

RELAZIONE BORSA Fo.Di.Ri. - MSD 2014-2015

PROGETTO DI RICERCA:

EFFETTI CLINICI E PLACENTARI DELL'IPERGLICEMIA IN GRAVIDANZA

IN DONNE CON DIABETE MELLITO

PARTE DESCRITTIVA E PROBLEMATIC

Diversi studi epidemiologici sull'uomo e numerosi lavori sperimentali su modelli animali (1, 2), suggeriscono che il verificarsi di condizioni intra-uterine non favorevoli durante lo sviluppo fetale, possa essere associato a numerose patologie che riguardano il prodotto del concepimento alla nascita, ma anche alla suscettibilità dell'individuo adulto all'insorgenza di patologie degenerative e/o metaboliche (Developmental Origin Hypothesis) (3). A questo proposito, negli ultimi anni si è sviluppato un particolare interesse scientifico sui possibili danni che il "milieu biochimico-ormonale" presente durante la gravidanza di donne con diabete mellito può causare al nascituro.

In gravidanza, l'iperglicemia può esserci per la presenza del diabete mellito gestazionale (GDM) o del diabete mellito pregestazionale. Il GDM insorge più frequentemente tra la 24[°] e la 28[°] settimana di gestazione, mentre in donne con diabete pregestazionale l'iperglicemia può essere presente già al momento del concepimento, considerato che circa il 40% delle donne con diabete mellito tipo 1 (DMT1) e ancora meno nel caso delle donne con diabete mellito tipo 2 (DMT2), programma la gravidanza (e quindi concepisce con un buon compenso glicemico). L'epoca di insorgenza dell'iperglicemia e la durata del cattivo compenso glico-metabolico hanno verosimilmente un peso diverso sugli effetti a breve termine (neonato) e a lungo termine (adolescente e adulto).

I fenomeni alla base dei possibili danni sul prodotto del concepimento, conseguenti alla presenza di GDM o diabete pregestazionale sono complessi, in larga parte ancora sconosciuti e vanno ben oltre

l'effetto diretto della semplice iperglicemia. Questi fenomeni possono essere riassunti in due meccanismi principali: la disregolazione dei fattori di crescita (e dei loro recettori) e l'instaurarsi di mutazioni epigenetiche.

L'insulina e i fattori di crescita insulino-simili in gravidanza

Il termine fattore di crescita si riferisce a proteine capaci di stimolare la proliferazione e il differenziamento cellulare. La funzione principale dei fattori di crescita è la regolazione del ciclo cellulare mediante l'abbandono della fase di quiescenza cellulare (fase G0) e l'entrata della cellula in fase G1 (di crescita). Essi regolano inoltre la mitosi, la sopravvivenza, la migrazione e il differenziamento cellulare. L'azione dei diversi fattori di crescita è determinata dal loro legame a specifici recettori che ne mediano gli effetti biologici a valle. Durante la gravidanza, l'insulina e i fattori di crescita insulino-simili 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2) sono i maggiori regolatori della placenta e della crescita fetale. Le loro azioni sono mediate dai recettori dell'insulina (IR) e dai recettori dell'IGF-1 (IGF-1R), che sono espressi in aree distinte della placenta. In particolare l'espressione di IR placentare, a differenza dell'espressione di IGF-1R, 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 (4). 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. La placenta è molto ricca di IR e IGF-1R, tanto da essere frequentemente usata come fonte per isolarne le proteine. 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 (5). L'IR-A lega ad alta affinità non solo l'insulina ma anche l'IGF-2, importante fattore di crescita fetale (5, 6, 7).

La disregolazione del sistema insulina/IGF in gravidanza

Modifiche nel numero, nell'affinità e nel "signalling" di IR placentare potrebbero alterare il rilascio di nutrienti placentari al feto. I dati a proposito sono scarsi. E' riportato che donne con diabete mellito gestazionale (GDM) trattate solo con dieta hanno un numero di IR più basso, a livello del trofoblasto, di donne GDM trattate anche con insulina (8). Fisiologicamente nel trofoblasto IR attiva prevalentemente MAPK, mentre nell'endotelio è prevalentemente attivata AKT (9). E' riportato in letteratura che la placenta delle donne diabetiche presenta delle alterazioni strutturali e funzionali (10) e che il sistema insulina/IGF ha un ruolo in queste alterazioni (4). In donne con diabete mellito tipo 1 (DMT1) è stata trovata anche una correlazione positiva tra livelli nel cordone ombelicale di IGFBP3 e IGF-1 e la macrosomia (11, 12). Inoltre, i valori di emoglobina glicosilata (HbA1c) della madre correlano con i livelli di IGF-1 e IGF-2 del cordone ombelicale, che a loro volta correlano con il peso alla nascita (13). Quindi, la disregolazione dei fattori di crescita e dei loro recettori, quale può aversi in donne diabetiche, può essere responsabile dell'aumentata crescita della placenta e del feto, dell'ipervascolarizzazione placentare e di un alterato trasporto di nutrienti al feto (4). Nonostante sia ormai consolidato in letteratura il ruolo di un buon compenso glicometabolico (sia al momento del concepimento che durante la gravidanza) sugli outcomes materno-fetali, è noto dall'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 cionondimeno non sviluppano complicanze materne e/o fetali/neonatali, come ad esempio la macrosomia. Viceversa donne, apparentemente ben compensate dal punto di vista metabolico, sviluppano complicanze inaspettate. Alterazioni dell'espressione dei recettori dei fattori di crescita (insulina e IGF-1) e/o alterazioni post-recettoriali potrebbero avere un ruolo nelle suddette apparenti incongruenze cliniche. 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 ed i suoi analoghi non attraversino la placenta, tuttavia giungono a livello placentare e ciò può determinare alterazioni strutturali e/o funzionali (quali modifiche dell'espressione di fattori di crescita, alterazioni dell'angiogenesi, ecc) che possono riflettersi sullo sviluppo fetale. E' stato inoltre riportato che in alcune condizioni in vitro gli analoghi ad azione prolungata (glargine e detemir) hanno un effetto mitogeno aumentato rispetto all'insulina e agli analoghi ad azione rapida (14, 15, 16, 17). 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 quello di placente di donne non diabetiche o diabetiche in buon compenso glicemico (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, i fattori di rimodellamento tissutale.

SCOPO DELLA RICERCA

Scopo principale dello studio è stato quello di valutare gli effetti delle alterazioni della glicemia in gravidanza (diabete gestazionale, diabete mellito tipo 1) a livello del neonato (peso, complicanze, malformazioni) e a livello della placenta (sistema Insulina-IGF1).

METODOLOGIA

Sono state studiate donne in gravidanza suddivise in tre gruppi: donne con DMT1 in trattamento insulinico multi-iniettivo o tramite microinfusore (n= 20); donne con GDM (n= 20); donne con gravidanza fisiologica come gruppo di controllo (n= 40). Tutte le donne hanno praticato una dieta con apporto calorico e distribuzione di pasti secondo i LARN per la popolazione italiana in gravidanza e sono state appaiate per età e BMI pregravidico. Per eliminare l'interferenza dell'obesità sulla interpretazione dei dati, sono state escluse le donne con BMI pregravidico ≥ 30 Kg/m².

- In tutte le donne (gravidanza fisiologica, DMT1, GDM) sono stati valutati: età; BMI pregravidico; incremento ponderale; outcome materni (tipo di parto, eventuali complicanze); outcome fetali (peso, indice ponderale, Apgar 1 e 5 minuti, complicanze neonatali).
- Nelle donne con DMT1 è stato inoltre valutato: 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; stato della nefropatia e retinopatia diabetica in gravidanza; pressione arteriosa a ogni visita; crescita fetale (ecografia fetale morfologica e di accrescimento) e flussimetria (indici di resistenza e di pulsatilità a livello di arterie ombelicali e uterine).
- Nelle donne con GDM è stato inoltre valutato: compenso glicemico, valutato come media di HbA1c e delle glicemie capillari domiciliari; pressione arteriosa a ogni visita; outcome materni (tipo di parto, eventuali complicanze); crescita fetale (ecografia fetale morfologica e di accrescimento).
- In tutte le placenti è stato valutato: il peso delle placenti; l'espressione di IR, IGF-1R, IGF-1, tramite Western-blot o dosaggio IRMA; la fosforilazione di IR, IGF-1R, ERK e AKT tramite Immunoprecipitazione o Western-blot. Il campione sul quale sono state effettuate le valutazioni è rappresentato da un cotiledone placentare (unità morfo-funzionale delle dimensioni di circa 2 centimetri cubi) reperito al momento del parto da placenti di gestanti a termine, a circa 2-3 centimetri dall'inserzione del cordone ombelicale. Il tessuto placentare, conservato a -80 C sino all'utilizzo, è stato omogeneizzato per poter effettuare gli studi in vitro.

AVANZAMENTO DELLA RICERCA

Nel corso del periodo 2014-2016 è stato studiato l'intero campione previsto dal protocollo di studio:

- N = 40 pazienti con gravidanza fisiologica;
- N = 20 pazienti con diabete gestazionale (GDM);

- N = 20 pazienti con diabete mellito tipo 1 (DMT1).

RISULTATI OSSERVATI

- **Compenso glico-metabolico pre-gravidico:** sei pazienti con DMT1 su 20 (30.0%) mostravano un buon compenso glicemico al momento del concepimento ($HbA1c < 7\%$). Le restanti 14 pazienti (70.0%), invece, non avendo programmato la gravidanza, mostravano un valore di $HbA1c \geq 7\%$ 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 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 28° 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 ($6.5\% \pm 0.7$ vs. $5.7\% \pm 0.2$, $p < 0.01$), così come anche una glicemia media a digiuno del terzo trimestre più elevata (108 ± 20 mg/dl vs. 87 ± 10 mg/dl, $p < 0.01$).

- ***Incremento ponderale 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.
- ***Indice ponderale:*** l'indice ponderale medio dei bambini nati da madri con DMT1 (2.82 ± 0.5 gr/cm³) è risultato significativamente più elevato rispetto all'indice ponderale medio dei bambini nati da madri normo-tolleranti (2.62 ± 0.2 gr/cm³) e a quello dei bambini nati da madri con GDM (2.55 ± 0.2 gr/cm³). Tale risultato potrebbe essere messo in relazione al peggiore compenso glico-metabolico delle donne con DMT1 durante la gravidanza, rispetto agli altri due gruppi.
- ***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% (18).

La percentuale di prematurità (intesa come parto espletato tra la 34° e la 37° 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%).

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

RISULTATI IN VITRO

Le pazienti con DMT1, rispetto agli altri due gruppi hanno mostrato:

- 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 (19). Il dato permane (rispetto al gruppo di donne con GDM) anche se correggiamo i valori per la glicemia peri-parto. La deficitaria fosforilazione di AKT potrebbe essere implicata nella maggiore frequenza di macrosomia/LGA registrata nei neonati da madri con DMT1.
- Una **maggiore fosforilazione di IGF-1R** (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 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-1R 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 è 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-1R (rispetto a quella di IR) sia implicata nel determinismo di alcuni outcomes neonatali sfavorevoli legati al periodo peri-parto (come ad esempio l'ipoglicemia neonatale).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Barker DJ. et al. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 31:1235–1239, 2002.
- 2) Gluckman PD. et al. Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease. *Lancet* 373:1654–1657, 2009.
- 3) Gillman MW. Developmental origins of health and disease. *N Engl J Med* 353:1848–1850, 2005.
- 4) Hiden U. et al. Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies, *J. Anat.* 215:60, 2009.
- 5) Frasca F. et al. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells, *Mol Cell Biol* 19: 3278, 1999.
- 6) Sciacca L. et al. Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism, *Oncogene* 18: 2471, 1999.
- 7) Louvi A. et al. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development, *Dev. Biol.* 189:33, 1997.
- 8) Colomiere M. et al. Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus, *European Journal of Endocrinology* 160:567, 2009.
- 9) Hiden U. et al. *Placenta* 26:A9, 2005, abstract.

- 10) Higgins M. et al. Stereology of the placenta in type 1 and type 2 diabetes, *Placenta* 32:564, 2011.
- 11) Nelson SM et al. Role of adiponectin in matching of fetal and placental weight in mothers with type 1 diabetes, *Diabetes Care* 31:1123, 2008.
- 12) Lindsay RS et al. Insulin and insulin propeptides at birth in offspring of diabetic mothers, *JCEM* 88:1664, 2003.
- 13) Yan-Jun L. et al. 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.
- 14) Sciacca L, et al. Insulin analogues differently activate insulin receptor isoforms and post-receptor signalling, *Diabetologia* 53:1743, 2010.
- 15) Sommerfeld MR, et al. In vitro metabolic and mitogenic signaling of insulin glargine and its metabolites, *PlosOne* 5:e9540, 2010.
- 16) Weinstein D, et al. Insulin analogues display IGF-I-like mitogenic and anti- apoptotic activities in cultured cancer cells, *Diabetes Metab Res Rev* 25: 41, 2009.
- 17) Shukla A, et al. Analysis of signaling pathways related to cell proliferation stimulated by insulin analogs in human mammary epithelial cell lines, *Endocr Relat Cancer* 16:429, 2009.
- 18) 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.
- 19) 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*, 2014.

Andrea Tumminia

