del sinciziotrofoblasto, diretto alla circolazione materna, mentre nel 3° trimestre è prevalentemente espresso nell'endotelio placentare diretto alla circolazione fetale (10).

Fisiologicamente, nel trofoblasto IR attiva prevalentemente MAPK, mentre nell'endotelio è prevalentemente attivata PI3K/AKT (14).

In quasi tutte le cellule, l'attivazione delle due vie è regolata dalla tirosin-fosfatasi SHP-2 (15), presente anche nelle cellule placentari che può regolare lo sviluppo fetale, e dalla fosfatasi MPK-4 che sembra essere coinvolta nella regolazione e nello sviluppo placentare regolando l'attivazione della via MAPK.

Anche IGF-IR è espresso in tutti i tipi cellulari placentari (37, 38).

Le placente di gravidanze complicate da IUGR presentano una riduzione del 33% dell'espressione di IGF-IR e di AKT, ma non della fosforilazione di AKT (62).

E' riportato che donne obese con GDM trattate solo con dieta hanno un numero di IR più alto, a livello del trofoblasto, di donne GDM trattate anche con insulina anche se in modo non significativo. Al contrario donne GDM non obese trattate anche con insulina hanno

un'espressione di IR significativamente maggiore delle donne GDM trattate solo con dieta (40).

Il nostro studio, a nostra conoscenza, è il primo lavoro che ha valutato il peso della glicemia, dal concepimento al parto, dell'espressione nella placenta a termine di IR, IGF-IR, ERK, AKT e della loro fosforilazione sugli esiti della gravidanza.

Scegliere gestanti con DMT1, GDM, e gravidanza fisiologica ha avuto il razionale di distinguere gli effetti di un'iperglicemia pre-esistente il concepimento (nel DMT1) da quelli di una iperglicemia che insorge nella seconda metà della gravidanza (tipica del GDM) paragonandoli a quelli del gruppo delle gravidanze fisiologiche (o di controllo) che per definizione non presenta iperglicemia. E' importante però precisare che sia le gravide con DMT1 che quelle con GDM hanno ricevuto un trattamento mirato a "normalizzare" i valori glicemici entro gli obiettivi suggeriti dalle società scientifiche (58); questo potrebbe avere influito sull'espressione delle proteine studiate (IR, IGF-IR, ERK, AKT) e sulla loro fosforilazione nella placenta al momento del parto (epoca in cui le gravide diabetiche sono sotto strettissimo monitoraggio glicemico). Nonostante i rigidi obiettivi glicemici, uguali per i due gruppi DMT1 e GDM, sono rimaste delle differenze sui dati del compenso glicemico nei due

gruppi che potrebbero avere contribuito all'instaurarsi di complicanze fetali.

La frequenza del DMT1 e del GDM in gravidanza è del 6-7% (di cui il 97% è costituito dal diabete gestazionale mentre circa il 3% è costituito dal diabete pregravidico), un dato non trascurabile visti gli effetti dell'eventuale iperglicemia sulla gestante e sul feto (1).

Nelle pazienti con DMT1, e più in generale nelle pazienti con diabete pregravidico, la strategia adottata per minimizzare gli effetti negativi dell'iperglicemia è la programmazione della gravidanza. La programmazione della gravidanza prevede un percorso costituito da un'intensificazione dei controlli ambulatoriali con eventuali modifiche terapeutiche e comportamentali, al fine di raggiungere un buon compenso glico-metabolico prima del concepimento. L'obiettivo è quello di ottenere una emoglobina glicata < 6.5% senza esporre la paziente a episodi di ipoglicemia frequente e/o grave e riducendo al minimo possibile la variabilità glicemica. In alcuni casi questo percorso richiede l'utilizzo della terapia insulinica sottocutanea continua tramite microinfusore eventualmente associato al calcolo dei carboidrati ai pasti.

Nella nostra casistica solo il 30% delle pazienti con DMT1 aveva effettuato un percorso di programmazione della gravidanza presso i nostri ambulatori riuscendo a raggiungere un discreto compenso

glicemico prima del concepimento (HbA1c < 7%). Solamente 3 pazienti su 20 (15%), infine, avevano una emoglobina glicata peri-concepimento < 6.5%. Le rimanenti (85%), invece, non avendo programmato la gravidanza, mostravano un valore di HbA1c ≥ 6.5% nel periodo del concepimento. Questo dato indica la necessità nelle pazienti diabetiche di implementare l'educazione terapeutica a partire dall'età fertile, tramite l'utilizzo di opuscoli informativi, di questionari appositamente realizzati e di incontri ad hoc al fine di ottenere una più efficace sensibilizzazione alla programmazione di gravidanza (63).

Nel diabete gestazionale, invece, è determinante effettuare una diagnosi tempestiva, come suggerito dalle attuali linee guida (57, 58), per potere instaurare la terapia dietetica e, ove necessario, insulinica utile a impedire o arrestare gli effetti negativi dell'iperglicemia.

Il compenso glicemico è stato valutato sia mediante la glicemia capillare, sia mediante l'emoglobina glicata. Questo dosaggio è da molti considerato di utilità clinica limitata in gravidanza (se eccettuiamo la valutazione iniziale del grado di scompenso glicemico). Un recente studio condotto su donne con diabete mellito tipo 1 ha, tuttavia, dimostrato un valore predittivo dell'emoglobina glicata, anche in fase avanzata di gestazione, su alcuni esiti della

gravidanza, come l'incidenza di macrosomia fetale o LGA, l'ipoglicemia neonatale e il parto (63).

La maggior parte delle diagnosi di GDM si effettuano tra la 24ª e la 28ª settimana di gestazione. Fanno eccezione le donne ad alto rischio per cui la diagnosi potrebbe avvenire più precocemente (tra la 16ª e la 18ª settimana di gestazione). Pertanto abbiamo scelto di iniziare a paragonare il compenso glicemico tra DMT1 e GDM a partire dalla 28ª settimana di gestazione, epoca in cui la maggior parte (80%) delle pazienti del gruppo GDM aveva avuto la diagnosi.

Relativamente al compenso glicemico nella nostra casistica, le pazienti del gruppo DMT1 hanno presentato una glicemia media capillare alla 28ª settimana di gestazione, peri-parto e una glicemia media capillare a digiuno nel III trimestre significativamente più alta rispetto al gruppo GDM. Tuttavia la glicemia media all'ultimo controllo ambulatoriale è risultata non dissimile nei due gruppi. Inoltre le donne con DMT1 hanno presentato un'emoglobina glicata media del III trimestre significativamente più alta rispetto al gruppo GDM.

Nel gruppo DMT1 l'emoglobina glicata media del III trimestre è risultata significativamente inferiore rispetto a quella del concepimento (6.5 ± 0.7% vs. 7.8 ± 1.4%, $p < 0.01$), del primo

trimestre (6.5 ± 0.7% vs. 7.3 ± 1.0%, $p < 0.05$) e simile a quella del secondo trimestre (6.5 ± 0.7% vs. 6.5 ± 0.8, $p = 0.98$).

Nel gruppo di donne DMT1, la media glicemica dopo un'ora dal pasto è risultata inferiore a 140 mg/dl già dal primo trimestre, invece la glicemia media capillare a digiuno è diminuita, ma non in maniera significativa, dal I al III trimestre. Quindi, la differenza dei profili glicemici tra il gruppo DMT1 e GDM al III trimestre ha riguardato soprattutto la glicemia a digiuno (108 ± 20 vs. 87 ± 10 mg/dl, $p < 0.01$). Tale differenza si riflette poi in un valore di emoglobina glicata media del III trimestre significativamente maggiore nel gruppo DMT1 rispetto al gruppo GDM (Tabella 1).

Per quanto riguarda gli outcome materno-fetali si è osservato che:

- L'epoca gestazionale media del parto è risultata significativamente minore nel gruppo DMT1;
- Il peso dei neonati, corretto per settimana gestazionale del parto, è risultato significativamente maggiore nel gruppo con DMT1, rispetto al gruppo GDM e al gruppo gravidanza fisiologica;
- La percentuale di macrosomia fetale o di LGA è risultata significativamente maggiore nel gruppo DMT1;

- L'indice ponderale, corretto per età gestazionale, è risultato significativamente maggiore nel gruppo DMT1.

Pertanto sembrerebbe che le differenze osservate sul compenso glicemico abbiano influenzato sia l'epoca gestazionale del parto sia la crescita fetale.

Per quanto riguarda i risultati "in vitro" sull'espressione di IR, IGF-IR, ERK, AKT e sulla loro fosforilazione, le pazienti con DMT1, rispetto agli altri due gruppi hanno mostrato:

- Una maggiore espressione e una **minore fosforilazione di AKT** (0.6 ± 0.1 unità densitometriche - UD) rispetto agli altri due gruppi (1.7 ± 0.2 UD nel gruppo delle gravidanze fisiologiche; 1.9 ± 0.6 UD nel gruppo delle gravidanze con GDM). Tale dato è già stato dimostrato in letteratura su modelli murini (49). Il dato permane anche se correggiamo i valori per la glicemia peri-parto. La deficitaria fosforilazione di AKT (e quindi una meno efficace attivazione della via metabolica), potrebbe essere implicata nella maggiore frequenza di macrosomia/LGA registrata nei neonati da madri con DMT1. Una simile tendenza è stata trovata quando, indipendentemente dalla diagnosi, le pazienti sono state divise

in base alla presenza o meno della macrosomia: nelle placente delle donne con macrosomia l'espressione di AKT è risultata maggiore e la sua fosforilazione è risultata deficitaria rispetto alle placente delle donne senza macrosomia (anche se il dato su pAKT non ha raggiunto la significatività statistica verosimilmente per la esiguità del campione analizzato).

- Una **maggiore fosforilazione di IGF-IR** (3.6 ± 0.6 UD) rispetto agli altri due gruppi (1.8 ± 0.2 UD nel gruppo delle gravidanze fisiologiche; 2.9 ± 0.8 UD nel gruppo delle gravidanze con GDM). Tale differenza significativa, però, scompare se correggiamo i valori per la glicemia peri-parto. Inoltre, indipendentemente dalla diagnosi, le pazienti con glicemia peri-parto ≥ 120 mg/dl hanno mostrato un più elevato pIGF-IR rispetto alle pazienti con glicemia peri-parto < 120 mg/dl (4.5 ± 0.9 UD vs. 2.1 ± 0.2 UD, $p < 0.01$); quindi tale maggiore fosforilazione potrebbe essere verosimilmente legata agli aumentati livelli di glicemia in acuto che si verificano nel periodo subito prima del parto. Ciò potrebbe significare che la fosforilazione di IGF-IR (rispetto a quella di IR) possa essere implicata nel determinismo di alcuni outcome neonatali

sfavorevoli legati al periodo peri-parto (come ad esempio l'ipoglicemia neonatale o la prematurità).

Dall'analisi di regressione lineare, mirata ad identificare la correlazione tra le variabili studiate, senza tenere conto della iniziale suddivisione tra i gruppi, è emerso che: in accordo con la letteratura l'emoglobina glicata media del III trimestre correla positivamente con il peso della placenta, con il peso del neonato e con l'indice ponderale (64); il dato interessante emerso dallo studio di correlazione è che l'emoglobina glicata media del II e III trimestre correla positivamente con l'espressione di AKT. Questo è il primo studio che ha messo in relazione l'emoglobina glicata con espressione di AKT nella placenta a termine della gravidanza e che ha dimostrato che all'aumentare dell'emoglobina glicata del secondo-terzo trimestre aumenta anche l'espressione di AKT. Il peggiore compenso metabolico nelle fasi centrali della gravidanza potrebbe, quindi, condizionare la trasduzione del segnale intracellulare a valle del recettore insulinico.

Il peso della placenta correla positivamente con il peso del neonato e con l'indice ponderale del neonato. Ciò conferma che la crescita del feto è concomitante a quella della placenta.

Il peso della placenta non correla con l'espressione di IR, IGF-IR, ERK, AKT e loro fosforilazione nella placenta al momento del parto,

pertanto, potrebbero coesistere altri fattori, alcuni noti come l'incremento ponderale della gestante (65) e altri meno noti come l'espressione placentare di altre proteine, che influenzano la crescita della placenta. Tuttavia non si può escludere anche un ruolo di IR e IGF-IR dal momento che lo studio sulla placenta è stato effettuato a termine di gravidanza, mentre è possibile che tali recettori siano coinvolti in epoca gestazionale differente da quella finale. Sarebbe utile a tal proposito conoscere l'espressione di tali proteine in placente di diversa epoca gestazionale.

In letteratura è riportato che IR e IGF-IR e i loro ligandi sono importanti per la crescita placentare e fetale ma i dati nelle donne diabetiche sono scarsi.

Questo studio, seppure con i limiti della numerosità del campione, rappresenta il primo studio, a nostra conoscenza, in cui si mettono in relazione gli esiti sfavorevoli della gravidanza con l'espressione di fattori di crescita.

Ulteriori studi sono necessari per comprendere meglio il ruolo di IR e di IGF-IR nelle gravidanze fisiologiche e soprattutto in quelle complicate da diabete.

BIBLIOGRAFIA

1. Lapolla A., Dalfrà M.G., Lencioni C., Di Cianni G.: Epidemiology of diabetes in pregnancy: a review of italian data. Diab. Nutr. Metab.2004. 17: 358-367.

2. Vrachnis N., Augoulea A., Iliodromiti Z., Lambrinoudaki I., Sifakis S., Creatsas G.: Previous gestational diabetes mellitus and markers of cardiovascular risk. International Journal of Endocrinology 2012:6 pages.458-610.

3. Haninger N.C., Farley C.L.: Screening for hypoglycemia in healthy term neonates: effects on breastfeeding. J Midwifery Womens Health. 2001 Sep-Oct;46(5):292-301.

4. American Academy of Pediatrics Committee on Fetus and Newborn. Routine evaluation of blood pressure, hematocrit, and glucose in newborns. Pediatrics1992: 92(3):474–6.

5. Tennant P.W., Glinianaia S.V., Bilous R.W., Rankin J., Bell R.: Pre-existing diabetes, maternal glycated haemoglobin, and the risks of fetal and infant death: a population-based study. Diabetologia, 2014 Feb;57(2):285-94.

6. Frasca F., Pandini G., Scalia P., Sciacca L., Mineo R., Costantino A., Goldfine I.D., Belfiore A., Vigneri R.: Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growthfactor II receptor in fetal and cancer cells, Mol Cell Biol 19: 3278, 1999.

7. Belfiore A., Frasca F., Pandini G., Sciacca L., Vigneri R.: Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease.. Endocr Rev 2009;30:586-23.

8. Soos M.A., Field C.E., Siddle K.: Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity. Biochem J 1993; 290: 419– 426.

9. Slaaby R., Schaffer L., Lautrup-Larsen I., Andersen A.S., Shaw A.C., Mathiasen I.S., Brandt J.: Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF-1 affinity irrespective of the IR splice variant. J Biol Chem 2006; 281: 25869–25874.

10. Hiden U., Glitzner E., Hartmann M., Desoye G.: Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies, J. Anat. 215:60, 2009.

11. Sciacca L., Costantino A., Pandini G., Mineo R., Frasca F., Scalia P., Sbraccia P., Goldfine I.D., Vigneri R., Belfiore A.: Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism, Oncogene 18: 2471, 1999.

12. Louvi A., Accili D., Efstratiadis A.: Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development, Dev. Biol. 189:33, 1997.

13.Mussig K., Haring H.U.: Insulin signal transduction in normal cells and its role in carcinogenesis. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2010;118:356-9.

14. Hiden U. et al. Placenta 26:A9, 2005, abstract.

15. Qu C.K.: Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response. Biochim Biophys Acta 2002; 1592: 297–301.

16. Barnea E.R., Neubrun D., Shurtz-Swirski R.: Effect of insulin on human chorionic gonadotrophin secretion by placental explants. Hum Reprod. 1993 Jun;8(6):858-62.

17. Hiden U., Glitzner E., Ivanisevic M., Djelmis J., Wadsack C., Lang U, Desoye G.: MT1-MMP expression in first-trimester placental tissue is upregulated in type 1 diabetes as a result of elevated insulin and tumor necrosis factor-alpha levels. Diabetes. 2008 Jan;57(1):150-7. Epub 2007 Oct 10.

18. Jirkovská M., Kubínová L., Janácek J., Moravcová M., Krejcì V., Karen P.: Topological properties and spatial organization of villous capillaries in normal and diabetic placentas. J Vasc Res. 2002 May-Jun;39(3):268-78.

19. Hiden U., Lang I., Ghaffari-Tabrizi N., Gauster M., Lang U., Desoye G.: Insulin action on the human placental endothelium in normal and diabetic pregnancy. Curr Vasc Pharmacol. 2009 Oct;7(4):460-6

20. Treins C., Giorgetti-Peraldi S., Murdaca J., Semenza G.L., Van Obberghen E.: Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin- dependent signaling pathway. J Biol Chem. 2002 Aug 2;277(31):27975-81. Epub 2002 May 24.

21. Lang I., Schweizer A., Hiden U., Ghaffari-Tabrizi N., Hagendorfer G., Bilban M., Pabst M.A., Korgun E.T., Dohr G., Desoye G.: Human fetal placental endothelial cells have a mature arterial and a juvenile venous phenotype with adipogenic and osteogenic differentiation potential. Differentiation. 2008 Dec;76(10):1031-43. doi: 10.1111/j.1432-0436.2008.00302.x. Epub 2008 Jul 30.

22. Desoye G., Hauguel-de Mouzon S.: The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. Diabetes Care. 2007 Jul;30 Suppl 2:S120-6. doi: 10.2337/dc07- s203.

23. Jones C.J., Desoye G.: Glycogen distribution in the capillaries of

the placental villus in normal, overt and gestational diabetic pregnancy. Placenta. 1993 Sep-Oct;14(5):505-17.

24. Le Roith D., Bondy C., Yakar S., Liu J.-L., Butler.: The somatomedin hypothesis: 2001. Endocr. Rev 2001; 22: 53–74.

25. Jones J.I., Clemmons D.R.: Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. Endocr Rev 1995; 16: 3–34.

26. Klauwer D., Blum W.F., Hanitsch S., Rascher W., Lee P.D., Kiess W.: IGF-I, IGF-II, free IGFI and IGFBP-1, -2 and -3 levels in venous cord blood: relationship to birthweight, length and gestational age in healthy newborns. Acta Paediatr 1997; 86: 826–833.

27. Osorio M., Torres J., Moya F., Pezzullo J., Salafia C., Baxter R., Schwander J., Fant M.: Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF inding proteins-1, -2, and -3 in newborn serum: relationships to fetoplacental growth at term. Early Hum Dev 1996; 46: 15–26.

28. Giudice LC, de Zegher F, Gargosky SE, Dsupin BA, de las Fuentes L, Crystal RA, Hintz RL, Rosenfeld RG: Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and reterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80: 1548– 555.

29. Watson CS, Bialek P, Anzo M, Khosravi J, Yee SP, Han VK: Elevated circulating insulin-like growth factor binding protein-1 is sufficient to cause fetal growth restriction. Endocrinology 2006; 147: 1175–1186.

30. Guyda HJ. Metabolic effects of growth factors and polycyclic aromatic hydrocarbons on cultured human placental cells of early and late gestation. J Clin Endocrinol Metab. 1991 Mar;72(3):718- 23.

31. Bloxam DL, Bax BE, Bax CM Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I differently influence the directional

accumulation and transfer of 2-aminoisobutyrate (AIB) by human placental trophoblast in two-sided culture. Biochem Biophys Res Commun. 1994 Mar 15;199(2):922-9.

32. Karl PI.: Insulin-like growth factor-1 stimulates amino acid uptake by the cultured human placental trophoblast. J Cell Physiol. 1995 Oct;165(1):83-8.

33. Efstratiadis A: Genetics of mouse growth. Int J Dev Biol 1998; 42: 955–976.

34. Baker J., Liu J.P., Robertson E.J., Efstratiadis A.: Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. Cell 1993; 75: 73–82.

35. Han V.K., Bassett N., Walton J., Challis J.R.: The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the feto-maternal interface. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 2680–2693.

36. Miller A.G., Aplin J.D., Westwood M.: Adenovirally mediated expression of insulin-like growth factors enhances the function of first trimester placental fibroblasts. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 379–385.

37. Holmes R., Porter H., Newcomb P., Holly J.M., Soothill P.: An immunohistochemical study of type I insulin-like growth factor receptors in the placentae of pregnancies with appropriately grown or growth restricted fetuses. Placenta 1999; 20: 325–330.

38. Fang J., Furesz T.C., Lurent R.S., Smith C.H., Fant M.E.: Spatial polarization of insulin-like growth factor receptors on the human syncytiotrophoblast. Pediatr Res 1997; 41: 258–265.

39. Higgins M. et al. Stereology of the placenta in type 1 and type 2

diabetes, Placenta 32:564, 2011.

40. Colomiere M. et al. Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus, European Journal of Endocrinology 160:567, 2009.

41. Valensise H,, Liu Y.Y., Federici M.,Lauro D., Dell'Anna D., Romanini C., Sesti G.: Increased expression of low-affinity insulin receptor isoform and insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors in term placenta from insulin-resistan women with gestational hypertension. Diabetologia 39(8):952-60, Aug 1996.

42. Nelson S.M. et al. Role of adiponectin in matching of fetal and placental weight in mothers with type 1 diabetes, Diabetes Care 31:1123, 2008.

43. Lindsay R.S., Walker J.D., Halsall I., Hales C.N., Calder A.A., Hamilton B.A., Johnstone FD; Scottish Multicentre Study of Diabetes in Pregnancy. Insulin and insulin propeptides at birth in offspring of diabetic mothers, JCEM 88:1664, 2003.

44. Yan-Jun L., Tsushima T., Minei S., Sanaka M., Nagashima T., Yanagisawa K., Omori Y.: Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins (IGFBP-1, -2 and -3) in diabetic pregnancy: relationship to macrosomia, Endocrine Journal 43:221, 1996

45. Sciacca L., Cassarino M.F., Genua M., Pandini G., Le Moli R., Squatrito S., Vigneri R.: Insulin analogues differently activate insulin receptor isoforms and post-receptor signalling. Diabetologia.2010 Aug;53(8):1743-53. doi: 10.1007/s00125-010- 1760-6. Epub 2010 Apr 28.

46. Sommerfeld M.R., Müller G., Tschank G., Seipke G., Habermann P., Kurrle R., Tennagels N.: In vitro metabolic and mitogenic signaling of insulin glargine and its metabolites, PlosOne 5:e9540,

2010.

47. Weinstein D., Simon M., Yehezkel E., Laron Z., Werner H.: Insulin analogues display IGF-I-like mitogenic and anti-apoptotic activities in cultured cancer cells, Diabetes Metab Res Rev 25: 41, 2009.

48. Shukla A., Grisouard J., Ehemann V., Hermani A., Enzmann H., Mayer D. Analysis of signaling pathways related to cell proliferation stimulated by insulin analogs in human mammary epithelial cell lines, Endocr Relat Cancer 16:429, 2009.

49. Ozmen A, Unek G, Kipmen-Korgun D, Korgun ET.: The PI3K/Akt and MAPK-ERK1/2 pathways are altered in STZ induced diabetic rat placentas. Histol Histopathol. 2013 Dec 18.

50. Sisino G, Bouckenooghe T, Aurientis S, Fontaine P, Storme L, Vambergue A.: Diabetes during pregnancy influences Hofbauer cells, a subtype of placental macrophages, to acquire a pro- inflammatory phenotype. Biochim Biophys Acta. 2013 Dec;1832(12):1959-68. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.07.009. Epub 2013 Jul 19.

51. Chang S.C., Vivian Yang W.C.: Hyperglycemia induces altered expressions of angiogenesis associated molecules in the trophoblast. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:457971. doi: 10.1155/2013/457971. Epub 2013 Jul 25.

52. Teasdale F.: Histomorphometry of the human placenta in Class B diabetes mellitus.Placenta. 1983 Jan-Apr; 4(1):1-12.

53. Mayhew T.M.: Enhanced fetoplacental angiogenesis in pre-gestational diabetes mellitus: the extra growth is exclusively longitudinal and not accompanied by microvascular remodelling. Diabetologia. 2002 Oct; 45(10):1434-9.

54. Leach L., Gray C., Staton S., et al. Vascular endothelial cadherin

and β-catenin in human fetoplacental vessels of pregnancies complicated by Type 1 diabetes: associations with angiogenesis and perturbed barrier function. Diabetologia. 2004;47:695–709.

55. Jauniaux E., Burton G.J.: Villous histomorphometry and placental bed biopsy investigation in Type I diabetic pregnancies.Placenta. 2006 Apr-May; 27(4-5):468-74.

56. Del Prato S., Fanelli C., Giaccari A., Mannucci E., Sciacca L., Torri V. a nome della Società Italiana di Diabetologia : Diabete e cancro. Il Diabete Vol. 23, n. 2, Giugno 2011.

57. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel: International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. Diabetes Care, vol. 33, number 3, 676-682, march 2010.

58. Associazione Medici Diabetologi (AMD) - Società Italiana di Diabetologia (SID). Standard italiani per la cura del diabete mellito 2016. http://www.standarditaliani.it/. Ultimo accesso 30 Marzo 2017.

59. SID-AMD-ADI, Alimentazione in Gravidanza, Raccomandazioni (2014).

60. American Diabetes Association (2017) Standards of medical care in diabetes - 2017. Diabetes Care 40 (suppl 1): S1-S135.

61. Mello G, Parretti E, Hod M. Prevention of fetal macrosomia. Hod M, Jovanovic L, Di Renzo GC, De Leiva A, Langer O. Textbook of Diabetes and Pregnancy, 2008.

62. Laviola L., Perrini S., Belsanti G., Natalicchio A., Montrone C., Leonardini A., Vimercati A., Scioscia M.,Selvaggi L., Giorgino R., Greco P., Giorgino F.: Intrauterine growth restriction in humans is

associated with abnormalities in placental insulin-like growth factor signaling. Endocrinology. 2005 Mar; 146 (3): 1498- 505. Epub 2004 24 Nov.

63. Maresh M.J., Holmes V.A., Patterson C.C., Young I.S., Pearson D.W., Walker J.D., McCance D.R.; For the Diabetes and Pre-eclampsia Intervention Trial Study Group.:Glycemic targets in the second and third trimester of pregnancy for women with type 1 diabetes. Diabetes Care. 2014 Nov 3. pii: DC_141755.

64. Hanson U., Hagenfeldt L., Hagenfeldt K.: Glycosylated hemoglobins in normal pregnancy: sequential changes and relation to birth weight. Obstet Gynecol. 1983 Dec;62(6):741-4.

65. Crane J.M., White J., Murphy P., Burrage L., Hutchens D.: The effect of gestational weight gain by body mass index on maternal and neonatal outcomes. J Obstet Gynaecol Ca 2009, 1:28-35.