

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Dipartimento di Scienze Cliniche Luigi Sacco

Corso di Dottorato di Ricerca

SCIENZA DELLO SVILUPPO PRENATALE, DIAGNOSI

E TERAPIA FETALE

Ciclo XXIII

**PENTRAXINA 3 COME POTENZIALE MARCATORE DI DANNO
ENDOTELIALE IN GRAVIDANZE COMPLICATE DA PREECLAMPSIA E
RITARDATO ACCRESCIMENTO INTRAUTERINO**

Tesi di Dottorato di

Veronica COZZI

Matricola R07621

Tutor: Prof.ssa Irene Cetin

Coordinatore del Dottorato: Prof. Enrico Ferrazzi

Anno Accademico 2009-2010

SOMMARIO

➤ Introduzione	pag .4
➤ Scopo della tesi	pag. 17
➤ Materiali e metodi	pag. 19
➤ Risultati	pag. 26
➤ Discussione	pag.30
➤ Tabelle	pag. 35
➤ Figure	pag.38
➤ Bibliografia	pag. 48
➤ Appendice	pag. 57

INTRODUZIONE

Caratteristiche biochimiche delle pentraxine

Le Pentraxine sono proteine di fase acuta conservatesi durante l'evoluzione fino all'uomo. Il termine pentraxina indica la caratteristica struttura multimerica ciclica a cinque unità tenute insieme da legami non covalenti.

Strutturalmente si distinguono pentraxine a catena corta ed a catena lunga. Tutte condividono un caratteristico dominio C-terminale (pentraxin domain) di 200 aminoacidi che presenta al suo interno 8 aminoacidi altamente conservati (pentraxin signature) (Figura 1). In termini generali le proteine della famiglia delle pentraxine svolgono funzioni nella immunità innata, la prima linea di difesa contro i patogeni.

Al gruppo delle pentraxine a catena corta appartengono l'amiloide sierica A (SAP) e la Proteina C-Reattiva (CRP). CRP è stata la prima pentraxina descritta negli Anni Trenta come prototipo di proteina di fase acuta nell'uomo; venne così chiamata per sua particolare abilità nel legare in modo Ca-dipendente il polisaccaride C dello Streptococco Pneumoniae (Tillet WS, 1930). SAP è l'equivalente di CRP umana nel topo. La principale fonte di CRP è rappresentata dagli epatociti, prevalentemente in risposta a IL-6 e IL-1, in condizioni infiammatorie o infettive. Anche i linfociti e i monociti/macrofagi sono capaci di sintetizzarla, ma apparentemente non contribuiscono ai livelli plasmatici di CRP (Szalai AJ, 1999).

Pentraxina 3 (PTX3)

Tra le Pentraxine a catena lunga Pentraxina 3 o TGS-14 (TNF-stimulated gene) è stata la prima ad essere descritta agli inizi degli anni Novanta (Lee GW, 1993; Alles V, 1994), quando un nuovo dominio fu identificato come gene inducibile da IL-1 nelle cellule endoteliali e come TNF gene inducibile nei fibroblasti.

PTX3, il prototipo delle pentraxine lunghe, è costituita da una parte C-terminale di 203 aminoacidi, dominio in comune con tutte le pentraxine, e da una sua caratteristica parte N-terminale di 178 aminoacidi che la rende una pentraxina appartenente alle pentraxine lunghe. Il gene codificante per questa proteina è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 3 (3q25) ed è organizzato in tre esoni: il primo ed il secondo esone codificano

rispettivamente il segnale peptidico e la parte N-terminale, il terzo esone codifica per la parte C-terminale. Più protomeri di PTX-3 del peso di 45 kDa si associano tramite ponti disolfuro per dare origine alla forma multimerica definitiva costituita da 10 unità (440 kDa).

PTX3 possiede caratteristiche specifiche e ligandi specifici che la differenziano dalle pentraxine corte e dalle altre pentraxine lunghe descritte. Viene espressa a bassissimi livelli dal fegato, a differenza di CRP, e non viene costituzionalmente espressa dal sistema nervoso centrale, a differenza delle pentraxine lunghe, se non in seguito a stimoli infiammatori. I diversi siti di espressione tissutale ne giustificano i vari ruoli, particolarmente eterogenei. PTX-3 è una proteina multifunzionale a cavallo fra l'immunità innata, il processo infiammatorio, la deposizione della matrice e la fertilità femminile (Garlanda C, 2004).

In vitro questa proteina è sintetizzata da diversi tipi cellulari in seguito a stimoli proinfiammatori (Mantovani A, 2003): cellule endoteliali, fibroblasti, monociti/macrofagi, cellule dendritiche e cellule muscolari lisce. I principali stimoli infiammatori alla sintesi di PTX-3 sono rappresentati da segnali quali IL-1, TNF e componenti microbiche, come lipopolisaccaridi (Breviario et al, 1992; Vouret-Craviari V, 1997). IL-6 sembra essere uno scarso induttore di PTX-3. IFN- γ , al contrario, ne inibisce la sintesi (Polentarutti N, 1998).

Le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce rilasciano in risposta a stimoli infiammatori notevoli quantità di PTX-3, in particolare in risposta a lipoproteine a bassa densità (LDL) ossidate. In placche aterosclerotiche umane sono stati identificati molti macrofagi, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce sede di sintesi di PTX3.

I ligandi specifici per questa proteina sono molteplici, del tipo calcio indipendenti, in parte in comune ed in parte differenti da quelli delle pentraxine classiche a catena corta. Il primo descritto è rappresentato dalla componente C1q del complemento (Bottazzi BI, 1997; Nauta AJ, 2003), ligando in comune con CRP: l'interazione tra PTX-3 e C1q induce l'attivazione della via classica, come dimostrato dall'aumento della deposizione di C3 e C4. Inoltre, come CRP e SAP, PTX3 lega le cellule apoptotiche opsonizzandole; in questo modo ne regola e facilita la loro clearance da parte di cellule dendritiche scavenger. Specifici ligandi di PTX3 sono particolari patogeni come *Aspergillus*

fumigatus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhirium, Paracoccidioides brasiliensis (Garlanda C, 2002). Fibroblast growth factor 2 (FGF2) rappresenta un altro ligando di PTX-3, la cui interazione ne provoca il blocco dell'attività angiogenetica in vivo ed in vitro (Rusnati M, 2004).

L'eterogeneità dei siti di espressione di questa proteina ed i molteplici ligandi giustificano l'eterogeneità delle funzioni di questa proteina: PTX3 è una proteina multifunzionale a cavallo dell'immunità innata, del processo infiammatorio, della deposizione della matrice e della fertilità femminile.

Funzioni di Pentraxina 3

Immunità innata: PTX3 svolge una funzione nella resistenza a patogeni specifici. Topi knock-out per PTX3 (PTX3^{-/-}) si sono dimostrati sensibili all'aspergillosi polmonare massiva, in termini di mortalità, colonizzazione cerebrale e polmonare. La mancata presentazione dell'antigene dell'Aspegillus Fumigatus da parte di PTX3 ai macrofagi ed alle cellule dendritiche giustifica l'alterata risposta innata (Garlanda C, 2002). Questo studio sui topi geneticamente modificati suggerisce che PTX3, diversamente dalle pentraxine a catena corta prodotte dal fegato, svolge un ruolo di amplificazione nella resistenza innata contro patogeni, principalmente a livello locale nel sito di infezione.

Fertilità: PTX3 rientra nell'assemblamento della matrice extracellulare interagendo con la sua componente ialuronica, rendendo stabile la matrice extracellulare stessa. Nei topi PTX3 è sintetizzata dalle cellule del cumolo ooforo durante la sua espansione e si lega a formare complessi multimolecolari a TGS-6 (Salustri A, 2004). In topi knock-out per PTX3 (PTX3^{-/-}) la fertilità risulta compromessa a causa della instabilità della matrice extracellulare, che riveste un ruolo importante nell'interazione con gli spermatozoi. (Salustri A, 2004).

Infiammazione: i valori di PTX3, che in condizioni normali presentano basse concentrazioni plasmatiche (<25 ng/ml nel topo, <2 ng/ml nell'uomo), aumentano consistentemente e rapidamente nello shock endotossico, nella

sepsi e in altre situazioni infiammatorie autoimmuni, come vasculiti dei piccoli vasi e artrite reumatoide (Peri et al, 2000).

In alcune di queste condizioni i livelli di PTX3 correlano con l'attività e la severità della malattia. In vivo il ruolo di PTX3 è stato studiato in topi transgenici in cui si è indotta una sintesi di PTX3 in eccesso: i topi hanno mostrato un'aumentata resistenza all'endotossinemia provocata da LPS ed alla sepsi indotta (Dias AA et al, 2001).

Il ruolo di PTX3 nei processi infiammatori è stato confermato da studi su colture di cellule muscolari lisce provenienti da arterie umane sane messe in incubazione con lipoproteine modificate aterogeniche (Klouché M, 2004), da cellule di placche aterosclerotiche carotidiche (Rolph MS, 2002) e da miociti di pazienti colpiti da infarto miocardico acuto (IMA) (Peri et al, 2000; Latini R, 2004).

Lo studio di Klouché et al. dimostra la capacità delle cellule muscolari lisce vascolari di esprimere PTX-3 dopo incubazione con lipoproteine aterogeniche, la cui interazione conduce ad una reazione di fase acuta locale: questi dati suggeriscono un contributo di tale proteina alla patogenesi infiammatoria dell'aterosclerosi.

Lo studio di Rolph et al. paragona l'espressione di PTX3 da parte di cellule prelevate da arterie aterosclerotiche e da arterie sane: le cellule di placche aterosclerotiche, in particolar modo cellule endoteliali e macrofagi e in minor misura cellule muscolari lisce, esprimono rilevanti concentrazioni di PTX3, rispetto agli stessi tipi cellulari appartenenti ad arterie sane che non ne esprimono. Peri et al. dimostrano la presenza di PTX3 nei miociti sani, l'assenza in miociti necrotici ed in particolare l'aumento plasmatico precoce della proteina in episodi di infarto miocardico acuto (IMA), ipotizzando un rilascio della proteina dai miociti morenti nel versante plasmatico. In tal senso PTX3 potrebbe rappresentare un indicatore precoce di danno irreversibile dei miociti nella cardiopatia ischemica.

L'incremento plasmatico in vivo di PTX3 in seguito a IMA è stato analizzato anche nello studio di Latini et al in cui livelli plasmatici più elevati sembrano predire esiti più infausti a lungo termine.

Tutti questi studi condotti su patologie, in cui il processo infiammatorio ha un ruolo patogenetico fondamentale, evidenziano un'aumento di sintesi di PTX3 di origine tissutale locale, suggerendo un ruolo importante di PTX3 a livello periferico.

Patologie della gravidanza: il ritardo di crescita intrauterino e la preeclampsia.

La preeclampsia ed il ritardo di crescita intrauterino (IUGR) sono due disordini specifici della gravidanza che condividono un'alterazione dell'impianto placentare, anche se le manifestazioni materno-fetali di queste patologie possono essere profondamente differenti. (Kaufmann P, 2003, Tjoa 2004).

Ritardo di crescita intrauterino (IUGR)

Il ritardato accrescimento intrauterino (IUGR) è una sindrome caratterizzata da un'alterazione della crescita fetale la cui velocità di crescita è ridotta rispetto ai normali standard di riferimento per epoca gestazionale, che colpisce circa l' 8% delle gravidanze (Pollack RN, 1992). Lo IUGR viene diagnosticato in utero in seguito al riscontro ecografico di una circonferenza addominale fetale inferiore al 10[^] percentile rispetto ai valori di riferimento per feti di pari epoca gestazionale (Parazzini F, 1991) oppure in base alla riduzione della misura longitudinale della circonferenza addominale di almeno 40 percentili rispetto ai valori precedenti (Todros T, 1987). Lo IUGR, riconosciuto ecograficamente in utero, viene confermato al momento del parto sulla base degli standard di peso per epoca gestazionale della popolazione di riferimento.

La patologia si evidenzia generalmente nella seconda parte della gravidanza, quando il rapporto tra peso placentare e peso fetale si riduce progressivamente a sfavore della placenta e la velocità di crescita fetale aumenta, così che l'apporto di ossigeno e di nutrienti può non essere più sufficiente per le esigenze fetali (Pardi et al, 2002).

Nella maggior parte dei casi il ritardo di crescita fetale è conseguenza di un'insufficienza placentare (Pardi G, 2002). Questa teoria si fonda sull'ipotesi che la difettosa nutrizione del feto dipenderebbe da un alterato sviluppo della

placenta stessa o da un'alterazione della sua funzione o da entrambe (Pardi et al, 2002).

Frequente è il riscontro di un ridotto volume placentare o di infarti di cotiledoni che riducono la superficie di scambio tra madre e feto. Questi riscontri sono spesso associati a patologie della gravidanza caratterizzate da alterazioni emodinamiche dovute ad ipertensione cronica o a preeclampsia.

Il ritardo di crescita intrauterino è una grave complicanza ostetrica che può avere ripercussioni sulla vita intrauterina esponendo il feto in caso di scompenso a maggior rischio di morte fetale, parto pretermine, sofferenza fetale. Come tale la patologia rappresenta un' importante causa di morbilità e mortalità perinatale. Conseguenze perinatali e neonatali (distress respiratorio, malattia delle membrane ialine, danni vascolari cerebrali, disfunzioni cognitive e paralisi cerebrali) (Berkowitz et al, 1990; Bernstein IM, 2000; Chard T et al, 1993; Villar J, 1990; Gortner L, 1999) rendono i neonati con questo disordine soggetti ad un maggiore rischio di sviluppare handicaps nell'infanzia (Barker DJP, 1998).

Inoltre numerosi studi epidemiologici hanno mostrato che il ritardo di crescita intrauterino predispone allo sviluppo in età adulta di malattie metaboliche e cardiovascolari, quali diabete mellito ed ipertensione arteriosa (Barker DJP, 1998).

Preeclampsia

La preeclampsia è una patologia che colpisce approssimativamente il 5-8% delle gravidanze (Cunningham et al, 2001). Le tipiche manifestazioni cliniche di questa malattia comprendono ipertensione arteriosa dopo la 20^a settimana di gestazione associata a proteinuria, a cui possono essere associati diversi gradi di danno d'organo periferico di tipo ischemico che colpiscono rene, fegato e sistema nervoso centrale sottoforma di crisi eclamptica e sindrome HELLP (Elevated Liver Enzymes Low Platelets) (Sibai BMI, 1993).

Spesso la patologia che si evidenzia nel compartimento materno ha anche ripercussioni sul versante fetale, associandosi ad alterazioni della crescita fino a sfociare nel ritardo di crescita vero e proprio.

I fattori di rischio associati a questa sindrome sono svariati: nulliparità, gravidanze multiple, preeclampsia nelle precedenti gravidanze, ipertensione cronica arteriosa e/o diabete pregravidici, patologie vascolari o dei tessuti connettivi, nefropatie, sindrome da anticorpi antifosfolipidi, obesità, età avanzata, razza nera (Walker JJ, 2000; Cunningham et al, 2001; Sibai BM, 2000; Code-Agudelo et al, 2000).

Placentazione anomala e stato infiammatorio nella preeclampsia e nel ritardo di crescita intrauterino.

Il ritardo di crescita intrauterino e la preeclampsia sono quindi complicanze che possono manifestarsi singolarmente o coesistere e che hanno in comune l'insufficienza placentare. Recentemente è stato inoltre ipotizzato che le due patologie originino da una comune predisposizione ad una disfunzione endoteliale materna (Khong TY, 1986, Roberts JM, 1989) che espone le donne con gravidanze complicate da preeclampsia e/o IUGR ad un più elevato rischio cardiovascolare nella vita futura ed in particolare di ipertensione nelle donne con gravidanze complicate da ritardo di crescita intrauterino (Smith GC, 2000, Smith GC, 2002, Lawlor DA, 2002). Spesso le donne che sviluppano preeclampsia sono portatrici di preesistenti fattori di rischio subclinici per malattie cardiovascolari, quali obesità, insulino-resistenza, iperglicemia, iperlipidemia, coagulopatie (Wolf M, 2001). Si tratta di fattori di rischio che nel loro insieme definiscono la cosiddetta sindrome metabolica. Fattori di rischio noti per preeclampsia/IUGR che coinvolgono disfunzioni endoteliali includono età avanzata, ipertensione (Rey E, 1994), malattie renali, malattie autoimmuni come lupus eritematoso sistemico (Meroni G, 2002) (Sibai BM, 1998).

Durante la gravidanza la disfunzione endoteliale materna preesistente contribuirebbe ad un inadeguato impianto placentare. L'anomala placentazione potrebbe determinare a sua volta un'eccessiva risposta endoteliale con rilascio di mediatori infiammatori e lo "slatentizzarsi" della sindrome metabolica, scatenando le manifestazioni cliniche della preeclampsia. In tal senso la preeclampsia, ed in particolare la tipica disfunzione endoteliale,

può essere considerata una patologia che deriva da un'eccessiva risposta infiammatoria alla gravidanza.(Redman CW, 2005). Il ritardo di crescita intrauterino probabilmente condivide con la preeclampsia il preesistente danno endoteliale, in assenza però di una sindrome metabolica materna, che quindi durante la gravidanza sfocia nella unica manifestazione fetale della malattia. Questa recente ipotesi proposta da Ness et al, coerente con i recenti studi che riportano il rischio di malattie cardiovascolari nella vita futura anche nelle donne con solo IUGR, forniscono un modello fisiopatologico comune alle due patologie della gravidanza (Ness RB,2006).

L'alterato processo di impianto che caratterizza la preeclampsia e lo IUGR è il risultato della sfavorevole interazione fra citotrofoblasto e arterie uterine spiraliformi, probabilmente come conseguenza della disfunzione endoteliale materna preesistente la gravidanza (Kaufmann P, 2003). Viene quindi a mancare la caratteristica trasformazione delle arterie spiraliformi in vasi ad alto flusso e bassa resistenza (venulizzazione) (Brosens I, 1967; Meekins JW, 1994), che garantirebbe un appropriato flusso ematico al feto tramite la circolazione uteroplacentare (Khong TY, 1986, Meekins JW, 1994). L'anomalo adattamento delle arterie uterine spiraliformi e la disregolazione dell'angiogenesi placentare indotta causa a sua volta un'anomala maturazione ed invasione del trofoblasto stesso, in seguito al persistere di fattori di trascrizione indotti dall'ipossia (HIF-hypoxia inducible factor). Verso la 7-8 settimana la bassa tensione di ossigeno, a cui è esposto il trofoblasto prima dell'interazione con le arterie spirali, inibisce il trofoblasto stesso ad assumere un fenotipo invasivo (Zhou Y, 1998, Redline RW, 1995). Come dimostrato da Redline et al. la preeclampsia è infatti caratterizzata istologicamente da un eccesso di trofoblasto proliferativo immaturo intermedio con deficitaria infiltrazione nella decidua superficiale. Tale disfunzione provoca una riduzione di invasione da parte delle cellule trofoblastiche delle arterie spirali, esponendo il feto ad un rischio di deprivazione di ossigeno e nutrienti. (Pijnenborg R, 1983; Meekins JW, 1994), come si è riscontrato in placentate di gravidanze complicate da preeclampsia e IUGR. I fattori di trascrizione indotti dall'ipossia (HIF) provocano a loro volta una disregolazione dell'angiogenesi placentare: si assiste infatti ad un netto squilibrio fra fattori proangiogenetici, principalmente VEGF e PlGF, e antiangiogenetici, VEGF-R o s-Flt1. Una upregolazione di

fattori antiangiogenetici è stata dimostrata sia nella placenta (Tsatsaris V, 2003) che nel siero di donne con preeclampsia e ritardo di crescita intrauterino.(Rajakumar A, 2004 Levine RJ, 2004).

L'ipossia dovuta alla ridotta perfusione placentare scatena a sua volta il rilascio di fattori infiammatori, come specie reattive dell'ossigeno e citokine, quali TNF α , IL6 e IL1. Nel loro insieme questi meccanismi accentuano le disfunzioni endoteliali materne e (Benyo,2001) sono alla base dell'attivazione della cascata del complemento, della cascata coagulativa, dell'attivazione piastrinica, e dei leucociti circolanti. Infatti i livelli plasmatici circolanti di alcune citokine e dei rispettivi recettori (IL-6, TNF- α) si sono dimostrati elevati in donne con preeclampsia e IUGR(Vince GS, 1997; Conrad KP, 1998). I livelli placentari di IL-6, TNF- α , IL-1, IL-1b, non risultano alterati (Benyo DF, 2001), suggerendo che effettivamente altri tessuti diversi dalla placenta, come lo stesso endotelio materno o i leucociti attivati, possano essere coinvolti nell'elevazione dei livelli plasmatici materni.

Recentemente diversi studi hanno dimostrato che le concentrazioni sieriche di TNF- α , IL1, IL6 e i loro recettori erano significativamente più elevati nel primo e secondo trimestre in donne che successivamente sviluppavano preeclampsia rispetto ai controlli (Williams MA, 1999; Sacks GP, 1998, Hamai Y, 1997). Questi risultati dimostrano che la perturbazione della regolazione delle citochine precede la manifestazione clinica della preeclampsia.

L'eccesso di molecole infiammatorie rilasciate nel I trimestre comporta l'attivazione di fattori infiammatori sistemici che sono all'origine di uno sbilancio fra fattori vasodilatanti e vasocostrittivi che nel III trimestre slatentizzano le manifestazioni cliniche della sindrome preeclamptica.

In base a questi studi tali patologie della gravidanza, che si manifestano clinicamente nel III trimestre di gravidanza, potrebbero quindi essere espressione tardiva di delicati fenomeni che avvengono durante l'impianto e la placentazione.

Studi sulle pentraxine nella gravidanza umana.

I primi studi condotti in gravidanza sulle pentraxine si erano focalizzati esclusivamente sulla pentraxina a catena corta, la proteina C-reattiva (CRP). In particolare ci si era concentrati sul possibile ruolo di CRP come molecola di infiammazione nella eziopatogenesi della preeclampsia. Citokine proinfiammatorie primarie rilasciate dal danno endoteliale stimolano la produzione di citokine secondarie, come IL-6 e TNF α , che a loro volta inducono il fegato al rilascio di proteine di fase acuta come CRP. I risultati di questi innumerevoli studi risultano contrastanti. Studi condotti nel I trimestre da Tjoa ML et al (2002) da Chunfang Q et al (2004) hanno riportato concentrazioni di CRP significativamente più elevate in donne che hanno successivamente sviluppato preeclampsia rispetto a gravidanze fisiologiche, suggerendo un'attivazione infiammatoria precoce in queste gravidanze. Inoltre è risultato esserci una correlazione significativa tra CRP ed il BMI pregravidico: aggiustando l'analisi statistica per il fattore BMI, l'associazione tra i livelli di CRP ed il rischio di preeclampsia risulta attenuato, ed in particolare nel gruppo di donne soprappeso (BMI>25) si mostra una perdita di significatività tra CRP e rischio di preeclampsia. Risultati opposti sono proposti da studi in cui si valutano diversi markers infiammatori sierici materni (CRP, TNF-, IL-1- β , IL-6, IL-10) nel II trimestre: le gravidanze che poi sono state complicate da preeclampsia o IUGR non hanno dimostrato valori significativamente differenti rispetto alle gravidanze che non si sono complicate (Savvidou et al, 2002; Djurovic S, 2002).

Più recenti risultano gli studi in vitro e parallelamente gli studi clinici sulla Pentraxina lunga PTX3.

Studi su animali hanno dimostrato un'espressione transitoria di PTX3 sul versante uterino durante la fase dell'impianto e che la delezione di questo gene provoca precoci interruzioni di gravidanza suggerendo che PTX3 gioca un ruolo fondamentale nell'impianto e nella decidualizzazione (Tranguch 2007). Studi sull'uomo, hanno dimostrato la presenza di PTX3 nell'endometrio recettivo della "finestra di impianto", e studi in vitro su colture di cellule trofoblastiche e uterine stromali hanno dimostrato l'up-regolazione di geni infiammatori, tra cui IL8 e PTX3 (Hess 2007, Popovici 2006). Ciò suggerisce

che il trofoblasto modifica l'ambiente immunitario della decidua per facilitare l'impianto regolando l'equilibrio citochine/chemochine.

Nel 2006 viene pubblicato il primo studio clinico condotto dal nostro gruppo su PTX3 e gravidanza. Il nostro gruppo fu il primo che cominciò ad indagare PTX3 in gravidanza presupponendo un ruolo di questa molecola infiammatoria nelle patologie di placentazione della gravidanza. Partendo dal presupposto che i livelli plasmatici di PTX3 aumentano in disordini vascolari, come ischemia cardiaca e vasculiti dei piccoli vasi, correlando con l'attività, la gravità e la prognosi della malattia e attribuendo un valore prognostico della pentraxina lunga PTX-3 nell'infarto miocardio acuto (Peri G, 2000), abbiamo cominciato ad indagarla in gravidanza. Poiché la preeclampsia condivide con il processo di aterogenesi la base infiammatoria, possiamo ipotizzare un ruolo di questa proteina nella disfunzione endoteliale tipica della preeclampsia e del ritardo di crescita intrauterino. Le proprietà biologiche e cliniche di PTX-3 ci fanno ipotizzare un suo possibile ruolo nelle patologie della gravidanza con una prominente disfunzione del compartimento vascolare.

Quel primo lavoro evidenzia che le concentrazioni plasmatiche di PTX3 nelle gravidanze non complicate erano significativamente più elevate che nelle donne non gravide nella fase follicolare del ciclo (vedi figura) e che i valori non si modificavano nei tre trimestri. Valori significativamente più elevati sono stati riscontrati nelle gravidanze complicate da preeclampsia rispetto alle gravidanze normali a pari epoca gestazionale. Le gravidanze complicate da IUGR presentavano valori intermedi fra le gravidanze non complicate e quelle complicate da preeclampsia, ma la differenza non risultava statisticamente significativa rispetto alle gravidanze normali. Nessuna differenza statisticamente significativa era stata riscontrata in correlazione con la severità della preeclampsia. L'analisi immunoistochimica rivelò la presenza di PTX3 nel tessuto placentare, senza differenze di distribuzione nelle gravidanze normali e in quelle complicate. Sia in casi che controlli PTX3 è stata identificata nello stroma di villi stem e villi di ancoraggio in modo preponderante. Minor segnale è stato identificato nella matrice di alcuni villi terminali.

Analoghi risultati plasmatici materni in donne con preeclampsia conclamata sono stati riscontrati da Rovere et al, dimostrando inoltre correlazione con la

severità della preeclampsia. Sono inoltre state costruite delle curve di riferimento per PTX3 in gravidanze normali (Larrson 2011) nella diverse epoche gestazionali. Un recente studio ha dimostrato una associazione significativa tra PTX3, fattori antiangiogenetici e alterata funzionalità endoteliale: un rapporto aumentato sFlt/PIGF e livelli elevate di PTX3 è stato identificato in donne con preeclampsia, specialmente con preeclampsia ad insorgenza precoce prima delle 34 settimane (Hamad 2011).

Inoltre un recente studio condotto dal nostro gruppo ha dimostrato un valore predittivo di PTX3 sin dal primo trimestre di gravidanza: i livelli plasmatici materni di PTX3 a 11-14 settimane risultano già alterati e significativamente più elevati in donne che successivamente svilupperanno preeclampsia rispetto a gravidanze con esito normale. (Cetin 2008). Gli stessi dati sono stati riportati da Nikolaidis et al nel 2009.

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è stato:

1. investigare e confermare su una più ampia casistica i livelli di PTX3 plasmatici in gravidanze complicate da preeclampsia e ritardo di crescita intrauterino (IUGR) e valutare la possibile correlazione con la severità clinica di tali patologie.
2. studiare i pattern e i siti di espressione di PTX3 tramite immunisto chimica su placenta, decidua e peritoneo materno in gravidanze normali, complicate da preeclampsia e ritardo di crescita intrauterino.
3. investigare i livelli plasmatici di PTX3 nel compartimento vascolare fetale in feti di gravidanze normali e gravidanze complicate.
4. identificare un potenziale ruolo causale di PTX3 nella disfunzione endoteliale tipica della preeclampsia e poter identificare quindi un marker precoce di gravidanze complicate per lo sviluppo di un adeguato monitoraggio clinico e terapeutico.

MATERIALI E METODI

Questo studio è stato condotto presso la Clinica Ostetrica e Ginecologica “L. Mangiagalli” e presso L’Unità di Ostetricia e Ginecologia dell’Ospedale “L. Sacco”, in collaborazione con il Laboratorio di Ricerche di Immunologia e Infiammazione -Istituto Clinico Humanitas- e l’Unità di Patologia L. Sacco- Dipartimento di Scienze Cliniche- Università degli Studi di Milano. Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico di entrambi gli ospedali. Tutte le pazienti hanno firmato un consenso informato.

Popolazione

La popolazione dello studio consiste in:

- 50 gravidanze fisiologiche (AGA)
- 53 gravidanze complicate da preeclampsia (PE)
- 43 gravidanze complicate da ritardato accrescimento intrauterino (IUGR)

Solo gravidanze singole sono state incluse. L’epoca gestazionale delle pazienti gravide è stata calcolata sulla base dell’ultima mestruazione e successivamente confermata da un’ecografia ostetrica tra 11 e 13 settimane (Hadlock).

Sono state reclutate come gravidanze fisiologiche (AGA) pazienti che presentavano una gravidanza a decorso non complicato e normale crescita fetale intrauterina.

Criteri di esclusione di questo gruppo sono state patologie materne preesistenti alla gravidanza, patologie materne insorte in gravidanza, terapie mediche, tutti fattori che potenzialmente potessero influenzare l’outcome della gravidanza e la crescita fetale.

La crescita fetale è stata documentata ecograficamente in utero e confermata da un peso alla nascita compreso tra il 10[^] ed il 90[^] percentile per gli Standards Italiani di peso ed epoca gestazionale (Parazzini F, 1991).

Tutte le pazienti del gruppo controllo hanno espletato il parto a termine di gravidanza, tra la 37[^] e la 42[^] settimana di gravidanza, con nascita di neonati sani con adeguato peso appropriato per l’epoca gestazionale. 25 su 50 delle gravidanze hanno espletato il parto tramite taglio cesareo a causa di presentazione fetale podalica o per pregressi tagli cesarei.

Sono state reclutate come appartenenti al gruppo preeclampsia 53 pazienti con ipertensione indotta dalla gravidanza associata a proteinuria, in seguito al riscontro dei criteri diagnostici stabiliti dall'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG Practice Bulletin, 2002), come descritto in appendice.

I casi sono stati suddivisi per gravità clinica in lieve e severa, in base alla classificazione stabilita dall'ACOG Practice Bulletin (2002)- vedi appendice.

Sono state reclutate come gravidanze complicate da ritardato accrescimento intrauterino 43 pazienti in seguito al riscontro ecografico di una circonferenza addominale fetale inferiore al 10° percentile rispetto ai valori di riferimento per feti di pari epoca gestazionale oppure riduzione della misura longitudinale della circonferenza addominale di almeno 40 percentili (*Todros et al, 1987*), confermato alla nascita da un peso inferiore al 10[^] percentile rispetto agli Standards Italiani di peso ed epoca gestazionale (Parazzini F, 1991). Alla nascita tutti i feti IUGR avevano un cariotipo normale e non presentavano malformazioni maggiori.

Tutte le pazienti con sintomi di infezione genitale o sistemica sono state escluse dallo studio.

La tabella 1 mostra le caratteristiche cliniche materne e gli esiti delle gravidanze dei gruppi preeclampsia e IUGR paragonati alle gravidanze normali del III trimestre. Le mamme con gravidanze complicate da preeclampsia e IUGR erano significativamente più vecchie di quelle con gravidanze normali ($p < 0.01$ e $p < 0.05$, rispettivamente). Il BMI pre-gravidico delle donne con preeclampsia era significativamente più elevato che in donne normali ($p < 0.001$). Come atteso, le gravidanze complicate da preeclampsia e IUGR hanno partorito in epoca gestazionale significativamente più precoce delle gravidanze normali ($p < 0.001$) e sempre tramite taglio cesareo a causa della compromissione fetale o indicazione materna, secondo i nostri protocolli clinici. I pesi fetali e placentari erano significativamente inferiori nei gruppi preeclampsia e IUGR, paragonati alle gravidanze normali ($p < 0.001$).

Metodologia:

Campionamento plasmatico nel compartimento materno, fetale e determinazione di PTX3.

I campioni ematici materni sono stati raccolti in 50 gravidanze fisiologiche al momento della abituale visita nell'ambulatorio ostetrico. I campioni di gravidanze complicate da PE (n=53) e IUGR (n=43) sono stati raccolti al momento della diagnosi della patologia, prima di iniziare la terapia antiipertensiva o maturazione polmonare fetale. Fra le 53 gravidanze complicate da PE, 35 presentavano PE severa e 18 PE lieve. Fra le PE severe 10 casi erano ulteriormente complicati da HELLP e 20 presentavano anche ritardo di accrescimento intrauterino. L'epoca gestazionale al campionamento era sovrapponibile in gravidanze normali e in gravidanze complicate. I campioni materni sono stati raccolti ad un'epoca gestazionale media di 33.4 ± 3.6 settimane in gravidanze normali, 31.7 ± 3.7 settimane nel gruppo in PE, 32.4 ± 4.1 settimane nel gruppo IUGR. I campioni ematici materni sono stati ottenuti da prelievi della vena brachiale in condizioni di digiuno.

I campioni di sangue fetale sono stati raccolti dal cordone ombelicale al momento del taglio cesareo in 26 gravidanze normali, in 26 complicate da PE e 23 complicate da IUGR.

I campioni di sangue venoso materno e fetale sono stati raccolti in provette con EDTA (AcidoDietilAminoTetraAcético). I campioni di plasma sono stati ottenuti mediante centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti a 4°C e conservati a -80° fino alla successiva analisi.

La valutazione delle concentrazioni di PTX3 è stata eseguita con test immunoenzimatico ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay).

Le piastre di ELISA, sono state rivestite con 100ng/pozzetto da anticorpi monoclonali anti-PTX3 di ratto diluiti in soluzione (15 mM carbonato, $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$, ph 9,6), sono state incubate una notte a 4°C. Successivamente sono state lavate con una soluzione di lavaggio (Dulbecco 0,05%-20) a cui sono stati aggiunti 300µl di latte secco al 5% per bloccare i siti di legame non specifici.

Sono stati aggiunti in doppio 50µl di PTX3 ricombinante umana (100pg/ml-2ng/ml) e campioni sconosciuti, con successiva incubazione per 2h a 37°C. Dopo 3 passaggi con soluzione di lavaggio, 25ng/pozzetto di IgG anti-PTX3 di topo purificati e coniugati con biotina sono stati aggiunti per 1h a 37°C. I pozzetti sono stati accuratamente lavati e incubati con 100µl di soluzione di Streptavidina-perossidasi coniugata con destrano, diluita a 1:4000 per 1h a temperatura ambiente.

Dopo incubazione le piastre sono state lavate per 4 volte e sono stati aggiunti 100µl di TMB cromogeno. I valori di assorbimento sono stati letti ad una lunghezza d'onda pari a 405nm in un lettore automatico ELISA.

Immunoistochimica

I pattern e i siti di espressione di PTX3 sono stati studiati tramite immunoistochimica su campioni di placenta, peritoneo parietale e letto deciduale, ottenuto in seguito al secondamento tramite curette, di gravidanze normali, complicate da preeclampsia e IUGR al momento del taglio cesareo. Tessuti placentari, deciduali e peritoneali sono stati analizzati in 8 gravidanze normali e in 27 gravidanze complicate (14 IUGR e 13 PE). Il patologo prima della lettura non era a conoscenza del gruppo a cui appartenevano i campioni. I campioni sono stati fissati in formalina ed inclusi in paraffina; sono state allestite sezioni colorate con ematossilina-eosina per la valutazione istologica. Per l'analisi immunoistochimica sono state tagliate sezioni di inclusi paraffinati di 3 micron e montate su vetrini Superfrost (BIO-Optica, Milano, Italia); dopo la rimozione delle cera in xilene e la reidratazione in etanolo, le sezioni sono state pretrattate tramite passaggio in un forno a microonde (2 cicli per 5 minuti ognuna a 780 W in 0.01M di tampone citrato) e incubati per 2 ore con una immunoglobulina G di topo purificata ed ad alta affinità per PTX3 umana. Le reazioni sono state rilevate tramite un sistema nonbiotina perossidasi di identificazione con 3,3' diaminobenzidina baselibera come cromogeno. I controlli negativi sono stati ottenuti con l'omissione dell'anticorpo primario.

L'intensità e la distribuzione di PTX3 è stata valutata usando una scala semiquantitativa con valori da 0 a 3: 0=no segnale, 1=segnale debole e distribuzione di PTX3 focale (positività in <25% dell'area

tissutale/componente cellulare), 2=segnale di PTX3 moderato (positività in 25-50% dell'area tissutale/componente cellulare), 3= segnale intenso e distribuzione diffusa di PTX3 (positività in <50% dell'area tissutale/componente cellulare).

Analisi statistica

I dati che riguardano le caratteristiche cliniche della popolazione sono presentati come $\text{media} \pm \text{deviazione standard}$; la significatività delle differenze tra i gruppi in studio è stata calcolata con il t test di Student per campioni non appaiati. I risultati di PTX3 in gravidanze normali e gravidanze complicate da preeclampsia e da IUGR sono presentati come valori mediani con i rispettivi range interquartili e paragonati con il test non parametrico Mann-Whitney U test. Gli score immunostochimici di PTX3 in gravidanze normali e complicate sono paragonati tramite il test non parametrico Mann-Whitney U test. Le differenze sono state considerate statisticamente significative con $p < 0.05$. Le analisi di regressione lineare sono state condotte tramite il metodo dei quadrati.

RISULTATI

Livelli plasmatici materni di PTX3 in gravidanze normali e complicate da preeclampsia e ritardato accrescimento intrauterino.

La tabella 2 e la figura 4 presentano i valori plasmatici materni di PTX3 in gravidanze complicate da PE e IUGR rispetto a gravidanze normali espressi come valori mediani e range interquartili, rispettivamente. Le pazienti con PE e IUGR presentano concentrazioni di PTX3 significativamente più elevati rispetto a gravidanze normali ($p < 0.001$). Le gravidanze complicate da PE presentano valori significativamente più elevati rispetto anche alle gravidanze complicate da IUGR ($p > 0.001$).

Fra le pazienti preeclamptiche, la preeclampsia severa presenta valori significativamente più elevati rispetto alla lieve (33.1 vs 17.1 ng/ml $p < 0.001$).

Fra i casi di PE severa, le pazienti ulteriormente complicate da HEELP mostrano valori significativamente più elevati rispetto alle pazienti con PE severa senza HEELP (40.0 vs 31.3 ng/ml $p < 0.001$), come mostrato in Figura 5.

Fra i casi di PE severa, quelli senza IUGR presentano livelli di PTX3 significativamente più elevati rispetto a quelli con anche IUGR (39.0 vs 26.0 ng/ml). Non è stata dimostrata nessuna correlazione fra PTX3 e il BMI materno.

Livelli di PTX3 venoso ombelicale in gravidanze normali e gravidanze complicate da preeclampsia e ritardato accrescimento intrauterine.

La tabella 2 e Figura 6 presentano i livelli ombelicali venosi di PTX3 in gravidanze complicate da PE e IUGR rispetto a gravidanze normali espresso come valori mediani e range interquartili. Le concentrazioni fetali non erano statisticamente differenti in gravidanze complicate da PE rispetto a gravidanze normali, indipendentemente dalla severità della preeclampsia o dalla presenza di IUGR. Comunque, i feti IUGR senza preeclampsia materna mostrano livelli plasmatici significativamente più elevati rispetto a feti normali

e con PE ($p < 0.01$). Suddividendo ulteriormente i feti IUGR per severità, I feti con PI alterato in arteria ombelicale. Inoltre un trend verso valori più elevati si è dimostrato in correlazione con la severità, seppur la differenza non risulti statisticamente significativa (valori mediani rispettivamente di : 2.6 ng/ml (1.7-5.1), 4.5 ng/ml (4.2-6.4), 5.1 (3.8-12) in IUGR tipo 1, tipo 2, and tipo 3).

Nessuna correlazione è stata riscontrata con l'epoca gestazionale al campionamento.

In 48 casi abbiamo analizzato la coppia mamma-feto campionata al momento del taglio cesareo. In tutti questi casi i valori fetali di PTX3 erano sempre più bassi dei corrispettivi materni.

Inoltre, una relazione significativa è stata osservata fra i livelli di PTX3 venosi ombelicali e I plasmatici materni nell'intera popolazione ($p < 0.05$ $R^2 = 0.09$). Se i dati sono analizzati separatamente, la relazione rimane statisticamente significativa solo per gravidanze normali ($n = 17$; $p < 0.05$ $R^2 = 0.1$) e per gravidanze complicate da preeclampsia ($n = 19$; $p < 0.05$ $R^2 = 0.028$), ma non in quelle complicate da IUGR ($n = 12$).

Immunoistochimica di PTX3 su tessuti materni e placentari

Abbiamo analizzato l'espressione di PTX3 in placenta ($n = 32$), decidua ($n = 22$) e nel peritoneo ($n = 27$) di gravidanze normali e complicate da PE e IUGR. Il segnale di PTX3 è stato osservato in tutti i casi, con un pattern di distribuzione prevalentemente extracellulare. Nessun segnale di pTX3 è stato osservato in controlli negativi, sia usando PTX3 ricombinante sia omettendo l'anticorpo primario.

La Figura 7 mostra il segnale di PTX3 nel tessuto placentare e materno. Nella placenta e nella decidua PTX3 è stata localizzata nell'interstizio di villi stem, di villi terminali (pannelli A,D,G) e nello stroma deciduale (pannelli B,E,H). PTX3 è inoltre stata riscontrata nei villi di ancoraggio e nelle membrane fetali. Anche rari macrofagi e fibroblasti esprimono PTX3, mentre le cellule endoteliali, le ghiandole endometriali, il sincizio trofoblasto e le cellule deciduali trofoblasti che erano costantemente negative per PTX3 (pannelli J e K).

L'analisi immunohistochimica sul peritoneo materno mostra espressione di PTX3 nello stroma sottostante il mesotelio (pannelli C,F,I9 e nell'endotelio (pannello L), rari fibroblasti, macrofagi e alcuni adipociti (pannello I).

Una valutazione semiquantitativa e l'analisi statistica rivelano che il numero di vasi positivi era significativamente più elevati nell'endotelio peritoneale di gravidanze complicate da PE e IUGR rispetto a gravidanze normali(1.12 vs 1.55, $p=0,05$). Nessuna differenza di espressione di PTX3 intermini di localizzazione e intensità erano dimostrati in placenta, decidua e peritoneo materno in casi normali versus casi patologici (placenta: 2.25 vs 2.12, $p=0.78$; decidua: 2.2 vs 2.0 $p=0.68$; peritoneo: 2.12 vs 2.26 $p=0.80$).

DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo preso in considerazione l'ipotesi che PTX3 potesse rappresentare un potenziale marcatore di danno endoteliale per gravidanze complicate da preeclampsia e ritardato accrescimento intrauterino. I risultati confermano precedenti studi del nostro gruppo e di Rovere et al, ma in una più ampia casistica, dimostrando una correlazione con la severità della patologia.

I livelli plasmatici di PTX3 nel plasma materno si sono confermati significativamente più elevati in gravidanza complicate da preeclampsia e ritardo di crescita intrauterino rispetto a gravidanza non patologiche a pari epoca gestazionale. Se i precedenti studi sia in vitro che in vivo, si sono focalizzati sul ruolo di questa molecola infiammatoria in condizioni che coinvolgono il sistema infiammatorio sistemico, come le infezioni, la sepsi, la fertilità, l'aterosclerosi, e l'infarto miocardico acuto. (Garlanda C, 2005; Latini R, 2004), noi dimostriamo che PTX3 svolge un ruolo in alcune patologie della gravidanza. Questi risultati sono in linea con l'ipotesi che la preeclampsia rappresenti la manifestazione clinica di una disfunzione endoteliale materna preesistente alla gravidanza, come espressione di una eccessiva risposta infiammatoria materna alla gravidanza stessa. Il danno endoteliale materno comporta un'alterata interazione fra compartimento materno e fetale al momento dell'impianto, provocando il rilascio di e l'attivazione di molecole infiammatorie, come citochine e fattori di crescita (IL-1, TNF α)(Ness RB,2006). Lo sbilancio fra molecole vasodilatatrici e vasocostrittive sarebbe alla base delle manifestazioni cliniche della preeclampsia. Sulla base dei nostri risultati PTX3 potrebbe rappresentare una molecola coinvolta in questo delicato e complesso equilibrio.

Precedenti studi hanno dimostrato in vitro una rilevante espressione di PTX3 da parte di macrofagi, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce di placche aterosclerotiche di arterie malate rispetto a vasi sani (Klouché 2004, Rolph MS, 2002). PTX3 lega FGF2 e svolge il suo ruolo sulla parete dei vasi inibendo il processo di angiogenesi (Rusnati, Camozzi). Siccome la preeclampsia condivide con il processo di aterosclerosi una base infiammatoria, possiamo ipotizzare un ruolo di questa molecola nella disfunzione endoteliale tipica della preeclampsia. L'anomalo assetto pro infiammatorio materno dovuto a IL1 e

TNF a precedentemente dimostrato in gravidanze che manifesteranno preeclampsia (Williams, sacks) potrebbe essere responsabile dell'incremento di PTX3 riscontrato in questo studio. Sia il danno endoteliale materno che l'eccesso di LDL ossidate, che sono potenti induttori di PTX3, potrebbero provocare l'innalzamento dei livelli plasmatici di PTX3. (Garlanda Ann Rev Immunol 2005). Recentemente Hamad inoltre ha riportato una associazione significativa tra PTX3 e s-Flt-1/PIGF ratio, specialmente in donne con esordio precoce di preeclampsia.

Inoltre il nostro studio evidenzia che anche le gravidanze complicate da ritardo di crescita intrauterino, ma non da preeclampsia, presentano livelli di PTX3 significativamente superiori dei controlli di pari epoca gestazionale ma inferiori rispetto ai casi di preeclampsia.

Tale risultato è in linea con la recente ipotesi proposta da Ness et al: il ritardo di crescita intrauterino potrebbe condividere con la preeclampsia un preesistente danno endoteliale materno, seppur più moderato ed in assenza di una sindrome metabolica materna, che quindi durante la gravidanza sfocia nella unica manifestazione fetale della malattia. Mentre l'iposviluppo fetale è una tipica manifestazione del danno placentare sul versante fetale, conducendo ad una ripercussione sul versante fetale, la preeclampsia coinvolge più spiccatamente il compartimento materno. I livelli significativamente più bassi di PTX3 riscontrati quando la preeclampsia è associata al ritardo di crescita intrauterino, paragonati alla preeclampsia pura, conferma che questa proteina possa essere più espressione di danno endoteliale materno sistemico che danno placentare. Queste ipotesi sono in linea con i dati dell'immunoistochimica su placente e decidua di gravidanze normali, complicate da preeclampsia ed iposviluppo: la distribuzione tissutale e la positività non mostrano differenze di espressione di PTX3 fra normali e patologici. Sorprendenti sono i risultati sul peritoneo parietale materno: la più spiccata positività dell'endotelio materno nei casi di preeclampsia rispetto a gravidanze normali, suggerisce effettivamente che PTX3 possa essere coinvolta preminentemente nel danno endoteliale materno sistemico preesistente alla gravidanza, piuttosto che nel danno endoteliale locale all'interfaccia materno-fetale.

In questo studio per la prima volta dimostriamo livelli plasmatici di PTX3 nel feto. I risultati suggeriscono che tale proteina è presente nel sangue fetale alla

nascita e che i livelli sono sempre inferiori che nel compartimento materno. I livelli fetali di PTX3 risultano significativamente più elevati nei ritardi di crescita intrauterina che in gravidanze normali. Inoltre sembra che i livelli di PTX3 aumentino, seppur in modo non significativo in relazione alla severità del ritardo di accrescimento intrauterino. Un limite di questo studio è rappresentato dal relativamente piccolo numero di casi per sottogruppo quando il gruppo IUGR viene ulteriormente suddiviso per severità.

La differenza significativa tra feti IUGR e normali non è dovuta alla differente epoca gestazionale, non vi è infatti correlazione tra PTX3 ed epoca gestazionale. Inoltre il gruppo feti con mamme preeclampatiche, che ha valori sovrapponibili ai feti normali, presenta livelli significativamente più bassi del gruppo IUGR nonostante simili epoche gestazionali alla nascita e di campionamento.

I feti IUGR con preeclampsia materna presentano livelli di PTX3 simili ai feti normali, sottolineando una possibile prevalenza della sindrome materna in questi casi, piuttosto che la compromissione fetale. Questa ipotesi è anche confermata dalla mancanza di correlazione tra i livelli materni e fetali negli IUGR, a differenza di gravidanze normali e complicate da preeclampsia.

PTX3 fetale potrebbe originare dalla circolazione materna, o dall'unità placentare stessa o da cellule del feto stesso. I nostri dati suggeriscono che PTX3 fetale potrebbe riflettere un disordine fetale associato ad uno specifico stato infiammatorio del fenotipo dell'iposviluppo indipendentemente dallo stato materno. I risultati sul versante fetale, che non mostrano differenze fra gravidanze normali e complicate da preeclampsia, suggeriscono che tale proteina non attraversa la placenta in modo significativo: i feti di mamme preeclampatiche avrebbero mostrato dei livelli di proteina significativamente più elevati e l'endotelio di placenta e decidua sarebbe risultato positivo in immunoistochimica. E' ipotizzabile che la proteina fetale sia sintetizzata dal compartimento fetale stesso a bassi livelli, come proteina espressa costituzionalmente e che i suoi livelli si elevino in caso di compromissione fetale.

In conclusione, i risultati di questo studio suggeriscono che gli elevati livelli materni di PTX3 potrebbero essere un marcatore di danno endoteliale, tipico della preeclampsia. Quale possa essere il preciso ruolo di questa proteina di

fase acuta rimane comunque da definire. Sulla base dei nostri risultati PTX3 potrebbe rappresentare una delle molecole infiammatorie coinvolte in quel complesso meccanismo a cascata che coinvolge citokine, complemento, cellule endoteliali e leucociti che si attiva in conseguenza ad una anomala placentazione, che si automantiene ed amplifica. Due sono i possibili meccanismi in cui potrebbe essere implicata tale proteina. PTX3 lega FGF-2 e ne inibisce la sua azione come fattore di crescita dei fibroblasti sulle pareti vascolari (Rusnati M, 2004). In tal senso potremmo ipotizzare PTX3 contribuisca all'alterata angiogenesi tipica della preeclampsia. Oppure PTX3 potrebbe interagire con un altro suo recettore specifico, C1q: la loro interazione potrebbe attivare la cascata complementare e in questo modo regolare/amplificare il processo infiammatorio endoteliale.

Noi, come altri recentemente abbiamo dimostrato elevati livelli di PTX3 nel I trimestre in donne che sviluppano preeclampsia nel III trimestre. Ulteriori studi prospettici sono necessari per capire con quale meccanismo tale molecola infiammatoria contribuisca all'espressione di patologie della gravidanza e valutare come PTX3 possa essere complementare a altri marcatori più correlati alla funzione placentare, come PP13 e PIGF, così come la valutazione Doppler delle arterie uterine, per l'individuazione di marcatori precoci di diagnosi e adeguato monitoraggio del peggioramento clinico di tali patologie. Inoltre, dovrebbe essere oggetto di studio il ruolo di pTX3 nella circolazione fetale dei ritardi di crescita intrauterina determinando una potenziale associazione con il life programming fetale.

TABELLE

Tabella 1. Caratteristiche cliniche della popolazione di gravidanze normali (AGA), complicate da preeclampsia (PE) e ritardo di crescita intrauterino (IUGR).

	AGA n=50	Preeclampsia n=53	IUGR n=43
Dati materni			
Età (anni)	31.3±5.5 (18-39)	34.1±4.5** (17-40)	33.1±5.4§ (22-43)
BMI pregravidico(kg/m2)	21.3±2.8 (16-29)	23.9 ±4.8*** (18.3-33.2)	22.4±4.5 (15.3-33.9)
Dati al parto			
Epoca gestazionale (sett)	39.0±1.0 (37.-41.1)	32.4±3.7*** (24.1-38.2)	33.4±4§§§ (28-38.3)
Peso fetale (gr)	3289±310.5 (2740-3780)	1546.3±740.5*** (390-3380)	1589±548.1§§§ (500-2655)
Peso placentare (gr)	564.1±106.5 (450-780)	289.7±131.9*** (169-640)	275±110.7§§§ (140-580)

Medie ± SD e range (*t test* preeclampsia verso AGA: ***p<0.001; **p<0.01; IUGR verso AGA: § p<0.05; §§§ p<0.001)

Tabella 2. Valori plasmatici e ombelicali venosi di PTX3 in gravidanze normali, complicate da preeclampsia e ritardo di crescita intrauterino.

	AGA	Preeclampsia	IUGR
PTX3 materno (ng/ml)	(n=50) 3.8 (1.6-7.2)	(n=53) 24.8 Δ π (11.1-50)	(n=43) 9.9 Ω (4.8-23.8)
PTX3 fetale (ng/ml)	(n=26) 2.3 (1.2-3.4)	(n=26) 2.1 (1.5-4.5)	(n=23) 4.3 * (2.4-6.4)

I risultati di PTX3 sono presentati come valori median con i range interquartili in *n*. Casi per ogni gruppo (*Mann Whitney test* preeclampsia verso AGA: Δ $p < 0.001$; IUGR verso AGA: Ω $p < 0.001$; preeclampsia verso IUGR: π $p < 0.001$); IUGR feti verso AGA and PE feti: * $p < 0.01$.

FIGURE

Pentraxin signature

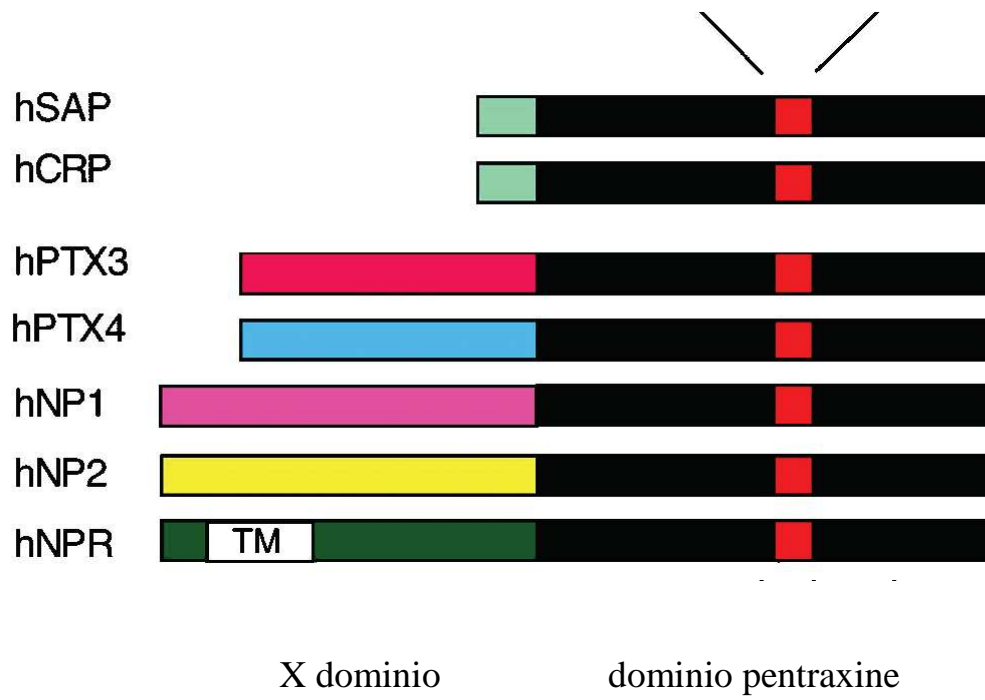


Figura 1. Superfamiglia delle Pentraxine

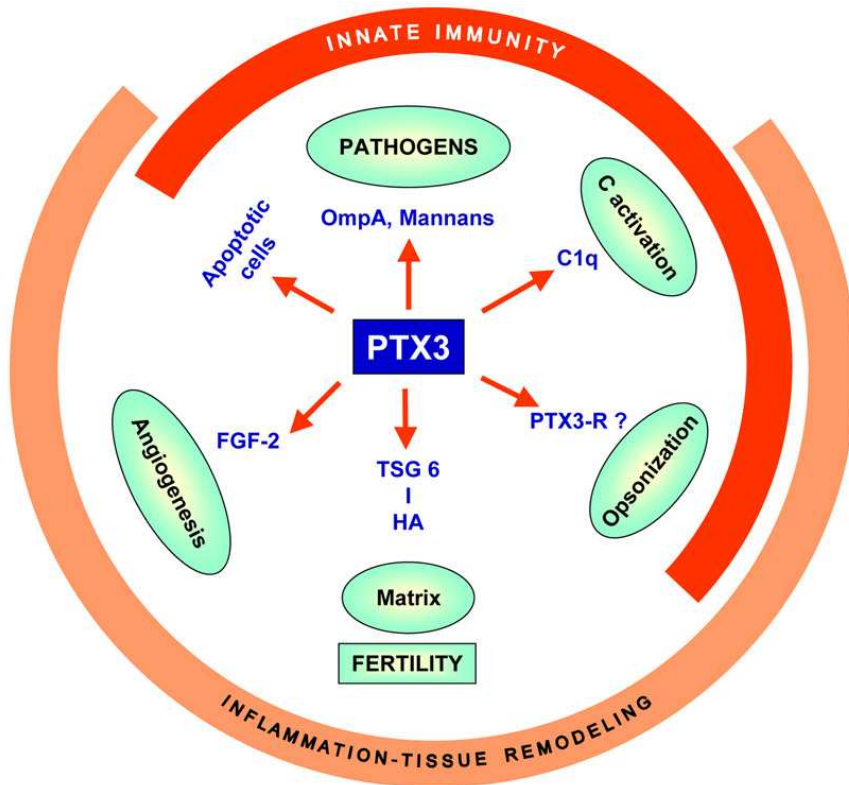


Figura 2. PTX3: a multifunctional soluble Pattern Recognition Receptor
(Garlanda C., Ann. Rev. Immunol. 2005)

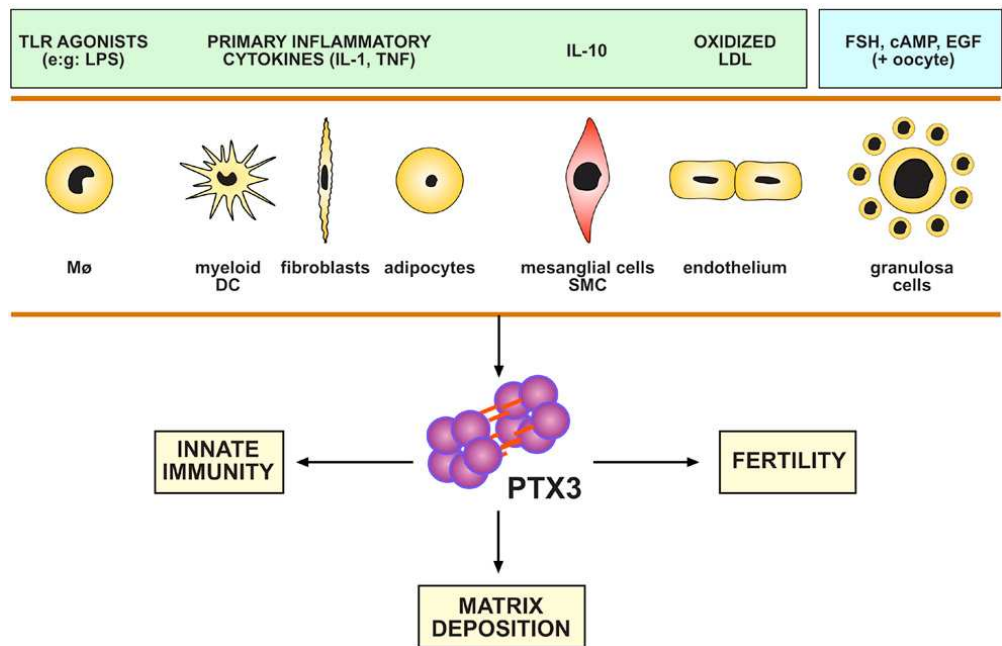


Figura 3. Fonti cellulari di PTX3 (Garlanda C., *Ann. Rev. Immunol.* 2005)

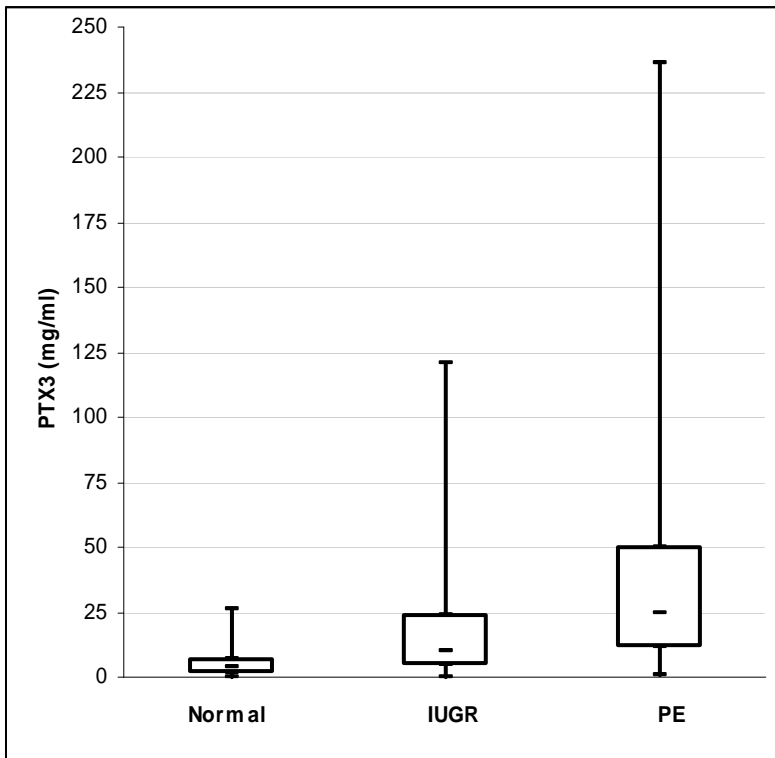


Figure 4. Livelli plasamtici di PTX3 (ng/ml) presentati come mediane (linea centrale), con range interquartili (box), valori minimi e massimi (whiskers) in gravidanze normali, complicate da IUGR e preeclampsia.

Δ $p < 0.001$ preeclampsia verso controlli; Ω $p < 0.001$ IUGR verso controlli; π $p < 0.001$ preeclampsia verso IUGR.

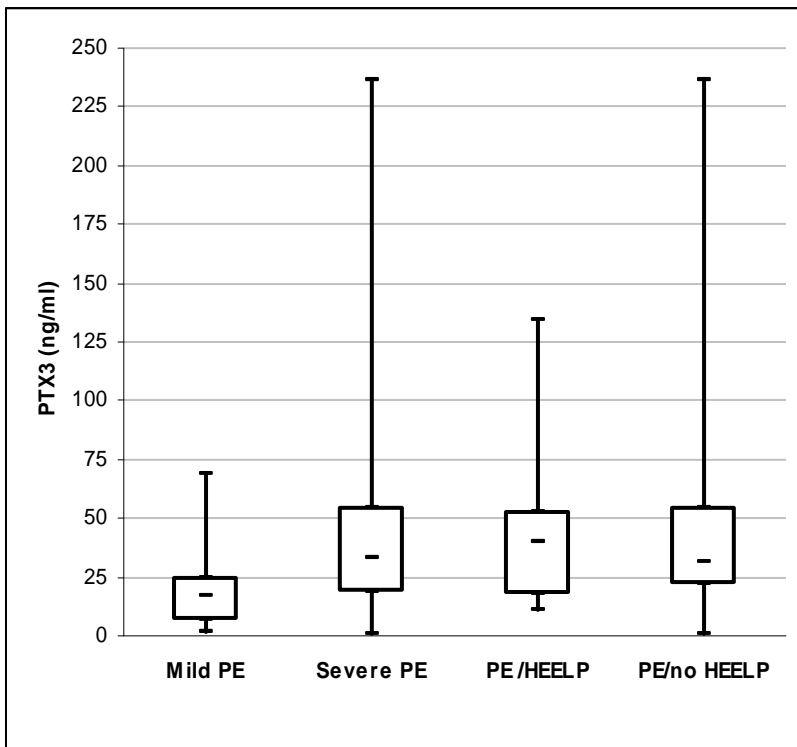


Figura 5. Livelli plasmatici di PTX3 (ng/ml) presentati come mediane (linea centrale), con range interquartili (box), valori minimi e massimi (whiskers) in gravidanze complicate da preeclampsia lieve, severa, severa con HEELP, severa senza HEELP § $p < 0.001$ preeclampsia severa vs lieve; $p < 0.001$ Ω preeclampsia severa con HEELP and preeclampsia severa senza HEELP vs preeclampsia lieve; Δ preeclampsia severa con HEELP vs preeclampsia severa senza HEELP.

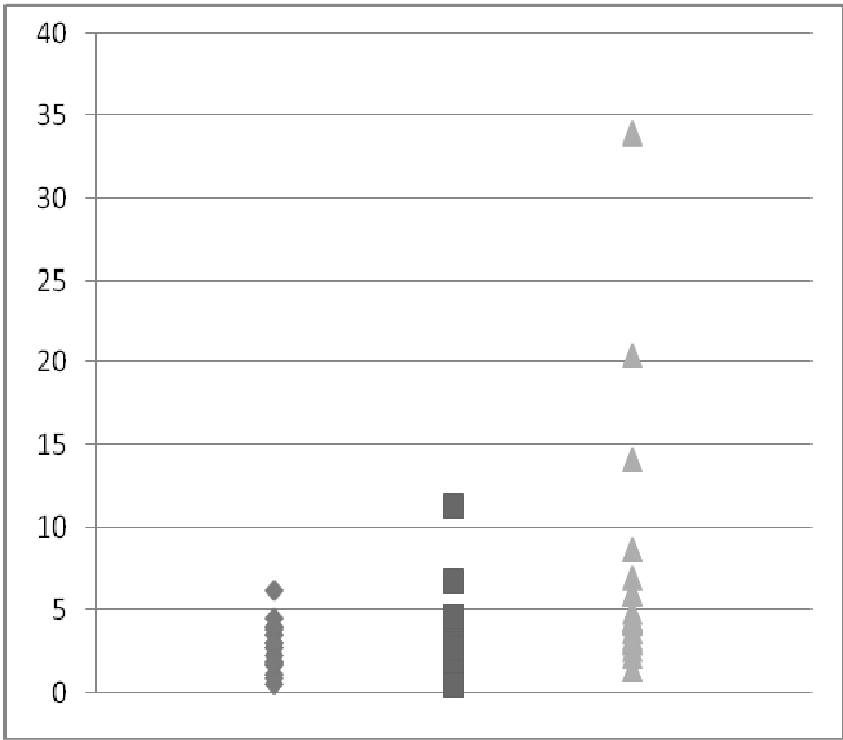


Figure 6 Valori singoli di PTX3 (ng/ml) in feti normali (diamante), preeclamptici (quadrato) e IUGR (triangoli) con i rispettivi valori mediani; Ω $p < 0.01$ feti IUGR vs normali e preeclamptici.

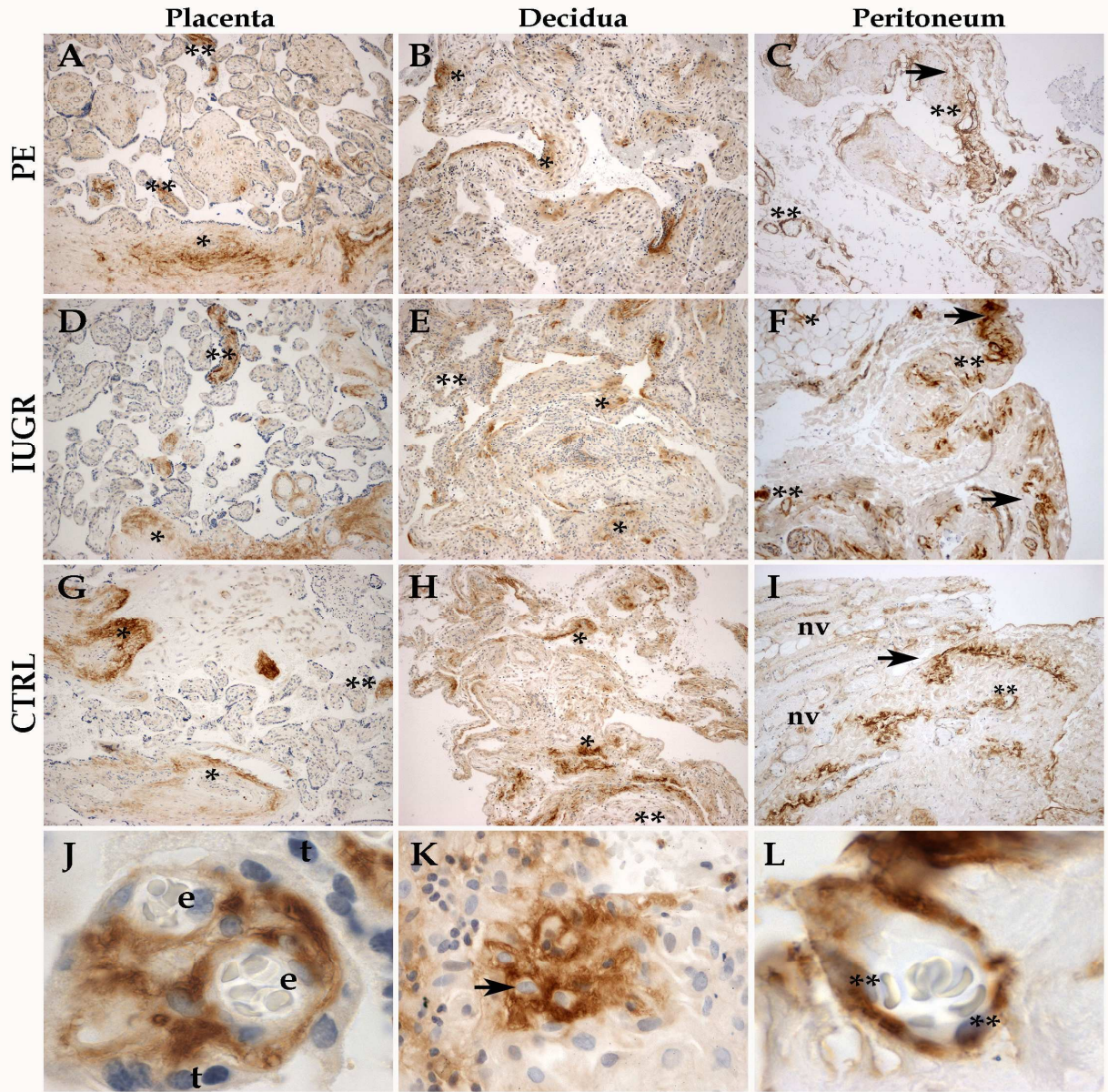


Figura 7. Immagini di espressione di PTX3 in placenta, decidua e peritoneum di pazienti gravidanze normali (CTRL) e complicate da PE e IUGR.

Pannelli A, D, G, J. Segnale di immunoistochimica (marrone) e localizzazione di PTX3 nello stroma di villi stem (*) e villi terminali (***) in placente normali. Pannello J rappresenta un campo di alto segnale di un villo terminale: la positività per PTX3 è espressa nell'interstizio; le cellule endoteliali (e) e il trofoblasto (t) risultano negative.

Pannelli B, E, H, K. Segnale di immunoistochimica (marrone) e localizzazione di PTX3 extracellulare nello stroma deciduale (*). Le cellule deciduali, le ghiandole endometriali risultano negative (**). Pannello K rappresenta un settore ad alto segnale: PTX3 segnale nell'interstizio attorno ai trofoblasti (freccie), che sono PTX3 negativi.

Pannelli C, F, I, L. Segnale di immunoistochimica (marrone) e localizzazione di PTX3 peritoneale nello stroma sotto al mesotelio (freccie). Alcuni adipociti esprimono PTX3 (*). In gravidanze complicate da PE and IUGR, la maggior parte delle cellule endoteliali sono PTX3 positive (** and pannello L). Nei controlli (CTRL), solo rari vasi esprimono PTX3 (pannello I, nv: PTX3 vasi negativi; **: PTX3 vasi positivi).

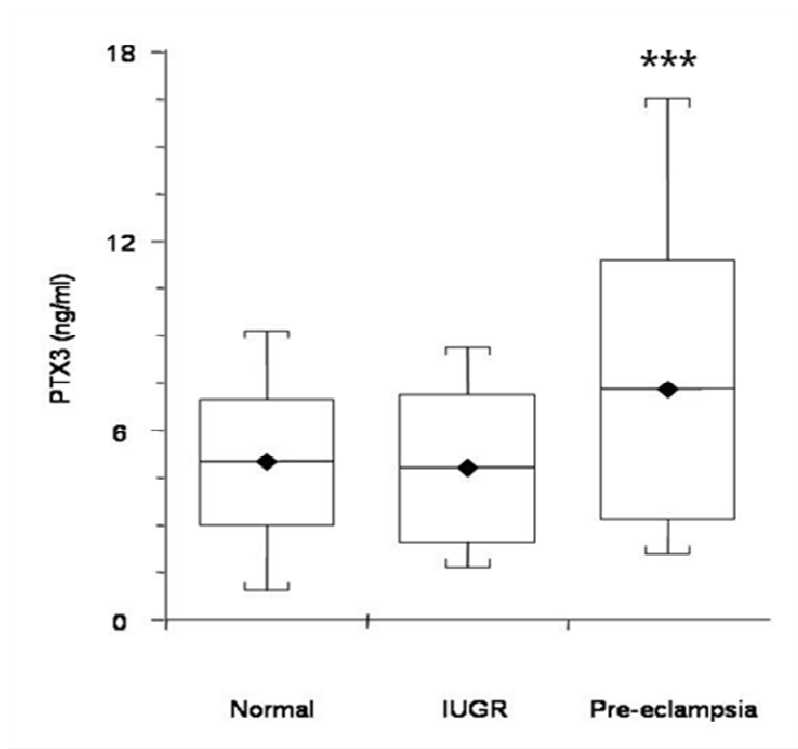


Figura 8. Livelli plasmatici di PTX3 presentati come medie (diamanti) \pm SD (box) and rispettivi range (whiskers). *** $p < 0.001$. *Cetin, Cozzi, Papageorghiou, Maina, Garlanda, Thilaganathan.*

BIBLIOGRAFIA

Acog Practice Bulletin (2002)

Diagnosis and Management of Preeclampsia and Eclampsia

American College of Obstetricians and Gynecologists

Obstet Gynecol, 99: 159-167

Alles V, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M, Mantovani A (1994)

Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes.

Blood, 84: 3483-3493

Barker DJP (1998)

In utero programming of chronic disease.

Clin Sci, 95:115-128

Benyo DF, Smarason A, Redman CWG, Sims C, Conrad KP (2001)

Expression of Inflammatory Cytokines in Placentas from Women with Preeclampsia

J Clin Endocr Metab, 86: 2505-2512

Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A & Golan A (2000)

Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction.

Am J Obstet Gynecol, 182: 198-206

Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, De Gioia L, Matteucci C et al. (1997)

Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component.

J Biol Chem, 272: 32817-32823

Brosens I, Robertson WB & Dixon (1967)

The physiological response to vessels of the placental bed to normal pregnancy.

J Pathol Bacteriol, 93: 569-579

Cetin I, Foidart JM; Miozzo M, Raun T, Jansson T, Tsatsaris V, et al. (2004)

Fetal growth restriction: a workshop report.

Placenta, 25:753-7.

Chard T, Yoong A & Macintosh M (1993)

The myth of fetal growth retardation at term.

Br J Obstet Gynaecol, 100: 1076-1081

Chunfang Q, DA Luthy, C Zhang, SW Walsh, WM Leisenring, MA Williams (2004)

A Prospective Study of Maternal Serum C-Reactive Protein Concentrations and Risk of Preeclampsia

AJH, 17: 154-160

Conrad KP, Miles TM, Benyo DF (1998)

Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia

Am J Reprod Immunol, 40: 102-111

Djurovic S, Clausen T, Wergeland R, Brosstad F et al. (2002)

Absence of enhanced systemic inflammatory response at 18 weeks of gestation in women with subsequent preeclampsia

Br J Obstet Gynaecol, 109: 759-764

Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A (2005)

Pentraxins at the Crossroad Between Innate Immunity, Inflammation, Matrix Deposition, and Female Fertility

Annu. Rev. Immunol., 23: 337-366

Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, et al. (2002)

Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in antifungal innate immune response.

Nature, 420: 182-186

Gortner L, Wauer RR, Stock GJ, Reiter HL, Reiss I, Jorch G, Hentschel R & Hieronimi G (1999)

Neonatal outcome in small for gestational age infants: do they really better?

J Perinat Med, 27, 484-489

Hamai Y, Fujii T, Yamashita T, Nishina H et al. (1997)

Evidence for an elevation in serum interleukin-2 and tumor necrosis factor-alpha levels before the clinical manifestations of preeclampsia

Am J Reprod Immunol, 38(2): 89-93

Johnson MR, Anim-Nyame N, Johnson P et al. (2002)

Does endothelial cell activation occur with intrauterine growth restriction ?

BJOG, 109(7) : 836-839

Kaufmann P, black S, Huppertz B (2003)

Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia.

Biol reprod, 69: 1-7

Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I (1986)

Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants

Br J Obstet Gynaecol, 93 : 1049-1059

- Klouche M, Peri G, Knabbe C, Eckstein HH, Schmid FX, et al. (2004)**
Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells
Atherosclerosis, 175: 221-228
- Latini R, Maggioni AP, Peri G, Gonzini L, Lucci D, et al. (2004)**
Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction
Circulation, 110: 2349-2354
- Lawlor DA, Davey Smith G, Ebrahim S.(2002)**
Birth weight of offspring and insuline resistance in late adulthood: cross sectional survey.
BMJ; 2002: 325-359
- Lee GW, Lee TH, Vilcek J (1993)**
TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1 inducible protein, is a novel member of the pentraxin family of acute phase proteins.
J Immunol, 150: 1804-1812
- Lefebvre S, Adrian F, Moreau P et al. (2000)**
Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells
Hum Immunol, 61: 1095-1101
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ;Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA (2004)**
Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia.
N Eng J Med; 350: 672-83
- Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B (2003)**
Pentraxin-3, a non-redundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity
Vaccine, 21 (suppl.2) : S43-47
- Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR & VanAsshe A (1994)**
A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies.
Br J Obstet Gynecol, 101: 669-674
- Meroni G, Quaglini S, Banfi G, caloni M, Finazzi S, Ambroso G(2002)**
Pregnancy in lupus nephritis
Am J Kidney Dis; 40:713-20
- Nauta AJ, Bottazzi B, Mantovani A, Salvatori G, Kishore U (2003)**
Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q.
Eur. J. Immunol., 33: 465-473

Ness RB, Sibai BM (2006)

Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia.

Obstet Gynecol; 195:40-9

Parazzini F, Cortinovis I, Bortolus R, Fedele L (1991)

Standard di peso alla nascita in Italia

Ann Ost Gin Med Perin, CXII: 203-46

Peri G, Introna M, Corradi D, Iacuitti G, Signorini S (2000)

PTX3, A Prototypical Long Pentraxin, Is an Early Indicator of Acute Myocardial Infarction in Humans.

Circulation, 102: 636-641

Pardi G, Marconi AM, Cetin I (2002)

Placental-fetal interrelationship in IUGR fetuses--a review

Placenta, Suppl A:S136-41, Review

Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB & Brosens I (1983)

Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy.

Placenta, 4: 397-413

Polentarutti N, Picardi G, Basile A, Cenzuales S, Rivolta A, et al. (1998)

Interferon- γ inhibits expression of the long pentraxin PTX3 in human monocytes

Eur. J. Immunol., 28: 496-501

Pollack RN & Divon MY (1992)

Intrauterine growth retardation: definition, classification and etiology.

Clin Obstet Gynecol, 35: 99-107

Rajakumar A, Michael HM, Rajakumar PA, Shibata E, Hubel CA, Karumanchi SA, Thadhani R, Wolf M, Harger G, Markovic N (2005) Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1(Flt-1) and soluble (s-Flt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclampsic pregnant women.

Placenta;26: 563-573

Redline RW, Patterson P (1995)

Preeclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast.

Hum Pathol; 26: 594-600

Redman CW, Sargent IL (2005)

Latest advances in understanding preeclampsia.

Science;308:1592-4.

Rey E, Couturier A (1994)

The prognosis of pregnancy in women with chronic hypertension. (1994)

Am J Obstet Gynecol; 171:410-6

Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM (1989)

Preeclampsia: an endothelial cell disorder

Am J Obstet Gynecol, 161: 1200-1204

Rolph MS, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A, Hasson GK (2002)

Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 22: E10-18

Rusnati M, Camozzi M, Moroni E, Bottazzi B, Peri G, et al. (2004)

Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis

Blood, 104: 92-99

Sacks GP, Studena K, Sargent K, Redman CW (1998)

Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis.

Am J Obstet Gynecol; 179:80-6

Salustri A, Garlanda C, Hirsch E, De Acetis M et al. (2004)

PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in vivo fertilization

Development, 131: 1577-1586

Sibai BM, Ewell MG, Levine Rj, Esterlitz JR, Sibai B, Curet LB, et al. (1997)

Risk factors Associated with preeclampsia in healthy nulliparous women. The Calcium for Preeclampsia Prevention (CPEP) Study Group

Am J Obstet Gynecol, 177: 1003-1010

Sibai BM, Hauth J, Caritis S, Lindheimer MD, MacPherson C, Klebanoff M, et al. (2000)

Hypertensive disorders in twin versus singleton gestations.

National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units.

Am J Obstet Gynecol, 182: 938-942

Sibai BM, Ramadam MK, Usta I, Salama M, Mercer BM, Friedman SA

Pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome)

Am J Obstet Gynecol, 169: 1000-1006

Sibai BM, Decker G, Kupferminc M (2005)

Preeclampsia.

Lancet, 365: 785-99

Sibai B, Lindheimer M, Hauth J. (1998)

Risk factors for preeclampsia, abruption placentae, and adverse neonatal outcomes among women with chronic hypertension.

N Eng J Med; 339: 667-71

Smith GC, Pell JP, Walsch D (2002)

Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births.

Lancet; 357:2002-6

Smith GC, Harding S, Rosato M (2000)

Relation between infants' birthweight and mothers' mortality: prospective observational study.

BMJ; 320: 839-40

Szalai AJ, Agrawal A, Greenhough TJ, Volanakis JE (1999)

C-reactive protein: structural biology and host defense function.

Clin Chem Lab Med ; 37: 265-70

Tjoa ML, van Vugt JMG, Go ATJJ, Blankenstein MA et al. (2002)

Elevated C-reactive protein levels during first trimester of pregnancy are indicative of preeclampsia and intrauterine growth restriction

Journal of Reproductive Immunology, 59: 29-37

Todros T, Ferrazzi E, Groli C, Nicolini U, Parodi L, Pavoni M, Zorzoli A, Zucca S (1987)

Fitting growth curves to head and abdomen measurements of the fetus: a multicentric study

J Clin Ultrasound, 15: 95-105

Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, Noel A, Schaaps JP, Cabrol D, Frankenne F, Foidart JM (2003)

Overgrowth of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences.

J Clin Endocr Metab; 2003: 5555-5563

Tillet WS, Francis T Jr (1930)

Serological reactions in pneumonia with a non protein somatic fraction of pneumococcus

J Exp Med; 52:561-85

Veith GL, Rice GE (1999)

Interferon gamma expression during human pregnancy and in association with labour

Gynecol Obstet Invest, 48: 163-167

Villar J, De Onis M, Kestler E, Bolanos F, Cerezo R & Bernedes H (1990)

The differential neonatal morbidity of the intrauterine growth retardation syndrome.

Am J Obstet Gynecol, 163: 151-157

Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW. (1995)

Interleukin-6, tumor necrosis factor and soluble tumor necrosis factor receptors in women with preeclampsia.

Br J Obstet Gynecol; 102:20-5

Vouret-Craviari V, Matteucci C, Peri G, Poli G, Introna M, Mantovani A (1997)

Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan.

Infect Immun, 65: 1345-1350

Walker JJ (2000)

Pre-eclampsia.

Lancet, 356: 1260-1265

Williams MA, Farrand A, Mittendorf R, Sorensen TK, Zingheim RW, O'Reilly GC, King IB, Zebelman AM, Luthy DA (1999)

Maternal second trimester serum tumor necrosis factor-alpha-soluble receptor p55(sTNFp55) and subsequent risk of preeclampsia.

Am J Epidemiol;149:323-9

Wolf M, Kettyle E, Sandler L et al. (2001)

Obesity and Preeclampsia: The potential Role of Inflammation

Obstet. Gynecol., 98: 757-762

Zhou Y, Genbacev O, Damsky CH, Fisher SJ (1998)

Oxygen regulates humancytotrophoblast differentiation and invasion: implications for endovascular invasion in normal pregnancy and in pre-eclampsia

J Reprod Immunol, 39: 197-213

Cetin I, Cozzi V, Pasquini F, Nebuloni M, Garlanda C, Vago L et al. Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX3) in preeclampsia and intrauterine growth restriction. Am J Obstet Gynecol 2006;194: 1347-53.

Rovere-Querini P, Antonacci S, Dell'Antonio G, Angeli A, Almirante G, Dal Cin E et al. Plasma and tissue expression of the long pentraxin 3 during normal pregnancy and preeclampsia. Obstet Gynecol 2006;108; 148-155.

- Cetin I, Cozzi V, Papageorgiou AT, Maina V, Montarelli V, Garlanda C, Thilaganathan B.** First trimester PTX3 levels in women who subsequently develop preeclampsia and fetal growth restriction. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009; 88; 846-9
- Akolekar R, Casagrandi D, Livanos P, Tetteh A, Nicolaides KH.** A Maternal plasma pentraxin 3 at 11 to 13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. *Prenat Diagn* 2009; 29: 934-8
- Larsson A, Palm M, Helmersson J, Axelsson O.** Pentraxin 3 values during normal pregnancy. *Inflammation* 2011; 34: 448-451
- Hamad RR, Eriksson MJ, Beg E, Larsson A, Bremme K.** Impaired endothelial function and elevated levels of pentraxin 3 in early-onset preeclampsia. *Acta Obstet e Gynecol Scand* 2011; 00: 1-7.
- Cetin I, Huppertz B, Burton G, Cuckle H, Gonen R, Lapaire O, Mandia L, Nicolaides K, Redman C, Soothill P, Spencer K, Thilaganathanm B, Williams D, Meiri H.** Pregenesys pre-eclampsia markers consensus meeting: What do we require from markers, risk assessment and model systems to tailor preventive strategies? *Placenta* 2011;32 S4-S16
- Hess AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegaard M, Nayak N, et al.** Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol Reprod.* 2007; 76: 102_17.
- Popovici RM, Betzler NK, Krause MS, Luo M, Jauckus J, Germeyer A, et al.** Gene expression profiling of human endometrial_trophoblast interaction in a co-culture model. *Endocrinology.* 2006; 147: 5662_75.

APPENDICE

Definizione di PREECLAMPSIA secondo le linee guida dell'American College of Obstetricians and Gynecologists (2002)

- PAS ≥ 140 e/o PAD ≥ 90 mmHg per almeno due volte (a distanza di ≥ 6 ore ma < 7 giorni) dopo la 20^a settimana di gestazione
- Proteinuria, definita come presenza di concentrazione proteica ≥ 300 mg nella raccolta delle urine delle 24h o presenza di concentrazione proteica allo stick urine di 30mg/dl [+] in due occasioni (> 6 ore, < 7 gg di distanza)
- In assenza di proteinuria:
 - sintomatologia cerebrale
 - dolore epigastrico o nel quadrante dx con nausea e vomito
 - trombocitopenia ed aumento degli enzimi epatici
 - sindrome HELLP

PREECLAMPSIA SEVERA:

La preeclampsia è considerata severa se è presente uno o più dei seguenti criteri:

- PA ≥ 160 e/o PAD ≥ 110 mmHg per almeno due volte (a distanza di ≥ 6 ore) mentre la donna è a riposo
- Ipertensione indotta dalla gravidanza associata a proteinuria grave (almeno 5gr/24h o [+++]
nello stick urine in due occasioni a distanza > 4 ore)
- Ipertensione indotta dalla gravidanza con coinvolgimento multi organo:
 - edema polmonare o cianosi
 - oliguria [diuresi < 500 ml/24h o < 80 ml/4h]
 - trombocitopenia [conta piastrinica $< 100.000/\text{mm}^3$
 - dolore epigastrico o nel quadrante dx
 - aumento delle transaminasi epatiche
 - disturbi cerebrali o visivi [cefalea, scotomi]
 - ritardato accrescimento intrauterino

ECLAMPSIA:

- Comparsa di convulsioni in una donna con preeclampsia

Definizione di RITARDATO ACCRESCIMENTO INTRAUTERINO (IUGR)

Criteri di diagnosi:

- Rilievo ecografico di una circonferenza addominale fetale inferiore al 10° percentile rispetto ai valori di riferimento per feti di pari epoca gestazionale oppure riduzione della misura longitudinale della circonferenza addominale di almeno 40 percentili (*Todros et al, 1987*).
- Peso alla nascita <10° percentile in base agli standard di peso per epoca gestazionale della popolazione di riferimento. (*Parazzini et al, 1991*)

Criterio di esclusione:

anomalie morfologiche maggiori ed anomalie del cariotipo.