



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Direttore Prof. Mario Petri

Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e
dell'Area Critica
Direttore Prof. Paolo Miccoli

Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in
Medicina e Chirurgia
Direttore Prof. Giulio Guido

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

CORRELAZIONI BIOFISICHE E BIOCHIMICHE NEL PRIMO
TRIMESTRE DI GRAVIDANZA ED OUTCOME IN PAZIENTI
CON DIABETE GESTAZIONALE,
IN UNA POPOLAZIONE NON A RISCHIO

RELATORE

Chiar.mo Prof. Angiolo Gadducci

CANDIDATO

Carla Vaccaro

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

| | |
|---|----|
| 1. L'importanza del Primo Trimestre come momento di selezione delle gravidanze a rischio specifico..... | 4 |
| 1.2. Diabete Mellito Gestazionale | 6 |
| 1.2.1 Fisiopatologia..... | 6 |
| 1.2.2 Complicanze del GDM. | 8 |
| 1.2.3. Screening del GDM. | 13 |
| 1.2.4. Trattamento. | 17 |
| 1.3. Pregnancy Associated Plasma Protein-A. | 18 |
| 1.4. Free β -hCG. | 23 |
| 1.5. Body Mass Index. | 24 |
| 1.6 Obiettivo dello Studio. | 25 |
| 2. MATERIALI E METODI..... | 28 |
| 2.1 Raccolta dei dati. | 28 |
| 2.2 Analisi Statistica..... | 30 |
| 3. RISULTATI..... | 31 |
| 4.DISCUSSIONE..... | 39 |
| 4.1 Familiarità per Diabete Gestazionale | 41 |
| 4.2 Età..... | 41 |
| 4.3 Pregnancy Associated Plasma Protein-A e f β -hCG | 42 |
| 4.3 Body Mass Index..... | 44 |
| 4.4 Timing del Parto ed Outcome della Gravidanza | 45 |
| 4.5 <i>Detection Rate</i> dei parametri analizzati..... | 46 |

| | |
|---------------------|----|
| 5. CONCLUSIONI..... | 48 |
| BIBLIOGRAFIA | 50 |

1. L'importanza del Primo Trimestre come momento di selezione delle gravidanze a rischio specifico.

Il campo della Medicina Prenatale, nell'arco dell'ultimo secolo, ha subito cambiamenti considerevoli, i quali hanno costituito un importante passo avanti nella cura delle donne in gravidanza ed hanno giocato un ruolo fondamentale nella riduzione sostanziale della mortalità e morbilità materna e perinatale. All'inizio del XX secolo l'attenzione per la diagnosi e la cura prenatale era focalizzata sul secondo e sul terzo trimestre di gravidanza. La prima visita, infatti, era prevista intorno alla sedicesima settimana, le altre visite intorno alle settimane 24 e 28, successivamente ogni 15 giorni fino alla settimana 32 per poi passare a visite settimanali in previsione del parto. Tuttavia, l'alta concentrazione di visite durante l'ultimo trimestre non garantiva una tempestiva diagnosi della maggior parte delle complicanze che si sviluppano durante la gravidanza ed in tal modo non sempre era possibile prevenire gli esiti sgradevoli associati ad esse.

Il progresso scientifico degli ultimi dieci anni ha dimostrato che diverse patologie associate alla gravidanza, importanti sia sul versante fetale che su quello materno, sono potenzialmente diagnosticabili sin dal primo trimestre di gestazione. Si è sempre più concretizzata la possibilità di effettuare uno screening e la diagnosi di tali patologie, nel periodo che intercorre tra l'undicesima e la tredicesima settimana, nel quale si associano dati provenienti da caratteristiche materne, da test biochimici effettuati sul plasma materno e da reperti ecografici.

Ultimamente è emerso prepotentemente il concetto di inversione della “*Piramide Assistenziale*” (fig. 1) ¹ la cui base d'appoggio è costituita dal primo trimestre di gestazione nel quale si incentrano tutte quelle procedure diagnostiche

ed eventuali trattamenti che mirano al miglioramento dell'outcome della gravidanza. Con tale processo, oggi, è possibile sospettare la presenza di anomalie del cariotipo fetale, pre-eclampsia, parto pre-termine, feto piccolo per l'età gestazionale (Small For Gestational Age), ritardo di crescita intrauterino (IUGR), morte intrauterina e perinatale, Diabete Mellito Gestazionale (GDM), anomalie strutturali fetali e macrosomia.

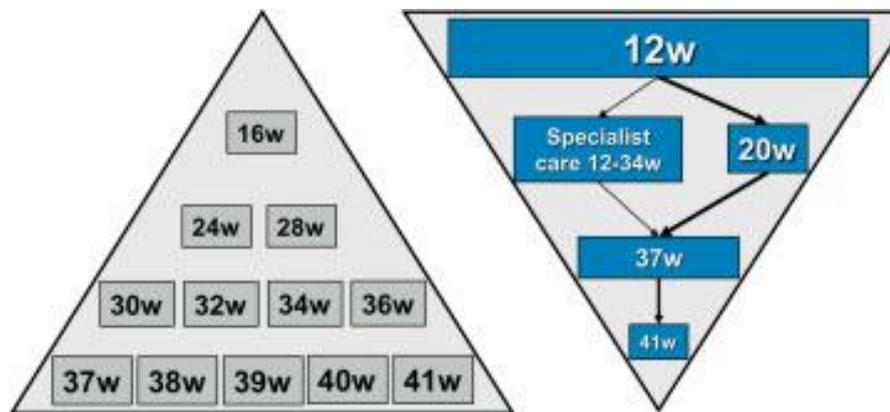


Figura 1 Piramide assistenziale: passato (sinistra) e futuro (destra)¹.

Anticipando le prime visite al primo trimestre si è ottenuta la possibilità di individuare le gestanti ad alto o basso rischio per una determinata patologia. In questo modo, le pazienti a basso rischio di sviluppare complicanze possono sottoporsi ad un numero di visite inferiore: una visita durante la ventesima settimana, nella quale possono essere analizzati nuovamente l'anatomia e l'accrescimento fetale e rivalutato il rischio per pre-eclampsia e parto pre-termine;

¹ KH Nicolaides. A model for a new pyramid of prenatal care based on the 11 to 13 weeks assessment. *Prenat Diagn* 2011; **31**: 3-6.

un'altra visita intorno alla settimana 37 per valutare il benessere materno e fetale e stabilire il periodo più idoneo e le modalità di parto ed eventualmente effettuare un'altra visita per coloro che giungono anche alla settimana 41.

Il gruppo di donne in cui è stato individuato un alto rischio per lo sviluppo di alcune delle complicanze associate alla gravidanza, invece, dovrà essere sottoposto ad una stretta sorveglianza in cliniche specializzate e ad un numero di visite più intensivo in modo da poter instaurare tempestivamente un percorso terapeutico specifico.

La suddivisione delle gestanti in base al rischio, in aggiunta, porta ad una riduzione delle spese da parte del Sistema Sanitario Nazionale.

L'obiettivo del nostro studio è quello di individuare dei parametri che ci permettano di selezionare già nel primo trimestre le gravidanze a rischio di Diabete Mellito Gestazionale, una delle complicanze di più frequente riscontro durante la gravidanza, la cui prevalenza è generalmente compresa tra il 2 ed il 6%, ma può raggiungere il 10-20% nelle popolazioni ad alto rischio.²

1.2. Diabete Mellito Gestazionale

1.2.1 Fisiopatologia.

Il diabete mellito gestazionale (GDM) è un disordine metabolico caratterizzato da una ridotta tolleranza al glucosio che insorge o viene diagnosticato per la prima volta durante la gravidanza³. La definizione di diabete gestazionale, quindi, non esclude la possibilità - peraltro frequente - che una preesistente intolleranza glucidica venga smascherata ed aggravata dallo "stress" gravidico. La gravidanza, infatti, rappresenta una condizione diabetogena poiché

durante tale periodo avviene il rilascio di alcuni ormoni, quali *Human Placental Lactogen* (hPL), progesterone, estrogeni, cortisolo, ormone della crescita e prolattina ed è stato dimostrato che tali ormoni inducono uno stato di insulino-resistenza sia *in vitro* che *in vivo*. Gli estrogeni aumentano sia la concentrazione che il legame dell'insulina⁴, il progesterone causa intolleranza glucidica diminuendo il trasporto del glucosio e la soppressione insulinica indotta dalla neoglucogenesi epatica⁵. La concentrazione plasmatica di cortisolo approssimativamente raddoppia e causa un'alterata fosforilazione dell'*insulin receptor substrate-1* (IRS-1) inducendo uno stato di insulino resistenza⁶. L'hPL promuove la produzione materna delle *Insulin-like Growth Factors* (IGFs), contribuisce a dirigere substrati energetici verso il feto ed a ridurre la sensibilità all'insulina⁷⁻⁸. L'insulino-resistenza che si sviluppa durante la gravidanza, tuttavia, è da considerare un evento fisiologico che garantisce l'approvvigionamento di glucosio al feto. La ridotta captazione di glucosio insulino-mediata sposta il metabolismo materno dai carboidrati ai substrati lipidici, rendendo i carboidrati maggiormente disponibili per i tessuti fetali⁹. Il pancreas compensa, normalmente, con una ipertrofia ed iperplasia delle cellule β con conseguente incremento della secrezione di insulina¹⁰; tuttavia, nelle donne in cui si sviluppa il GDM vi è una riduzione della funzionalità delle cellule β pancreatiche, in particolare nella prima fase della secrezione insulinica (fase di risposta rapida)¹¹. Le cause di tale deficit funzionale sono dovute sia ad un possibile processo autoimmune che a difetti enzimatici, come quello a carico degli enzimi glucochinasi.¹² La causa autoimmune dovrebbe essere sospettata in donne che non hanno un caratteristico fenotipo a rischio di GDM, per esempio donne

magre e caucasiche. Il mancato compenso all'aumentata resistenza tissutale all'azione dell'insulina porta ad un inefficiente controllo dei livelli di glucosio, con conseguente iperglicemia. Il glucosio viene trasferito in modo diretto dalla placenta al feto, il quale sviluppa uno stato di iperinsulinemia per contrastare l'iperglicemia materna.

| Ormoni | Effetti |
|---------------------------|---|
| Estrogeni | ↑ Concentrazione di Insulina |
| | ↑ Legame Insulina |
| Progesterone | ↓ Trasporto Glucosio |
| | ↓ Legame Insulina |
| | ↓ Soppressione Insulina indotta dalla neogluco-genesi epatica |
| Cortisolo | ↑ Insulino-Resistenza |
| | ↓ Fosforilazione Recettori Insulina |
| | ↓ IRS-1 |
| Hormon Placental lactogen | ↓ Sensibilità all'insulina |
| | ↑ Secrezione Insulina |
| | ↑ Sintesi Insulina |
| | ↑ Ossidazione Glucosio |
| | ↑ Metabolismo cAMP |
| | ↑ Numero Cellule β Pancreatiche |
| | ↑ Volume Cellule β Pancreatiche |

Tabella 1 Azione degli ormoni secreti durante la gravidanza

1.2.2 Complicanze del GDM.

Se il GDM non è diagnosticato o non è trattato adeguatamente, si può andare incontro sia ad una elevata mortalità perinatale sia, più frequentemente, ad un aumento della morbilità perinatale. In aggiunta al danno sul feto, si è visto che le

donne che manifestano il GDM possono, nel tempo, sviluppare il diabete mellito di tipo 2.¹³

Le complicanze fetoneonatali maggiormente documentate sono la presenza di ipoglicemia alla nascita, *Large for Gestational Age* (o indicata anche con il termine di Macrosomia), iperbilirubinemia, policitemia, ipocalcemia/ipomagnesemia, mortalità perinatale, miocardiopatia ipertrofica e sindrome da distress respiratorio. I principali fattori di rischio per lo sviluppo di tali complicanze sono rappresentati da una condizione di iperglicemia materna, obesità, età avanzata e multiparità.

Tutte le complicanze si correlano con il *grado* di tolleranza glucidica.

| COMPLICANZE PERINATALI | MADRE | FETO |
|-------------------------------|--|---|
| | Pre-eclampsia | Distocia di Spalla |
| | Parto cesareo | Fratture e Lesioni al momento del Parto |
| | | Iperbilirubinemia Neonatale |
| COMPLICANZE TARDIVE | Diabete Mellito di tipo 2 | Alterata tolleranza al Glucosio |
| | Aumentato Rischio di GDM nelle gravidanze successive | Obesità |

Tabella 2 Complicanze più frequenti nel GDM

La condizione patologica di più frequente riscontro (dal 18% al 29% di incidenza) è la *Macrosomia*, definita come “peso alla nascita > 4000 g”. Un altro modo per definire questa anomalia è l’espressione di *Large for gestational Age* (LGA), con la quale si indicano quei bambini il cui peso alla nascita risulta al di sopra del 90° percentile¹⁴. Circa il 70% dei casi di macrosomia possono essere

attribuiti a fattori genetici e costituzionali, a gravidanze post-termine, o, più raramente, alla presenza di particolari sindromi come tumori e trasposizione dei grandi vasi. In circa il 30% dei casi, si verifica nei figli di madre diabetica, con maggiore frequenza nelle donne obese e pluripare, i quali vanno incontro ad una crescita disomogenea caratterizzata da uno sviluppo del tronco (spalle e addome) maggiore rispetto a quello cefalico. La macrosomia si accompagna ad alcune complicanze legate al parto, quali l'asfissia neonatale, la distocia di spalla¹⁵, la frattura della clavicola e la paralisi di Erb¹⁶. Al fine di evitare questi stati morbosi, le pazienti con GDM sono maggiormente sottoposte al parto cesareo¹⁷. LGA, inoltre, rappresenta un fattore di rischio aggiuntivo per lo sviluppo di Diabete Mellito di tipo 2 nella madre.

L'*Ipoglicemia Neonatale* si manifesta dopo la resezione del cordone ombelicale poiché viene meno il passaggio del glucosio dal sangue materno a quello fetale. Fino al 24% di bambini nati da madri affette da GDM presenta livelli glucidici al di sotto di 34mg% durante il periodo neonatale.¹⁸ Nel neonato, l'ipoglicemia può essere asintomatica o può essere accompagnata da sintomi aspecifici quali letargia, agitazione, spasmi degli arti, disturbi respiratori ed epilessia. Gravi complicanze tendono a svilupparsi più frequentemente nei neonati di madri diabetiche con scarso controllo metabolico e da quelle che ricevono grandi quantità di glucosio durante il travaglio¹⁹.

La *Sindrome da Distress Respiratorio* (RDS) del neonato è causata da un deficit nella sintesi del surfactante, sostanza tensioattiva che impedisce il collabimento degli alveoli durante gli atti respiratori. Alti livelli di insulina nella circolazione fetale sono associati ad una bassa produzione di tensioattivo, poiché

l'insulina inibisce l'attività degli pneumociti di tipo II, responsabili della sintesi e del rilascio del surfactante.²⁰ Negli ultimi vent'anni, tuttavia, grazie all'instaurarsi di un programma di controllo dei livelli di glicemia, il rischio di RDS nelle gestanti con GDM tende ad essere uguale a quello della popolazione generale.

Un'altra grave complicanza dovuta all' iperglicemia materna e possibile causa di morte endouterina del feto è la *Miocardipatia Ipertrofica*. Questa anomalia è caratterizzata da una ipertrofia del setto e delle pareti ventricolari, che a volte può essere tale da ostacolare il normale flusso sanguigno. L' iperinsulinismo fetale può contribuire allo sviluppo di questa patologia. Nel cuore del neonato, infatti, è presente un numero elevato di recettori per l'insulina che rendono, pertanto, il tessuto miocardico molto sensibile agli stimoli ipertrofici.²¹

L'*Ipocalcemia* (Calcio < 7 mg/dL) e l'*Ipomagnesemia* (Magnesio < 1,5,mg/dL) sono entrambe causate dall'interruzione del flusso di nutrienti attraverso il cordone ombelicale e le riscontriamo in circa il 50% dei feti nati da madri affette da GDM. La gravità di una tale condizione è correlata con il grado di controllo del diabete materno, lo stress perinatale ed il grado di immaturità del neonato. Di solito si sviluppano nel corso delle prime 12- 24 ore dopo la nascita, con irritabilità, eccitabilità neuromuscolare, contrazioni fascicolari della lingua, apnea, e, occasionalmente, convulsioni.²²

L'*iperbilirubinemia* si riscontra in circa il 20% dei neonati da madri diabetiche. Questa complicanza potrebbe essere causata sia da un aumento dell'eritropoiesi indotto dall'iperinsulinemia cronica che da un' aumentata emolisi

dovuta ai processi di glicazione. Si manifesta, di solito, di grado lieve e risponde alla fototerapia.²³

Si parla di *Policitemia* quando l'ematocrito venoso > 65% o emoglobina > 20 g / dL. Questa condizione è più frequente (fino al 30%) in neonati di madri diabetiche e riflette una condizione di relativa ipossiemia. L'iperinsulinemia e l'iperglicemia inducono un ritardo dello shift da emoglobina fetale ad emoglobina adulta, favorendo in tal modo una stato di ipossia cronica. Sotto lo stimolo di quest'ultima viene attivata l'eritropoiesi extramidollare che favorisce l'insorgenza di policitemia.²⁴

Per quanto riguarda la relazione tra GDM e *Mortalità Perinatale*, grazie ai progressi apportati alle strutture sanitarie, che includono un aumento del monitoraggio pre-parto, l'inserimento della terapia medica nutrizionale e / o di quella insulinica, il tasso di mortalità è stato quasi completamente annullato.²⁵

Le sequele a lungo termine per i bambini nati da soggetti con GDM sono rappresentate da una maggiore predisposizione all'intolleranza al glucosio, al diabete e all'obesità. Lo studio di Pettitt *et al.*(1988)²⁶ ha messo in relazione l'obesità e l'esposizione all'iperglicemia durante la vita intrauterina.

La complicanza più frequente per le gestanti, invece, è quella di sviluppare il *Diabete Mellito di tipo 2* (DMII) a distanza.

Secondo Peters *et al.* (1996)²⁷, nelle donne con una storia positiva per GDM, una seconda gravidanza si associa ad un aumento di tre volte del rischio di sviluppare il DMII, suggerendo che la ricorrenza di una condizione di insulino-

resistenza è in grado di accelerare il declino della funzione delle cellule β del pancreas.

Altri fattori noti che contribuiscono alla evoluzione verso il DMII conclamato sono: (1) diagnosi di GDM prima della 24a settimana di gestazione (il rischio a 5 anni è del 80%), (2) alti livelli di glucosio a digiuno prima della gravidanza, (3) un difetto di secrezione di insulina evidente, (4) necessità di terapia insulinica durante la gravidanza, (5) obesità già presente prima della gravidanza (rischio del 50-75%), (6) anamnesi familiare di diabete mellito, (7) eccessivo aumento ponderale nel post-partum e (8) donne non caucasiche.²⁸

Oltre alle anomalie riguardanti l'omeostasi del glucosio, le donne con precedente GDM presentano un maggior rischio di ipertensione, iperlipidemia, alterazioni elettrocardiografiche e mortalità.²⁹

1.2.3. Screening del GDM.

Una diagnosi precoce ed una tempestiva gestione di tale patologia riducono le morbosità ad essa legate. Tuttavia, non sono stati ancora definiti dei criteri di screening universalmente accettati. L' American Diabetes Association (ADA) suggerisce che un metodo di screening selettivo sia meglio di uno universale. Tale metodo si basa sulla stratificazione delle gestanti, durante il primo controllo prenatale, in rischio alto, intermedio e basso.

Una donna è considerata ad *alto rischio* di sviluppo di diabete gestazionale se presenta una o più fra le caratteristiche seguenti: obesità (nelle donne con BMI > 30 o di peso > 150% del peso corporeo ideale l'incidenza di GDM è da 1,4 a 20

volte superiore a quella nei soggetti normopeso), anamnesi di GDM, intolleranza al glucosio, glicosuria o anamnesi familiare di diabete mellito.

Vengono considerate a *basso rischio* coloro che presentano tutte le caratteristiche seguenti: età < 25 anni, normopeso, assenza di anamnesi familiare di diabete mellito, assenza di intolleranza al glucosio, non appartenenza ad un gruppo etnico in cui vi sia un'alta incidenza di DM (Sud dell'Asia, Caraibi, Medio Oriente).

Le donne, le cui caratteristiche non rientrano né nel gruppo ad alto né in quello a basso rischio, appartengono alla categoria a *rischio intermedio*.

Le donne appartenenti al gruppo ad alto rischio dovrebbero essere sottoposte precocemente, tra le settimane 14 e 16, ad un test per valutare l'intolleranza al glucosio. Se il risultato del test è negativo, è consigliato un altro controllo tra le settimane di gestazione 24 e 28. Le gestanti con un rischio intermedio possono effettuare il test di controllo direttamente alle settimane 24 e 28. Non sono previsti test di screening per coloro che si collocano nella categoria a basso rischio.

Il più diffuso metodo di screening, originariamente proposto da O'Sullivan *et al.* (1973)³⁰ è chiamato GCT, acronimo di *Glucose Challenge Test*. È un esame da carico glucidico con 50 g di glucosio e determinazione della glicemia a 60 minuti dall'ingestione della soluzione glucosata. Se dopo un'ora la glicemia è superiore od uguale a 140 mg/dl, ma inferiore a 180 mg/dl (7.8-10.2 mmol/L), il test è positivo, anche se non si può ancora parlare di diabete gestazionale. Per ottenere la conferma diagnostica si deve effettuare il carico orale con 100 grammi di glucosio (OGTT), questa volta a digiuno da 8-12 ore. Non è necessario ricorrere a

questo test se la glicemia supera i 198 mg/dl, elemento già di per sé sufficiente a porre diagnosi di diabete. Durante l'OGTT a 100 grammi, la glicemia viene misurata ad intervalli di tempo regolari, a digiuno e dopo 60, 120 e 180 minuti dall'ingestione del primo sorso di soluzione glucosata: se due o più valori glicemici risultano superiori a quelli di riferimento, si pone diagnosi di diabete gestazionale; se un solo valore è superiore, si fa diagnosi di intolleranza glucidica in gravidanza.

| | |
|-------------------|---------------------------|
| DIGIUNO | ≥ 95 mg/dL (5.2 mmol/L) |
| 60 MINUTI | ≥ 180 mg/dL (10.0 mmol/L) |
| 120 MINUTI | ≥ 155 mg/dL (8.6 mmol/L) |
| 180 MINUTI | ≥ 140 mg/dL (7.7 mmol/L) |

Tabella 3 OGTT a 100 g per GDM

La International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG), gruppo di consenso internazionale, costituita da 225 rappresentanti di diverse associazioni ostetriche e di diabete, tra cui l'ADA, ha proposto dei criteri diagnostici differenti per l'individuazione di diabete gestazionale. La IADPSG consiglia che tutte le donne, in cui non siano presenti né forme di intolleranza glucidica né diabete, devono essere sottoposte ad un OGTT con 75g di glucosio tra le settimane di gestazione 24 e 28. Il test deve essere effettuato al mattino dopo almeno 8 ore di digiuno. La diagnosi di GDM viene posta quando i livelli di glucosio plasmatico superano uno dei seguenti valori: a digiuno ≥92 mg/dL (5.1 mmol/L), 1 ora dopo ≥180 mg/dL (10.0 mmol/L) o dopo 2 ore dal test è >153 mg/dL (8.5 mmol/L).

| | |
|-------------------|--------------------------------|
| DIGIUNO | ≥ 92 mg/dL (5.1 mmol/L) |
| 60 MINUTI | ≥ 180 mg/dL (10.0 mmol/L) |
| 120 MINUTI | ≥ 153 mg/dL (8.5 mmol/L) |

Tabella 4 OGTT a 75g per GDM

Test alternativi proposti per l'individuazione di GDM comprendono il dosaggio dell'emoglobina glicata, della glicemia a digiuno, della glicemia random o della glicosuria. E 'stato visto, tuttavia, che questi test non sono efficaci come l'OGTT nell'identificare correttamente stati di iperglicemia.³¹

Uno studio condotto presso il nostro dipartimento di Medicina Prenatale da *Luchi C. et al* (2011)³² mette in relazione lo spessore della Translucenza Nucale (NT) e il GDM. Il meccanismo fisiopatologico alla base della NT non è ancora noto, probabilmente è dovuta ad un difetto dello sviluppo dei vasi linfatici cervicali, ad un'anomalia della matrice extracellulare od ad anomalie cardiovascolari ed emodinamiche³³. Il GDM potrebbe essere uno delle condizioni metaboliche che alterano lo spessore della NT dato che rappresenta un disordine pato-fisiologico in cui vi è sia un aumento della permeabilità del microcircolo causato dall'iperglicemia che la presenza di malformazioni cardiache congenite. Tuttavia, la differenza dello spessore della NT tra il gruppo di donne in cui è stato successivamente diagnosticato il GDM ed il gruppo controllo non era statisticamente significativa ($p = 0.585$). La valutazione di tale spessore, quindi, non può essere considerato un parametro valido per predire lo sviluppo di diabete gestazionale.

A livello globale il numero di donne con diagnosi di GDM è in aumento; fattori associati a questo dato includono un incremento dei tassi di obesità e il

ridotto esercizio fisico.³⁴ Si delinea sempre più, quindi, la necessità di individuare strategie efficaci ed efficienti per la diagnosi precoce di GDM.

1.2.4. Trattamento.

Il trattamento del GDM può ridurre l'incidenza dell'outcome negativo della gravidanza, in particolar modo della macrosomia.

L'auto controllo della glicemia rappresenta sicuramente la base per il raggiungimento dei livelli di glucosio plasmatico prefissati al fine di ridurre la mortalità perinatale: glicemia preprandiale ≤ 95 mg / dl e dopo 1 h ≤ 140 mg/dL o 2 ore dopo ≤ 120 mg / dl.

La *Medical Nutrition Therapy* (MNT) è molto importante per il controllo dell'iperglicemia. L'obiettivo della dieta è quello di fornire un giusto grado di nutrizione sia alla madre che al feto, con un corretto apporto di calorie per cercare di mantenere stabile il peso della madre e controllare i livelli plasmatici di glucosio. L'apporto calorico giornaliero calcolato è basato sul peso corporeo prima della gravidanza. Per indice di massa corporea (kg/m²) 20-25, > 25-34 e > 34, il rispettivo apporto calorico è 30, 25 e 20 kcal / kg. È stata rilevata una diminuzione del 42% di LGA e di parto cesareo in quelle donne in cui l'introito di carboidrati è stato mantenuto sotto controllo.³⁵

Un'attività fisica regolare dovrebbe essere aggiunta alla MNT, la quale può migliorare i livelli di glicemia a digiuno e post-prandiale e la sensibilità all'insulina.

La terapia con *Insulina* deve essere iniziata quando non si raggiunge il target di controllo glicemico tramite la dieta. Molti autori suggeriscono che la

somministrazione di insulina può essere iniziata per valori di glicemia postprandiali > di 140 mg/dL e/o dopo 2 ore > 120 mg/dL o quando la diagnosi di GDM viene fatta tardivamente. Questa terapia, tuttavia, può essere difficile da gestire a causa delle ripetute iniezioni, rischio di ipoglicemia e l'aumento ponderale.

Nuove proposte per la terapia di GDM riguardano l'utilizzo degli *Ipoglicemizzanti Orali*, in particolar modo Metformina e Gliburide, poiché sono facili da somministrare, sono più economici, vi è una migliore compliance da parte della paziente, non sono associati ad un aumento ponderale né a rischio di ipoglicemia. Una meta-analisi sull'outcome di gravidanze trattate con metformina non ha mostrato un incremento del rischio delle malformazioni più gravi.³⁶

La Gliburide non attraversa la placenta, anche quando la sua concentrazione supera i livelli terapeutici. La Metformina, invece, giunge alla circolazione fetale ma non sono stati ancora riportati casi di teratogenicità.

1.3. Pregnancy Associated Plasma Protein-A.

La *Pregnancy Associated Plasma Protein-A* (PAPP-A) è stata studiata sia come marker di rischio per le alterazioni cromosomiche che come parametro biochimico sierologico in grado di regolare numerosi processi nella dinamica dello sviluppo fetale e placentare.

La PAPP-A è una metalloproteinasi prodotta principalmente dal sincizio trofoblasto e presente a livello plasmatico per tutta la durata della gravidanza. Tuttavia, la sintesi di tale proteina è stata riportata, al di fuori del periodo di gravidanza, anche da parte del corpo luteo, dei follicoli ovarici, dell'endometrio,

delle cellule muscolari lisce vascolari, degli epatociti, del pancreas, della milza e del midollo osseo. Isolata nel 1974 come una delle quattro proteine di origine placentare maggiormente presenti nel sangue materno³⁷, il suo ruolo biologico è rimasto nell'ombra per quasi venticinque anni. Successivamente *Lawrence et al.* (1999)³⁸ isolarono dai fibroblasti umani una proteina con attività protesica nei confronti dell'*insulin-like growth factor binding protein-4* (IGFBP-4) IGF-dipendente e scoprirono che tale proteina era la PAPP-A. Attraverso il clivaggio della IGFBP-4 si riduce la sua affinità per le IGF e in tal modo, quest'ultime, risultano più disponibili per il legame con il loro recettore. Le *Insuline Like Growth Factors*, in particolare IGF-1 e IGF-2, sono proteine in grado di mediare l'invasione della decidua uterina da parte del sincizio trofoblasto, controllare la steroidogenesi, il trasporto degli aminoacidi e del glucosio all'interno dei villi corionici. Giunti a conoscenza dell'attività svolta dalla PAPP-A, molti studi sono stati condotti per dimostrare una possibile relazione tra i suoi livelli plasmatici e le complicanze associate alla gravidanza.

Il campo della medicina prenatale in cui viene maggiormente sfruttato il dosaggio della PAPP-A è sicuramente nello screening delle anomalie cromosomiche fetali durante il primo trimestre di gravidanza. Lo screening combinato per le trisomie 13, 18 e 21, che comprende lo studio ecografico della translucenza nucale fetale (NT) associato ai livelli sierici della gonadotropina corionica umana (β -HCG) e della pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A), viene eseguito nel primo trimestre di gravidanza, tra la 11+0 e 13+6 settimane ed individua circa il 90% delle gravidanze a rischio, con un tasso di falsi positivi del 5%. Per rendere più efficace lo screening, la stima accurata del rischio

richiede aggiustamenti nel dosaggio dei due ormoni, i quali devono essere associati all'età gestazionale, al peso materno, all'abitudine al fumo, al gruppo etnico e alle modalità di concepimento³⁹⁻⁴⁰. Per questo, ogni valore misurato viene convertito in un multiplo della mediana (MoM) atteso per una gravidanza con le stesse caratteristiche. Nelle gravidanze con cariotipo euploide, il valore medio sia di beta-hCG che di PAPP-A è di 1.0 MoM, mentre nelle gravidanze in cui è presente un feto con trisomia 21, il valore medio di beta-hCG è di 2.0 MoM e quello di PAPP-A è di 0.5 MoM. È stato visto, inoltre, che nelle trisomie 18 e 13 i valori sierici materni di beta-hCG e di PAPP-A sono diminuiti⁴¹; nelle anomalie cromosomiche sessuali, i livelli di beta-hCG sono normali e quelli della PAPP-A sono diminuiti⁴²; nelle triploidie diandriche i livelli di beta-hCG sono notevolmente aumentati, mentre quelli di PAPP-A sono leggermente diminuiti; nelle triploidie diaginiche, infine, sia i livelli di beta-hCG che quelli di PAPP-A sono marcatamente diminuiti⁴³.

È stata riscontrata un'associazione anche tra i livelli sierici della PAPP-A e il rischio *Pre-eclampsia*. In uno studio condotto da *K. H. Nicolaides et al.* (2009)⁴⁴, i livelli di PAPP-A sono risultati essere al di sotto del 5° percentile nel 21.9% delle pazienti con PE precoce e nel 6.5% delle pazienti con PE tardiva. Tuttavia, il solo dosaggio della PAPP-A non è un metodo di screening efficace, ma deve essere associato ad altri markers. Algoritmi che combinano le caratteristiche materne (origine razziale, indice di massa corporea, anamnesi remota e familiare di preeclampsia), pressione arteriosa media, l'indice di pulsatilità dell'arteria uterina (Uta-PI) e i test biochimici per il dosaggio della PAPP-A eseguiti durante il primo trimestre (da 11+0 a 13+6 settimane) potrebbero potenzialmente

identificare circa 90, 80 e 60% di gravidanze che successivamente svilupperebbero la Preeclampsia precoce (prima delle 34 settimane), intermedia (34-37 settimane) e tardiva (dopo 37 settimane), con un tasso di falsi positivi del 5%.

Un'altro ambito della medicina Prenatale in cui viene preso in esame il dosaggio della PAPP-A è nello screening dei feti *Small For Gestational Age* (SGA). In uno studio retrospettivo, condotto da *Karagiannis et al.* (2011)⁴⁵, sono stati confrontati i valori dell'indice di pulsatilità dell'arteria uterina (Uta-PI), della pressione arteriosa media, dei livelli sierici di PAPP-A e fβ-HCG, *Placental Growth Factor* (PLGF), *Placental protein 13* (PPI3), *A Disintegrin And Metalloprotease* (ADAM 12), translucenza nucale (NT) tra un gruppo con SGA e un gruppo di controllo. Nel gruppo di donne nel quale si sviluppava la patologia, i valori di tutti i marker sopra citati erano significativamente ridotti rispetto al gruppo controllo. Tali parametri sono stati associati anche ad alcune caratteristiche materne (gruppo etnico, fumo, altezza, peso, fecondazione assistita, ipertensione arteriosa e pregresso episodio di SGA). Inoltre, è stato osservato che la differenza tra Uta-PI, livelli sierici di PAPP-A, PLGF, PP13 e ADAM 12 tra il gruppo-SGA e il gruppo- non-SGA erano maggiori in quel sottogruppo in cui il parto è avvenuto prima delle 37 settimane. In definitiva, tale studio ha dimostrato che l'associazione tra i valori biochimici e fisiologici materni potrebbe migliorare la diagnosi precoce di SGA in assenza di Preeclampsia nel 73% di quelle gravidanze che richiedono un parto prima delle 37 settimane e nel 46% di quelle che giungono a termine.

È stato inoltre visto che bassi livelli sierici di PAPP-A possono riflettere un'alterata invasione del sincizio trofoblasto, essi possono essere associati anche con un elevato rischio di rottura prematura delle membrane (PPROM) e di parto pretermine.

Il *Ritardo di Crescita Intrauterino* (IUGR) è una patologia responsabile di mortalità perinatale, morbidità infantile e sviluppo di patologie cardiovascolari e metaboliche nell'età adulta. Nello studio condotto da Cheong et al. nel 2005⁴⁶, i bassi livelli di PAPP-A sono associati ad un aumento del rischio relativo di *basso peso alla nascita* (LBW) e IUGR, con una bassa sensibilità: per valori di PAPP-A fino a 0,5 MoM, la sensibilità predittiva era tra il 16,2% e il 22,5% e la specificità era intorno all'86%. Tuttavia, quando il cut-off era di 0,3 MoM, la più alta sensibilità riscontrata era solo del 10.1% con una specificità del 96%. Quindi, i bassi livelli di PAPP-A erano associati con IUGR e LBW, ma la sensibilità era bassa; pertanto la PAPP-A utilizzata come singolo marker non è sufficiente a predire LBW e IUGR.

Non vi sono studi a sufficienza sulla possibile relazione tra PAPP-A e il *Diabete Mellito Gestazionale* (GDM). Tuttavia, l'ormai noto rapporto tra GDM e macrosomia, potrebbe essere spiegato prendendo in considerazione l'attività proteasica svolta dalla PAPP-A nei confronti delle IGBP-4: bassi livelli di PAPP-A potrebbero portare ad una minore disponibilità delle IGFs, le quali, come è stato già riportato, hanno un ruolo chiave nella regolazione della crescita fetale, nella captazione di glucosio e aminoacidi nelle colture di trofoblasto e nell'invasione della decidua da parte del trofoblasto. Probabilmente, i bassi livelli di PAPP-A, riscontrati durante il primo trimestre di gravidanza in quel gruppo di

donne che ha sviluppato consecutivamente il diabete gestazionale, potrebbero riflettere uno stadio iniziale di intolleranza al glucosio già presente all'inizio della gravidanza. Questa ipotesi è stata supportata da *Pellitero et al. (2007)*⁴⁷, i quali hanno studiato il rapporto tra PAPP-A, citochine infiammatorie ed il controllo della glicemia in donne con diabete al di fuori della gravidanza. Tale studio ha dimostrato che i livelli sierici della PAPP-A erano significativamente più bassi nelle pazienti affette da diabete rispetto al gruppo controllo.

In un altro studio caso-controllo condotto da *Lovati E. et al. (2011)*⁴⁸, nel gruppo di donne che ha sviluppato il diabete gestazionale nel secondo trimestre, sia la concentrazione mediana che la multiple of median (MoM) della PAPP-A nel primo trimestre erano significativamente più bassi rispetto a quelli riscontrati nel gruppo controllo (rispettivamente 0,7 vs 1,2, $P < 0.001$).

I livelli sierici di PAPP-A sono stati riscontrati diminuiti anche nelle gestanti con Diabete Mellito Insulino-Dipendente (IDDM) pre-gestazionale (IDDM 0.88 MoM, non-IDDM 1.03 MoM; $p < 0,0001$)⁴⁹.

1.4. Free β -hCG.

La gonadotropina Corionica Umana (hCG) è un ormone glicoproteico composto da due subunità α e β entrambi necessarie per l'attività biologica dell'ormone. A causa della sua eterogeneità strutturale, nei fluidi biologici riscontriamo diverse isoforme, come l'ormone attivo (hCG), "nicked" hCG (hCGn), subunità β libere (hCG β), subunità α libere (hCG α), frammento β -core (hCG β cf, prevalentemente rilevato nelle urine) e "nicked" β -subunità (hCG β n).

L'hCG è fisiologicamente prodotto dalle cellule del sinciziotrofoblasto durante la gravidanza e stimola la produzione di progesterone interagendo con i recettori LH/hCG. Piccole quantità di hCG sono secrete anche dalla ghiandola pituitaria, dal fegato, dal colon, dal testicolo e da alcune cellule neoplastiche.

Il dosaggio di tale ormone viene utilizzato in molte condizioni cliniche, come la diagnosi, il monitoraggio e il follow-up di patologie legate alla gravidanza, screening prenatale per le anomalie cromosomiche e tumori ginecologici.

Si rimanda al paragrafo precedente per gli studi effettuati sull'utilizzo del fβ-hCG come parametro di screening per alcune patologie associate alla gravidanza.

1.5. Body Mass Index.

L'indice di massa corporea [BMI, body mass index = BW (kg) / BH (m)²] è l'indice pondero-staturale più impiegato nella pratica clinica in ragione del suo valore prognostico nella malnutrizione per eccesso e per difetto.

| CLASSIFICAZIONE | BMI (KG/M²) |
|------------------------|-------------------------------|
| Sottopeso | < 18.5 |
| Normopeso | 18.5 – 24.9 |
| Sovrappeso | ≥25.0 |
| Pre-Obesità | 25.0 – 29.9 |
| Obesità Classe I | 30.0 – 34.9 |
| Obesità Classe II | 35.0 – 39.9 |
| Obesità Classe III | ≥ 40.0 |

Tabella 5. Valori di BMI per la diagnosi del difetto e dell'eccesso ponderale nell'adulto di entrambi i sessi.

Ci sono molte condizioni patologiche che sono state associate ad un incremento del peso, sia in gravidanza che al di fuori di essa.

Nelle donne con BMI > 30 o peso > 150% del peso ideale, l'incidenza di GDM è da 1,4 a 20 volte maggiore rispetto alla popolazione generale.⁵⁰

Una revisione sistematica con meta-analisi di studi osservazionali pubblicati dal 1977 al 2007 ha valutato e quantificato il rischio di GDM in base al BMI. Da questo studio si evince che la prevalenza di GDM incrementa dello 0,92% per ogni 1 kg/m² di BMI che aumenta.⁵¹

Nello studio caso-controllo condotto da *Lovati et al.* (2011) già citato nel paragrafo 1.3, è stato riscontrata una forte associazione tra i bassi livelli di PAPP-A ed un aumentato Body Mass Index (BMI), suggerendo una potenziale interazione tra il BMI e la tolleranza al glucosio sull'espressione della PAPP-A. Questa interazione sembra plausibile poiché elevati valori di BMI sono di solito associati con un peggior controllo glicemico e con le forme più gravi di diabete gestazionale.

1.6 Obiettivo dello Studio.

In Italia, oggi, vengono applicate le linee guida stabilite dalla “Conferenza Nazionale di consenso per raccomandazioni ed implementazioni delle nuove linee guida per lo screening e la diagnosi del Diabete Gestazionale”, convocato dal Gruppo di studio “Diabete e Gravidanza” SID-AM, riunita a Roma nel Marzo del 2010.

Essa stabilisce che già durante la prima visita in gravidanza deve essere valutata la presenza di un diabete manifesto mediante la determinazione della glicemia plasmatica a digiuno o la glicemia random. I valori glicemici che permettono la diagnosi di diabete mellito manifesto sono: ≥ 126 mg/dL per la

glicemia a digiuno e ≥ 200 mg/dL per quella random; se il valore della glicemia alla prima visita è ≥ 92 mg/dL ma < 126 mg/dL si pone diagnosi di Diabete Gestazionale. Tutte le gestanti che non presentano i suddetti valori, indipendentemente dalla presenza di eventuali fattori di rischio per GDM, devono eseguire un carico orale di glucosio tra la 24 e la 28 settimana di gestazione. L'OGTT deve essere eseguito con 75 gr di glucosio e prelievi venosi a 0, 60 e 120 minuti per la determinazione della glicemia plasmatica. Si pone diagnosi di GDM quando uno o più valori risultano uguali o superiori a quella soglia (vedi tab. 4).

Il nostro studio si pone come obiettivo quello di mettere in evidenza l'importanza del primo trimestre di gravidanza come momento di selezione delle gravidanze a rischio, in modo da indirizzare precocemente le gestanti verso percorsi diagnostico-terapeutici specifici. Abbiamo focalizzato la nostra attenzione in particolare sul Diabete Gestazionale, la cui prevalenza è generalmente compresa tra il 2 ed il 6%, ma può raggiungere il 10-20% nelle popolazioni ad alto rischio.

La diagnosi di tale patologia già al primo trimestre di gestazione potrebbe portare ad alcuni vantaggi relativi sia alla terapia che all'outcome della gravidanza. Infatti, si potrebbe instaurare un regime dietetico specifico sin dall'inizio, il quale porterebbe ad una riduzione della terapia farmacologica insulinica ed, in ultima istanza, ad una notevole riduzione dei costi sociali.

Nel corso degli anni sono state proposte diverse modalità di suddivisione delle gestanti e, nella maggior parte degli studi condotti, il fattore di rischio con maggiore valenza predittiva risulta essere la presenza di diabete gestazionale nelle

gravidezze precedenti.⁵²Tuttavia, i valori predittivi riscontrati fino ad esso non sono stati numerosi .

A tal scopo, abbiamo analizzato il dosaggio di PAPP-A e f β -hCG, poiché sono due parametri ormai ampiamente inseriti nei test di screening per le anomalie cromosomiche svolti durante il primo trimestre di gravidanza e quindi il loro utilizzo non richiederebbe eccessivi costi aggiuntivi a quelli già previsti dai LEA stabiliti dal Sistema Sanitario Nazionale.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Raccolta dei dati.

Lo studio da noi effettuato è uno studio retrospettivo caso-controllo che mette in relazione 81 gravidanze complicate dall'insorgenza di GDM e 109 controlli in una popolazione non a rischio.

I soggetti dello studio sono stati selezionati, in modo randomizzato, tra le donne che si sono recate presso la Clinica Ginecologica ed Ostetrica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana dal 2010 al 2011, per sottoporsi al test di screening per le anomalie cromosomiche, nel periodo gestazionale compreso tra le settimane 11+0 e 13+6, ed al test di screening per GDM, tra le settimane 24 e 28, presso la UO di Malattie del Metabolismo e Diabetologia dell'Ospedale di Cisanello.

Abbiamo fatto in modo che i parametri utilizzati nello studio siano già inseriti nei LEA stabiliti dal Sistema Sanitario Regionale, per proporre una suddivisione dei gruppi a rischio senza costi aggiuntivi a quelli già previsti per lo screening di anomalie cromosomiche durante il primo trimestre gestazionale: *Pregnancy Associated Plasma Protein-A* (PAPP-A) e il *Free β -HCG*.

In occasione del test di screening per le anomalie cromosomiche, alle gestanti è stato chiesto di presentarsi a digiuno presso il Servizio di Diagnosi Prenatale della Clinica Ostetrica e Ginecologica Universitaria, per il prelievo di un campione di sangue. Il dosaggio di PAPP-A e f β -hCG è stato valutato dal laboratorio universitario con la strumentazione BRAHMS KRYPTOR certificata

dalla Fetal Medicine Foundation. I valori dei due parametri biochimici sono stati convertiti in un multiplo della mediana (MoM) atteso per una gravidanza che si trovi nello stesso periodo gestazionale, che presenti le stesse modalità di concepimento, etnia, peso materno ed abitudine al fumo.⁵⁴ Il software utilizzato per la conversione è l'ASTRAIA 2.3.2. il quale utilizza gli algoritmi stabiliti dalla Fetal Medicine Foundation (www.fetalmedicinefoundation.com). In questa occasione vengono raccolti anche i dati anamnestici delle gestanti: etnia, parità, peso ed altezza, abitudini al fumo, la presenza di precedenti gravidanze complicate soprattutto da anomalie cromosomiche e preeclampsia, utilizzo di farmaci in gravidanza ed anamnesi familiare di malformazioni strutturali e trisomie.

La diagnosi di GDM è stata effettuata tramite il test di screening a cui tutte le gestanti si sottopongono, indipendentemente dalla presenza di fattori di rischio, nel periodo che intercorre tra le settimane di gestazione 24 e 28. L'OGTT è stato eseguito al mattino dopo un periodo di digiuno di almeno otto ore. Il test consiste nella somministrazione di 75 g di glucosio diluiti in 100 mL di acqua e nella misurazione della glicemia plasmatica a 0, 60 e 120 minuti. La diagnosi di diabete gestazionale è stata posta quando i livelli sierici di glucosio erano uguali o superavano almeno uno dei seguenti valori: 92 mg/dL , 180 mg/dL e 153 mg/dL rispettivamente a digiuno, dopo una e dopo due ore. Le gestanti che presentavano livelli glicemici inferiori ai suddetti valori sono state reclutate nel gruppo controllo.

Dopo la diagnosi di GDM, il primo approccio terapeutico si è basato sulle modifiche dello stile di vita, in particolar modo sulla dieta. La terapia insulinica è

stata adottata in quelle gestanti in cui la glicemia non poteva essere controllata solo con la terapia nutrizionale.

Tramite i registri della sala parto della clinica abbiamo raccolto i dati relativi a timing e modalità di parto

Nel reparto di Neonatologia sono stati raccolti i dati relativi alle condizioni cliniche dei bambini nati dalle gestanti appartenenti ad entrambi i gruppi, in particolare la presenza di macrosomia e l'APGAR- Sore.

2.2 Analisi Statistica

I dati sono stati inseriti in un database Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA) ed analizzati per correggere eventuali errori di immissione. Il database è stato successivamente bloccato ed importato in SPSS 21.0 per Mac (SPAA, Inc., IL). La statistica è stata mascherata con l'assegnazione di lettere greche alle variabili.

L'analisi univariata è stata effettuata con il test t-student, secondo la normalità della distribuzione dei dati continua, mentre il test χ^2 è stato utilizzato per i dati percentuali. Le probabilità sono state determinate con intervalli di confidenza al 95%.

Per la potenza statistica del dato, infine, abbiamo eseguito una regressione lineare utilizzando come variabile dipendente la presenza/assenza della patologia e come variabili indipendenti il BMI, la PAPP-A e il f β -hCG.

3. RISULTATI

Nella Tabella 6 sono riportati i parametri biochimici e biofisici della popolazione studiata.

L'età media delle gestanti nel gruppo GDM è di 32,9 anni e 33, 5 nel gruppo Controllo ($p= 0,374$).

È stato dimostrato che vi è una differenza statisticamente significativa tra la media dei livelli plasmatici di PAPP-A (MoM) nel gruppo GDM e quelli nel gruppo controllo, rispettivamente 1,201 vs 1,575 ($p<0,001$). In particolare è stato dimostrato, dopo aver diviso i valori dei due campioni in quartili ed aver indicato la mediana ed il range interquartile, che il 51,8% delle gestanti del gruppo GDM presenta livelli plasmatici di PAPP-A inferiori a 0,988 MoM contro il 4,6% del gruppo controllo ($p<0,001$) (Fig. 2-3).

Non sono stati ottenuti gli stessi risultati per il parametro β -hCG i cui valori medi dei due gruppi non presentano differenze statisticamente significative: 1,114 nel gruppo GDM e 1,118 nel gruppo Controllo ($p=0,490$) ; anche il confronto fra le mediane ed i range interquartili, effettuato con il test χ^2 , non ha portato ad alcun risultato rilevante.

Come previsto, abbiamo ottenuto una differenza altamente significativa confrontando le medie dei valori di BMI dei due gruppi e anche per il parametro Familiarità (BMI: 24,27 nel gruppo GDM e 22,03 nel gruppo Controllo, $p<0,001$; Familiarità: 37% vs 13,8%, $p<0,001$).

| Variabile | Categoria | GDM N=81 | Controlli N=109 | p-value |
|--------------------------------|-----------------|------------|-----------------|---------|
| Familiarietà | SI | 37(n=30) | 13,8(n=15) | <0,001 |
| | NO | 63(n=51) | 86,2(n=94) | <0,001 |
| Età | Media | 32,9 | 33,5 | 0,374 |
| Categorie d'Età % | <25 | 1,23(n=1) | 3,7(n=4) | 0,299 |
| | ≥25 e <35 | 63(n=51) | 50,5(n=55) | 0,086 |
| | ≥35 | 35,8(n=29) | 45,9(n=50) | 0,164 |
| PAPP-A MoM | Media | 1,201 | 1,575 | <0,001 |
| PAPP-A MoM per quartile(%) | <0,988 | 51,8(n=42) | 4,6(n=5) | <0,001 |
| | ≥0,988 e <1,294 | 13,6(n=11) | 33,9(n=37) | 0,002 |
| | ≥1,294 e <1,683 | 14,8(n=12) | 32,1(n=35) | 0,006 |
| | ≥1,683 | 19,7(n=16) | 29,4(n=32) | 0,131 |
| Free β-hCG MoM | Media | 1,114 | 1,188 | 0,490 |
| Free β-hCG MoM per quartile(%) | <0,66 | 25,9(n=21) | 23,8(n=26) | 0,744 |
| | ≥0,66 e <0,953 | 28,4(n=23) | 23,8(n=26) | 0,479 |
| | ≥0,953 e <1,424 | 22,2(n=18) | 26,6(n=29) | 0,488 |
| | ≥1,424 | 23,5(n=19) | 25,7(n=28) | |
| BMI | Media | 24,27 | 22,03 | <0,001 |
| Categorie di BMI(%) | <25 | 63(n=51) | 91,7(n=100) | <0,001 |
| | ≥25 e <30 | 27,2(n=22) | 8,3(n=9) | <0,001 |
| | ≥30 | 9,9(n=8) | 0(n=0) | <0,001 |

Tabella 6 . Parametri biochimici e biofisici della popolazione studiata.

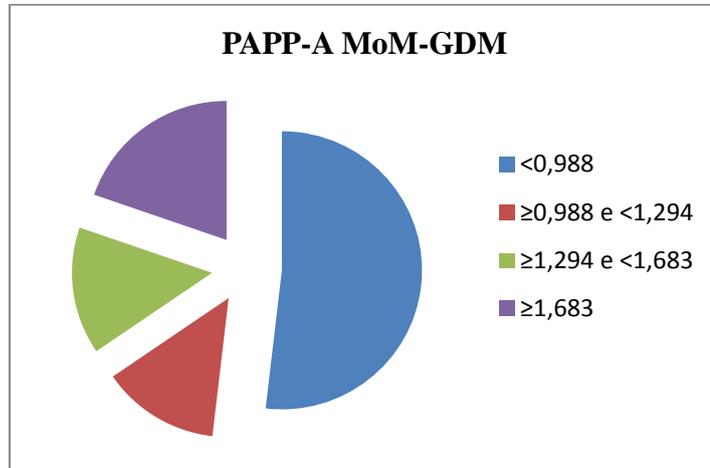


Figura 2 Distribuzione dei valori di PAPP-A (MoM) nel campione GDM

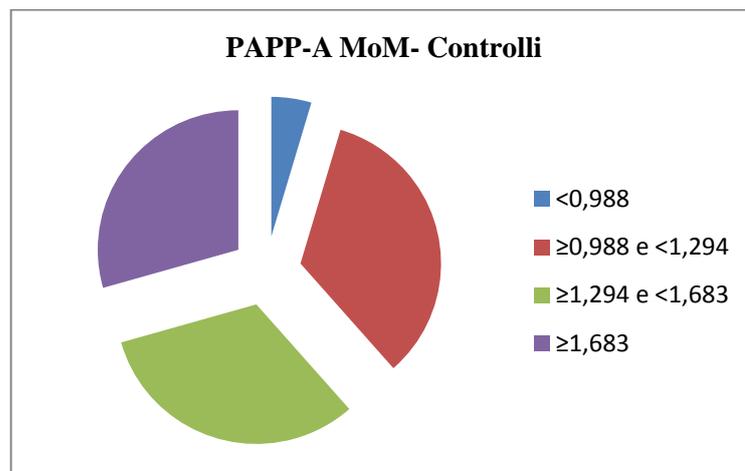
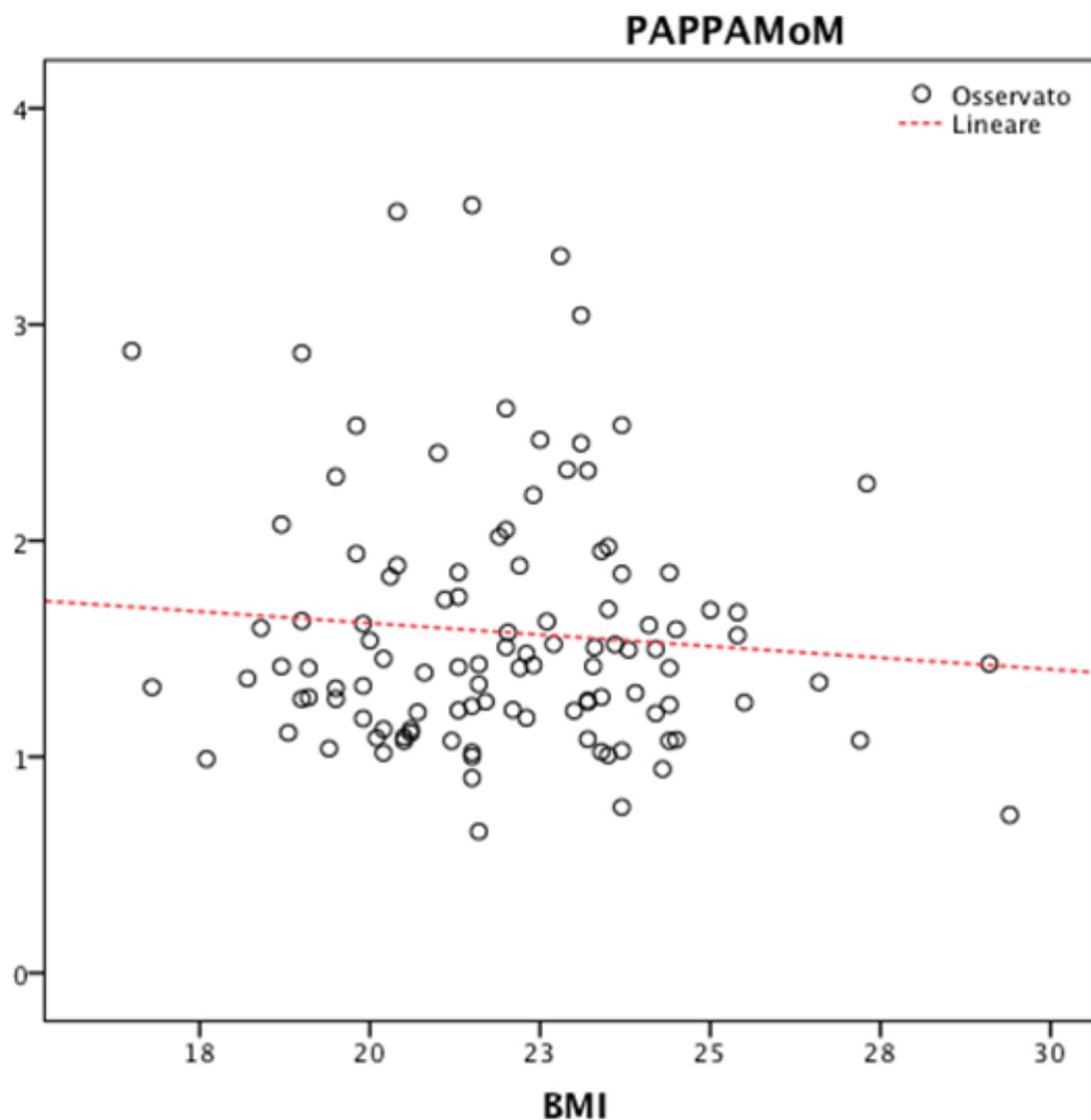


Figura 3. Distribuzione dei valori di PAPP-A (MoM) nel campione Controlli

A differenza di quanto riportato nello studio del 2011 di F. Beneventi *et al.*⁵⁵, non abbiamo riscontrato alcuna relazione tra PAPP-A e BMI, sia nel gruppo controllo ($p=0,368$, Fig.4) che nel gruppo GDM ($p=0,433$, Fig.5).

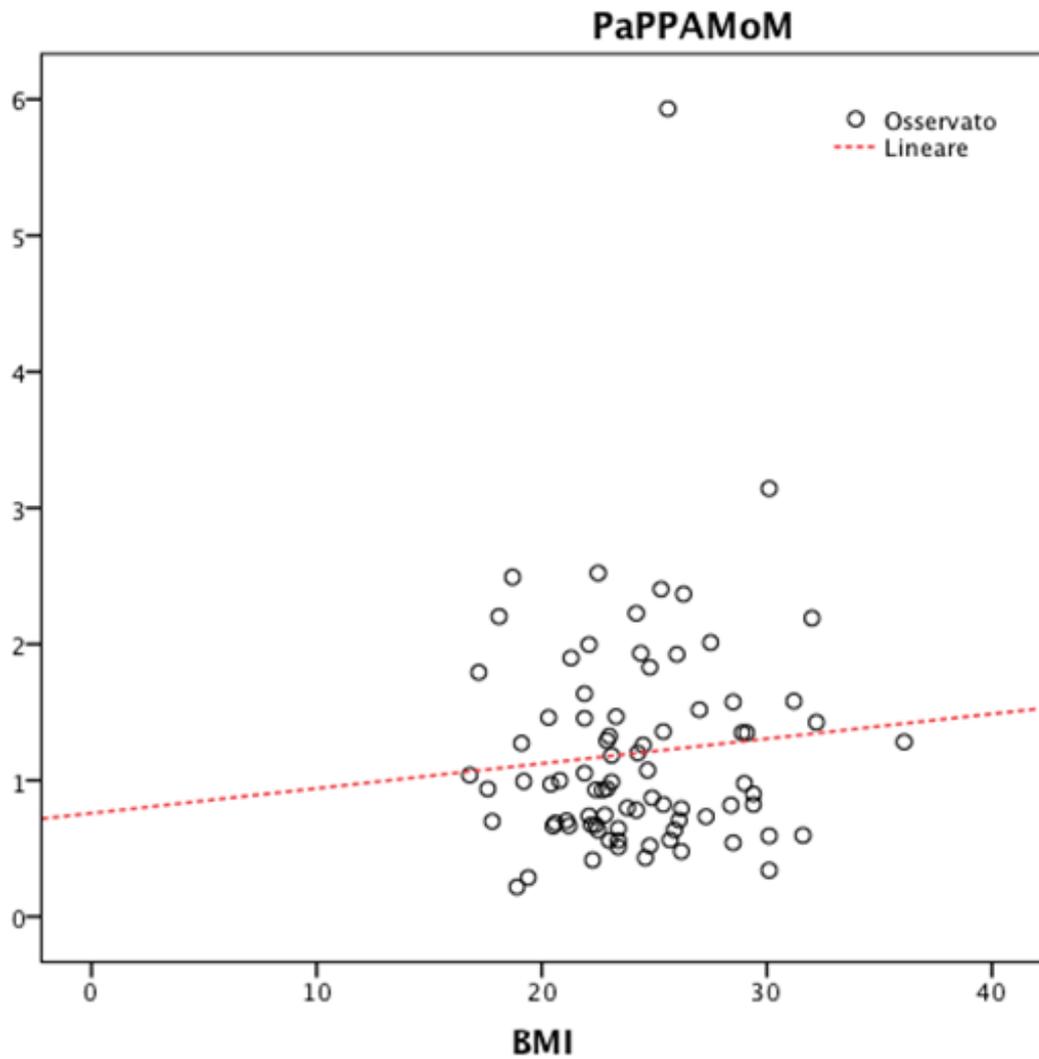


Variabile dipendente: PAPP-A MoM

| Equazione | Riepilogo del modello | | | | | Stime di parametri | |
|-----------|-----------------------|-------|-----|-----|--------------|--------------------|--------|
| | R-quadrato | F | df1 | df2 | Sig. | Costante | b1 |
| Lineare | 0,007 | 0,816 | 1 | 108 | 0,368 | 2,046 | -0,021 |

La variabile indipendente è BMI.

Figura 4. Correlazione tra PAPP-A (MoM) e BMI nel gruppo controllo



Variabile dipendente: PaPP-A MoM

| Equazione | Riepilogo del modello | | | | | Stime di parametri | |
|-----------|-----------------------|-------|-----|-----|--------------|--------------------|-------|
| | R-quadrato | F | df1 | df2 | Sig. | Costante | b1 |
| Lineare | 0,008 | 0,620 | 1 | 80 | 0,433 | 0,759 | 0,018 |

La variabile indipendente è BMI.

Figura 5. Correlazione tra PAPP-A (MoM) e BMI nel gruppo GDM

Una regressione logistica uni variata è stata eseguita utilizzando come variabile dipendente la presenza/ assenza di Diabete gestazionale e come variabili indipendenti la PAPP-A, il BMI, la familiarità e il fβ-hCG. Tale regressione ha mostrato una forte correlazione tra la patologia e tre dei parametri indicati, quali PAPP-A ($p=0,001$), BMI ($p<0,001$) e familiarità ($p= 0,008$).

Coefficienti^a

| Modello | Coefficienti non standardizzati | | Coefficienti standardizzati | t | Sig. |
|-------------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------|-------|
| | B | Deviazione standard Errore | Beta | | |
| (Costante) | 1,400 | 0,368 | | 3,810 | 0,000 |
| Età | 0,001 | 0,008 | 0,008 | 0,127 | 0,899 |
| Fβ-hCG | -0,038 | 0,047 | -0,055 | -0,800 | 0,425 |
| PAPP-A | 0,160 | 0,047 | 0,230 | 3,402 | 0,001 |
| BMI | -0,043 | 0,010 | -0,287 | -4,203 | 0,000 |
| Familiarità | -0,213 | 0,079 | -0,183 | -2,687 | 0,008 |

a. Variabile dipendente: Disease

Tabella 7. Correlazione tra i parametri biochimici e biofisici dei campioni GDM e Controllo e il Diabete gestazionale (variabile dipendente).

È stata eseguita una regressione logistica multivariata prendendo in analisi i dosaggi di PAPP-A dell'intera popolazione studiata suddivisi in quattro gruppi. Come mostrato nella Tabella 8, il 24,7 % delle gestanti, appartenenti sia al gruppo GDM che al gruppo Controllo, presenta valori di PAPP-A inferiori a 0,988 MoM; il 25,3 % presenta valori tra $\geq 0,988$ e $< 1,294$; il 24,7% è compreso tra 1,294 e 1,683 ed il 25,3% della popolazione studiata presenta valori $\geq 1,683$. Da tale analisi si evince che vi è una forte associazione tra il livelli plasmatici di PAPP-A $< 0,988$ durante il primo trimestre di gravidanza e la successiva insorgenza di Diabete Gestazionale [OR: 16,8 (IC: 5,5- 50, 6)](Tab. 9).

| | | N | Percentuale marginale |
|-----------------------------|---------------------------|-----|-----------------------|
| Diabete Gestazionale | Presente | 81 | 42,6% |
| | Assente | 109 | 57,4% |
| PAPPAMoM | <0,988 | 47 | 24,7% |
| | ≥0,988 e <1,294 | 48 | 25,3% |
| | ≥1,294 e <1,683 | 47 | 24,7% |
| | ≥1,683 | 48 | 25,3% |
| Valido | | 190 | 100,0% |
| Mancante | | 2 | |
| Totale | | 192 | |
| Sottopopolazioni | | 4 | |

Tabella 8. Distribuzione dei valori di PAPP-A nel campione GDM e nel campione Controllo.

| Presenza di Diabete Gestazionale ^a | B | df | Sig. | OR | Intervallo di confidenza al 95% per OR | |
|---|----------------|----|-------|---------------|--|------------------|
| | | | | | Limite inferiore | Limite superiore |
| Intercetta | -0,693 | 1 | 0,024 | | | |
| [PAPPAMoM < 0,988] | 2,821 | 1 | 0,000 | 16,800 | 5,567 | 50,697 |
| [PAPPAMoM ≥0,988 e <1,294] | -0,492 | 1 | 0,285 | 0,611 | 0,248 | 1,508 |
| [PAPPAMoM ≥1,294 e <1,683] | -0,405 | 1 | 0,370 | 0,667 | 0,275 | 1,619 |
| [PAPPAMoM ≥1,683] | 0 ^b | 0 | . | . | . | . |

a. La categoria di riferimento è: 1,0.

b. Questo parametro è impostato su zero perché è ridondante.

Tabella 9. Stime dei parametri.

È stata valutata la sensibilità dei parametri correlati al diabete gestazionale, sia singolarmente che associati fra di loro.

| | DR % | FALSI POSITIVI % |
|----------------------------------|-------------|-------------------------|
| BMI > 25 | 82 | 17 |
| PAPP-A < 0,988 | 88 | 11 |
| FAMILIARITA' (SI) | 66 | 33 |
| BMI + PAPP-A | 90 | 0,9 |
| BMI + FAMILIARITA' | 92 | 0,7 |
| FAMILIARITA'+ PAPP-A | 92 | 0,7 |
| BMI + FAMILIARITA'+PAPP-A | 100 | 0 |

Tabella 8. Detection Rate e Falsi Positivi stimati per i parametri singolarmente ed associati

4.DISCUSSIONE

Questo è uno studio retrospettivo eseguito in una popolazione a basso rischio per lo sviluppo di diabete gestazionale. I soggetti dei due campioni sono stati selezionati tra le gestanti che hanno intrapreso il Percorso di Diagnosi Prenatale presso Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana. Un limite dello studio è che la numerosità del campione, ad oggi, non è molto ampia, poiché non tutte le gestanti che si sono sottoposte al test di screening per GDM nelle settimane tra la 24 e la 28, avevano precedentemente effettuato il test di screening per anomalie cromosomiche durante il primo trimestre di gravidanza.

Il Diabete Gestazionale è il disordine metabolico maggiormente associato ad un incremento della morbilità materna e perinatale⁵⁶. La sua incidenza dipende dai criteri diagnostici utilizzati con i diversi cut-off glicemici⁵⁷ e varia ampiamente tra i vari gruppi etnici. In Italia, la prevalenza è di circa il 6,3 %; questo dato epidemiologico risale al 2009 e lo studio è stato condotto utilizzando ancora i criteri di Carpenter e Coustan per la diagnosi di diabete gestazionale e quindi i valori glicemici risultano , anche se di poco, più elevati. Tuttavia possiamo collocare l'Italia nella fascia delle popolazioni a basso rischio per lo sviluppo di GDM, con un'incidenza che oscilla tra il 2% ed il 6% , raggiungendo il 22% solo in Sardegna (*Galtier F* 2010).

Il numero di donne con Diabete Gestazionale è costantemente in aumento; questa tendenza può essere attribuita all'aumento dell'età materna, ma soprattutto all'affermarsi di un'eclatante epidemia dell'obesità. Questo rende il GDM

un'importante minaccia per il *Millenium Development Goal* per il miglioramento della salute materna e del neonato⁵⁸.

Il Diabete Gestazionale è associato ad un elevato rischio di complicanze che possono insorgere nel corso della gravidanza ed al momento del parto, come il feto con macrosomia che implica il ricorso al taglio cesareo per prevenire prevalentemente la distocia di spalla, la preeclampsia, l'ipoglicemia alla nascita, l'iperbilirubinemia, la policitemia, ipocalcemia/ipomagnesemia, mortalità perinatale, miocardiopatia ipertrofica e sindrome da distress respiratorio; tale patologia è responsabile anche di complicanze a lungo termine quali una maggiore predisposizione all'intolleranza al glucosio, al diabete e all'obesità. Le complicanze a lungo termine più frequente per la madre è quella di sviluppare il *Diabete Mellito di tipo 2* (DMII) a distanza; un terzo delle donne con DMII ha manifestato precedentemente il diabete gestazionale⁵⁹.

Con le linee guida attuali, le gestanti ad alto rischio vengono inserite all'interno di un percorso diagnostico-assistenziale non prima delle 16 settimane, mentre le gestanti a basso rischio solo dopo il periodo gestazionale compreso tra le settimane 24-28.

Sono stati condotti diversi studi al fine di individuare dei parametri che potessero essere predittivi per lo sviluppo di diabete gestazionale. Nel nostro studio abbiamo riproposto alcuni dei parametri già ampiamente studiati, quali la familiarità, il BMI e l'età materna ed abbiamo aggiunto la *Pregnancy Associated Plasma Protein-A* (PAPP-A) e il fβ-hCG, parametri che vengono già valutati durante il primo trimestre di gravidanza in occasione dello screening per le

anomalie cromosomiche, entrambi fattori di crescita ed in quanto tali potrebbero essere coinvolti nello sviluppo fetale ed in altri processi metabolici. L'associazione tra i fattori di rischio già noti ed i marker biochimici del primo trimestre di gravidanza potrebbe essere efficace nel migliorare l'accuratezza nella selezione di una popolazione ad alto rischio di sviluppo del diabete gestazionale.

4.1 Familiarità per Diabete Gestazionale

Il primo parametro studiato è la familiarità per diabete gestazionale, fattore di rischio maggiormente associato all'insorgenza di tale patologia. La positività anamnestica per GDM comporta un rischio da 1,6⁶⁰ a 3⁶¹ volte maggiore rispetto la popolazione generale. In questo studio la familiarità per GDM è presente nel 37% delle gestanti appartenenti al gruppo GDM e nel 13% del gruppo Controllo ($p < 0,001$). Tale parametro, come previsto, è fortemente associato alla presenza di diabete gestazionale ($p = 0,008$).

4.2 Età

In molti studi è stato osservato che con l'avanzare dell'età della donna si ritrovano, a partire dalla seconda metà della gravidanza, livelli glicemici proporzionalmente più elevati ed una maggiore incidenza di intolleranza glucidica. L'incidenza di GDM, infatti, scarsamente rilevabile prima dei 20 anni, si incrementa di 4 volte nelle donne con età compresa tra i 25 ed i 35 anni e di circa 10 volte in quelle con età superiore a 35 anni⁶². Questo dato non è stato possibile osservarlo nel nostro studio poiché l'età media dei due campioni è di 32,9 per il gruppo GDM e 33,5 per il gruppo controllo, con soli 5 casi con età < 25 anni (2,6% dell'intera popolazione studiata). Inoltre, non è stata riscontrata

alcuna differenza statisticamente significativa fra i due campioni né un'associazione di questo parametro con la patologia ($p= 0,899$).

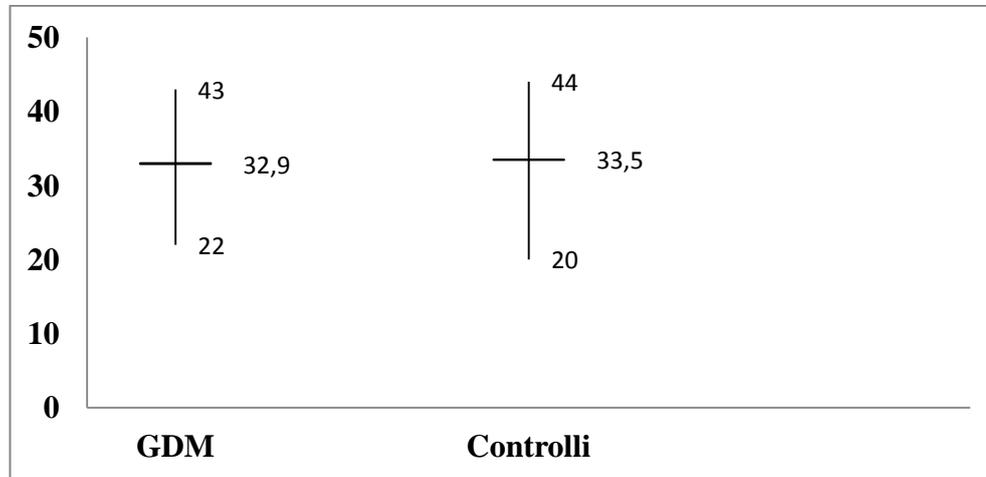


Figura 6 Distribuzione dell'età nei due campioni studiati. Sono indicati i valori massimi, minimi e la media

4.3 Pregnancy Associated Plasma Protein-A e f β -hCG

La PAPP-A ed il f β -hCG vengono valutati nel periodo gestazionale compreso tra 11+0 e 13+6 settimane. Il campo di maggior impiego è rappresentato dallo screening delle anomalie cromosomiche. Non sono stati condotti molti studi che mettano in relazione i suddetti parametri biochimici ed il Diabete Gestazionale.

Il ruolo biologico della PAPP-A durante la gravidanza non è stato ancora chiarito. È noto che tale proteina ha un'attività protesica nei confronti dell'IGFBP-4⁶³ e quindi può agire come regolatore dell'azione dell'IGF in modo autocrino/ paracrino. È stato dimostrato che l'assenza di PAPP-A nei topi *knock – out* ha effetti negativi sulla crescita fetale⁶⁴. La sua produzione da parte del trofoblasto assicura il trofismo della placenta attraverso il rilascio di IGF-II.

Nello studio preso in esame, condotto da *Lovati et al.* nel 2012, bassi livelli plasmatici di PAPP-A durante il primo trimestre di gravidanza sono strettamente associati all'insorgenza di Diabete Gestazionale. Il Diabete Gestazionale è caratterizzato da un'alterata funzionalità placentare e questo potrebbe spiegare la ridotta produzione di PAPP-A. Non è stato dimostrato, tuttavia, se i bassi livelli plasmatici di PAPP-A siano responsabili o siano la conseguenza di un alterato metabolismo glucidico. Si può ipotizzare che a bassi livelli di PAPP-A corrisponda una minore biodisponibilità dell' *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) come conseguenza di una ridotta proteolisi dell' *insulin like growth factor binding protein* (IGFBP)⁶⁵.

Il nostro studio ha dimostrato che vi è una differenza statisticamente significativa tra il valore medio dei livelli plasmatici di PAPP-A delle gestanti inserite nel gruppo GDM e quello del gruppo Controllo, rispettivamente 1,201 MoM vs 1,575 MoM ($p < 0,001$). Il 51,8% delle gestanti del gruppo GDM presenta livelli plasmatici di PAPP-A inferiori a 1 ($< 0,988$) MoM contro il 4,6% del gruppo controllo ($p < 0,001$). Tramite analisi statistica abbiamo correlato la proteina al Diabete Gestazionale ed abbiamo ottenuto una forte correlazione fra le due variabili, in particolare valori di PAPP-A $< 0,988$ MoM sono associati con un rischio 16 volte maggiore rispetto alla popolazione generale [OR: 16,8 (IC: 5,5-50, 6)]. I nostri risultati sono in accordo con quelli dello studio sopra citato in cui l'OR ottenuto per valori di PAPP-A $< 0,62$ MoM è di 4,8. È possibile che il nostro risultato sia venuto maggiore poiché abbiamo studiato una campione molto più piccolo. Possiamo dedurre, tuttavia, che è possibile prendere in considerazione il dosaggio della PAPP-A durante il primo trimestre di gravidanza come fattore

predittivo per lo sviluppo di Diabete Gestazionale, associandolo ad altri parametri clinici.

Nello studio abbiamo inserito anche il parametro f β -hCG poiché viene dosato insieme alla PAPP-A in occasione dello screening delle anomalie cromosomiche. I due gruppi di gestanti presentano gli stessi livelli plasmatici dell'ormone (1,114 vs 1,118; $p= 0,490$). Inoltre, non abbiamo riscontrato alcuna relazione con il diabete gestazionale ($p = 0,425$). Non proponiamo, quindi, il f β -hCG come parametro predittivo di GDM.

4.3 Body Mass Index

Come previsto, anche i risultati relativi al Body Mass Index sono in accordo con gli studi precedenti. Un alto indice di massa corporea è strettamente correlato con diverse complicanze associate alla gravidanza⁶⁶. In particolare il rischio di sviluppare Diabete Gestazionale è 2, 4 e 8 volte più alto nelle donne rispettivamente sovrappeso, obese e gravemente obese⁶⁷.

Nel nostro studio, la media del BMI nel gruppo GDM è di 24,27 e di 22,03 nel gruppo Controllo ($p <0,001$) ed è presente una forte relazione tra questo parametro e la patologia ($p <0,001$).

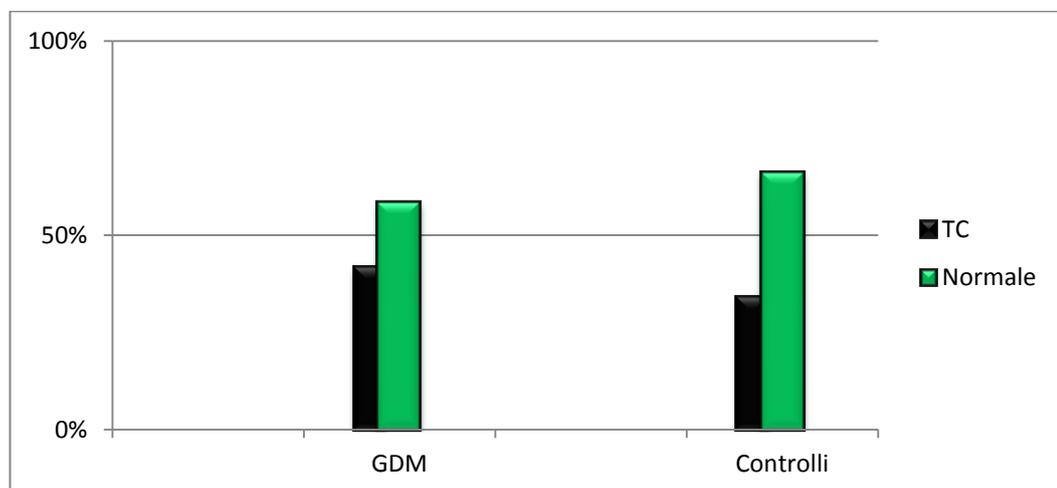
Abbiamo ottenuto un risultato contrastante quello riportato nello studio del 2011 di F. Beneventi *et al.*, nel quale è presente una correlazione inversa tra il BMI e la PAPP-A nel gruppo di donne in cui si era presentato successivamente il diabete gestazionale ($p= 0,0001$) e non nel gruppo con gravidanze ad andamento fisiologico ($p= 0,106$). Nel nostro studio i due parametri non sono correlati né nel

gruppo GDM ($p= 0,433$) né nel gruppo Controllo ($p= 0,368$), quindi le due variabili sono indipendenti l'una dall'altra.

4.4 Timing del Parto ed Outcome della Gravidanza

È noto che l'incidenza dei tagli cesarei è consistentemente maggiore nelle gravidanze in cui è stato diagnosticato il diabete gestazionale rispetto alle gravidanze normali⁶⁸.

In questo studio abbiamo osservato che, tra le gestanti inserite nel gruppo GDM (N=81), 36 hanno partorito presso la UO ostetricia e ginecologia I° Univ, in 15 di esse è stato necessario il taglio cesareo (41, 6%); del gruppo controllo (N=109) solo 47 gestanti hanno partorito presso la medesima clinica, di cui 16 con taglio cesareo (34,04%). Il 6,2% delle donne con Diabete Gestazionale ed il 2,7% ha partorito prima di 37 settimane di gestazione.



Nonostante la presenza di patologia, nel gruppo GDM non sono presenti casi di macrosomia e l'APGAR-Score dei neonati rientra nello stesso range di quello del gruppo controllo (8-10).

4.5 Detection Rate dei parametri analizzati

Abbiamo concluso lo studio con la stima della *detection rate* globale dei parametri valutati inizialmente singolarmente ed infine proponendoli in associazione, proponendo un 'Risk Score' che ci permetta di selezionare tale paziente per inviarla a percorsi assistenziali specialistici in tempi sempre più precoci.

Nel nostro studio, per un BMI > 25 abbiamo una detection rate del 82 % ed una percentuale di falsi positivi del 17 %. Livelli plasmatici di PAPP-A < 0,988 hanno una detection rate di 88%, ed una percentuale di falsi positivi dell'11 %; il parametro familiarità presenta una detection rate del 66% con una percentuale di falsi positivi del 33%.

Associando i parametri tra di loro, in modo sequenziale, aumenta la detection rate, e diminuiscono i casi di falsi positivi:

- associando il parametro BMI con la PAPP-A, in un caso, e con la familiarità in un altro, abbiamo ottenuto una detection rate rispettivamente del 90% e del 92%, con una percentuale di falsi positivi di 0,9% e 0,7%.
- L'associazione tra PAPP-A e familiarità presenta una detection rate del 92% e lo 0,7% di falsi positivi.
- Dato estremamente importante è che associando la familiarità, il BMI con la PAPP-A abbiamo ottenuto una detection rate del 100% per un tasso di falsi positivi dello 0%: questo risultato, ovviamente, deve essere rapportato alla esigua numerosità del campione. Quest'ultimo dato,

tuttavia, è comunque molto importante poichè conferisce maggiore specificità ai parametri studiati.

5. CONCLUSIONI

Il Diabete Gestazionale è una patologia comune che sta subendo un incremento dell'incidenza, dovuta ad un aumento della prevalenza di alcuni dei fattori di rischio, quali l'obesità e l'età media delle gestanti. Ad oggi, in una popolazione non a rischio, il trattamento di GDM viene avviato intorno alle settimane di gestazione 24-28 dopo aver effettuato la curva da carico con 75 g di glucosio che, tuttavia, non sempre è sufficiente affinché si annullino le complicanze legate a tale patologia, probabilmente perché il trattamento viene iniziato tardivamente.

Con il nostro studio abbiamo voluto analizzare dei parametri rilevabili sin dal primo trimestre di gravidanza in modo tale da individuare le gestanti che presentano un alto rischio per lo sviluppo di diabete gestazionale ed indirizzarle precocemente verso percorsi diagnostico-terapeutici specifici. Un importante aspetto di questo studio è che il parametro che abbiamo aggiunto, la PAPP-A, a quelli già noti per la loro associazione al diabete gestazionale, è un parametro già ampiamente inserito negli esami di routine svolti durante il primo trimestre gestazionale. Questo conferisce al test di screening un'ampia disponibilità nella pratica clinica, a differenza di studi precedenti in cui sono stati inclusi specifici marcatori biochimici che vengono misurati solo nell'ambito della ricerca.

In questo studio, associando la PAPP-A ad altri fattori clinici correlati alla patologia, quali la familiarità per GDM, un elevato BMI e, anche se la

correlazione non è risultata positiva nel nostro studio, l'età materna, è stato possibile individuare le gravidanze a rischio, con una *detection rate* del 100%.

La selezione delle gestanti a rischio sin dal primo trimestre è molto importante, poiché permette di inserire la gestante da subito in un percorso assistenziale dedicato e specialistico per il proprio caso, permettendole di iniziare prontamente un approccio terapeutico adeguato. Un regime dietetico specifico, l'esercizio fisico e le raccomandazioni sull'aumento del peso in gravidanza applicati sin da subito potrebbero essere sufficienti per la prevenzione dello sviluppo del diabete gestazionale o, comunque, essenziale per un ridotto utilizzo di insulina e quindi ridurre la frequenza delle complicanze ad esso associate. Tutto questo si riflette in una diminuzione della morbilità perinatale ed a lungo termine come, ad esempio, una possibile riduzione dello sviluppo di diabete di tipo II ed obesità negli adulti nati da madre diabetica, con un minor aggravio sui costi sociali del Sistema Sanitario Nazionale.

L'attuale trattamento ha già portato ad una minor incidenza dei parti con taglio cesareo dovuta ad una riduzione dei casi di macrosomia. Iniziare il trattamento sin dal primo trimestre di gravidanza comporterebbe un ulteriore miglioramento del metabolismo materno e fetale favorendo l'aumento di gravidanze con travaglio fisiologico ed un parto sicuramente a termine.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ KH. Nicolaides. A model for a new pyramid of prenatal care based on the 11 to 13 weeks' assessment. *Prenat Diagn* 2011; **31**: 3-6.
- ²Galtier F. Definition, epidemiology, risk factors. *Diabete&Metabolism*,2010; **36**: 628-651.
- ³ American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2013. *Diabetes Care*, 2013; **36**, supplement: S11-S65.
- ⁴ Ryan EA, Enns L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; **67**: 341-347.
- ⁵ Nelson T, Shulman G, Grainger D, Diamond MP. Progesterone administration induced impairment of insulin suppression of hepatic glucose production. *Fertil Steril* 1994; **62**: 491-496.
- ⁶ Giorgino F, Almahfoutz A, Goodyear LJ, Smith RJ. Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle *in vivo*. *J Clin Invest* 1993; **91**: 2020-2030.
- ⁷ Kawai M, Kishi K. Adaptation of pancreatic B-cells during the last third of pregnancy: regulation of B-cell function and proliferation by lactogenic hormones in rats. *Eur J Endocrinol* 1999; **141**: 419-425.

⁸ Handwerger S, Freemark M. The roles of placental growth and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000; **13**: 343-356.

⁹ Buchanan TA. Metabolic changes during normal and diabetic pregnancy. *Diabetes Mellitus in Pregnancy*, Reece EA, Coustan DR (eds). Churchill Livingstone: New York, 1995: 59-77.

¹⁰ Van Hassche FA, Arts L, De Prins F. A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1978; **85**: 818-820.

¹¹ Catalano PM, Tyzbir ED, Wolfe RR, *et al.* Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subject and women with gestational diabetes. *AM J Physiol* 1993; **264**: E60- E67.

¹² Chiu KC, Go RC, Aoki M. *et al.* Glucokinase gene in gestational diabetes mellitus: population association study and molecular scanning. *Diabetologia* 1994; **37**: 104–110.

¹³ O’Sullivan JB. Subsequent morbidity among GDM women. In *Carbohydrate Metabolism in Pregnancy and the Newborn*, Sutherland HW, Stowers JM (eds.) Churchill Livingstone: New York, 1984; 174–180.

¹⁴ Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Del Prato S. Intermediate metabolism in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; **19**: 259-270.

-
- ¹⁵ Keller JD, Lopez- Zeno JA, Doodly SL, Sokol ML. Shoulder dystocia and birth trauma in gestational diabetes: a five year experience. *Am J Obstet Gynecol* 1991; **165**: 928-30.
- ¹⁶ Persson B, Hanson U. Neonatal morbidities in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1998; **21**: B79-B84.
- ¹⁷ The Toronto Tri- Hospital Gestational Diabetes Investigators. Cesarean delivery in relation to birth weight and gestational glucose tolerance : pathophysiology or practice style? *JAMA* 1999; **275**: 1165-1170.
- ¹⁸ Rey E, Monier D, Lemonnier M. Carbohydrate intolerance in pregnancy: incidence and neonatal outcome. *Clin Inves Med* 1996;**19**:406.
- ¹⁹ Kenpp NB, Shelley WC, Gabbe SG, Kumar S. Fetal and neonatal hazards of maternal hydration with 5 percent dextrose before Caesarean section. *Lancet* 1982; **1**:1150- 1152.
- ²⁰ Kjos SL, Walther F. Prevalence and etiology of respiratory distress in infants of diabetic mothers: predictive value of lung maturation tests. *Am J Obstet Gynecol* 1990; **163**(3): 898–903.
- ²¹ Veille JC, Sivakoff M, Hanson R, Fanaroff AA. Intraventricular septal thickness in fetuses of diabetic mothers. *Obstet Gynecol* 1992; **25**: 51–54.
- ²² Cruikshank DP, Pitkin RM, Varner MV, Williams GA, Hargis GK. Calcium metabolism in diabetic mother, fetus and newborn infants. *Am J Obstet Gynecol* 1983; **145**: 1010–1015.

²³ Marshal RE. Infants of the diabetic mothers: a neonatologist's view. *Clin Diabetes* 1999; **8**: 49–51.

²⁴ Shannon K, Davis JC, Kitzmiller JL, Fulcher SA, Koenig HM. Erythropoiesis in infants of diabetic mothers. *Pediatr Res* 1986; **30**: 161–165.

²⁵ Kjos SL, Leung A, Henry OA, Victor MR, Paul RH, Medearis AL. Antepartum surveillance in diabetic pregnancies: predictors of fetal distress in labor. *Am J Obstet Gynecol* 1995;175: 1532—9.

²⁶ Pettitt DJ, Aleck KA, Baird HR, Carraher MJ, Bennett PH, Knowler WC. Congenital susceptibility to NIDDM. Role of intrauterine environment. *Diabetes* 1988;37:622—8.

²⁷ Peters RK, Kjos SL, Xiang A, Buchanan TA. Long term diabetogenic effect of single pregnancy in women with previous gestational diabetes mellitus. *Lancet* 1996; **347**: 227–230.

²⁸ Buchanan TA, Xiang A, Kjos SL, *et al.* Gestational diabetes: antepartum characteristics that predict postpartum glucose intolerance and type 2 diabetes in Latino women. *Diabetes* 1998; **47**: 1302–1310.

²⁹ O'Sullivan JB. Subsequent morbidity among GDM women. In *Carbohydrate Metabolism in Pregnancy and the Newborn*, Sutherland HW, Stowers JM (eds.) Churchill Livingstone: New York, 1984; 174–180.

-
- ³⁰ O’Sullivan LB., Mahan CM, Charles D., Dandrow RV. Screening criteria for high-risk gestational diabetic patients. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1973; **116**: 895-900.
- ³¹ Scott DA, Loveman E., McIntyre L., Waugh N. Screening for gestational Diabetes: a systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assesment* 2002; **6**(11):1-16.
- ³² Luchi C., Schifano M., Nanini C., Di Cianni G., Lencioni C., Gennazzani AR. Does Nuchal Translucency thickness in the first trimester predict GDM onset during pregnancy? *Gynecol Endocrinol* 2011; **27** (10): 782-784.
- ³³ Haak MC., Van Vugt JM. Pathophysiology of increased nuchal translucency: a review of the literature. *Hum Rep* 2003; **9**:175-184.
- ³⁴ Simmons D. Diabetes and obesity in pregnancy. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynecology* 2011; **25**: 25-36.
- ³⁵ Major CA., Henry MJ., De Veciana M, Morgan MA. The effects of carbohydrate restriction in patients with diet- controlled gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol*, 1998; **91**:600-604.
- ³⁶ Gilbert C., Valois M., Koren G. Pregnancy outcome after first trimester exposure to metformin: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2006; **86**: 658-663.
- ³⁷ Lin TM, Galbert SP, Kiefer D, Spellacy WN, Gall S. 1974. Characterization of four human pregnancy-associated plasma proteins. *AmJ Obstet Gynecol* **118**: 223-236.

³⁸ Lawrence JB, Oxving C, Overgaard MT, et al. The insulin growth factor (IGF)- dependent IGF binding protein-4 secreted by human fibroblasts is pregnancy associated plasma protein A. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3149-3153.

³⁹ Nicolaides KH, Spencer K, Avgidou K, Faiola S, Falcon O. 2005. Multicenter study of first trimester screening for trisomy 21 in 75821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk oriented two-stage first trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* **25**:221-226.

⁴⁰ Spencer K, Bindra R, Nicolaides KH. 2003. Maternal weight correction of maternal serum PAPP-A and free beta-hCG MoM when screening for trisomy 21 in the first trimester. *Prenat Diagn* **23**: 851-855.

⁴¹ Spencer K, Crossley JA, Aitken DA, et al. 2003a. The effect of temporal variation in biochemical markers of trisomy 21 across the first and second trimesters of pregnancy on the estimation of individual patient specific risks and detection rates for Down's syndrome. *Ann Clin Biochem* **40**: 219–231.

⁴² Spencer K, Bindra R, Nix ABJ, Heath V, Nicolaides KH. 2003b. Delta- NT or NT MoM: which is the most appropriate method for calculating accurate patient-specific risks for trisomy 21 in the first trimester?. *Ultrasound Obstet Gynecol* **22**: 142–148.

⁴³ Spencer K, Spencer CE, Power M, Dawson C, Nicolaides KH. 2003c. Screening for chromosomal abnormalities in the first trimester using ultrasound and maternal serum biochemistry in a one stop clinic: a review of three years prospective experience. *Br J Obstet Gynaecol* **110**: 281–286.

⁴⁴ Nicolaides KH, Poon L. C. Y., Maiz N, Valencia C, Plasencia W. 2009. First trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and preeclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;**33**: 23-33.

⁴⁵ Karagiannis G, Akolekar R, Sarquis R, Whright D, Nicolaides KH. 2011. Prediction of small for gestation neonates from biophysical and biochemical markers at 11- 13 weeks. *Fetal Diagn Ther.*

⁴⁶ Cheong Mei-Leng, Bo-Quing She, Su-Chee Chen¹, Fa-Kung Lee², Ming-Song Tsai. CAN FIRST-TRIMESTER MATERNAL SERUM LEVEL OF PREGNANCY-ASSOCIATED PLASMA PROTEIN-A PREDICT SUBSEQUENT FETAL GROWTH RESTRICTION? *Taiwanese J Obstet Gynecol* June 2005 Vol **44** -No 2

⁴⁷ Pellitero S, Reverter JL, Pizarro E, et al. 2007. Pregnancy-associated plasma protein-A levels are related to glycemic control but not to lipid profile or hemostatic parameters in type 2 diabetes . *Diabetes Care* **30**: 3083-3085.

⁴⁸ Lovati E, Beneventi F, Simonetta M, Albonico G, Tinelli C, Locatelli E, Spinillo A. 2011. First trimester pregnancy associated plasma protein-A in pregnancies complicated by subsequent gestational diabetes. *Prenat Diagn*,**31**: 523-528.

⁴⁹ Spencer K, Cowans NJ, Spencer CE, Achillea N. 2010. A re-evaluation of the influence of maternal insulin-dependent diabetes on fetal nuchal translucency thickness and first-trimester maternal serum biochemical markers of aneuploidy. *Prenat Diagn* **30**: 937-940.

-
- ⁵⁰ Galtier-Dereure F, Boegnner C, Bringer J. Obesity and pregnancy: complications and cost. *AM J Clin Nutr* 2000; **71**(Suppl. 5): 1242S-1248S.
- ⁵¹ Torloni MR, Betran AP, Horta BL, Nakamura MU, Atallah AN, Moron AF et al. Pregnancy BMI and risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Obes Rev* 2009; **10**:194-203.
- ⁵² Teede HJ, Harrison CL, Teh WT, Paul E, Allan CA. Gestational diabetes: development of an early risk prediction tool to facilitate opportunities for prevention. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2011; **6**:499-504.
- ⁵⁴ Spencer K , Souter V, Tul N, Snijders R, Nicolaides KH. A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency , maternal serum free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999; **4**: 231-237.
- ⁵⁵ Beneventi F, Simonetta M, Lovati E, Albonico G, Tinelli C, Locatelli E, Spinillo A. First trimester pregnancy-associated plasma protein-A in pregnancies complicated by subsequent gestational diabetes. *Prenat Diagn* 2011; **31**: 523-528.
- ⁵⁶ Bito T, Foldesi I, Nyari T, Pal A. Prediction of gestational diabetes mellitus in a high risk group by insulin measurement in early pregnancy. *Diabetic Medicine* 2005; **22**: 1434- 1439.
- ⁵⁷ Di Cianni G, Volpe L, Lencioni C, Miccoli R, Cucurru I, Ghio A, Chatzianagnostou K, Bottone P, Teti G, Del Prato S, Benzi L. Prevalence and risk factors for gestational diabetes assessed by universal screening. *Diabetes Res Clin Pract* 2003; **62**: 131-137.

-
- ⁵⁸ Ferrara A. Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus- a public health perspective. *Diabetes Care* 2007; **30** (suppl. 2) : S141- S146.
- ⁵⁹ Lee H, Jang HC, Park HK, Metzger BE, Cho NH. Prevalence of type 2 diabetes among women with previous history of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; **358**: 124- 129.
- ⁶⁰ Seshiah V, Balaji V, Balaji MA, Paneerselevam A, Arthi T, Thamizharasi M *et al.* Prevalence of gestational diabetes mellitus in South India (Tamil Nadu)- a community based study. *J Assoc Physicians India* 2008; **56**: 329- 333.
- ⁶¹ Ogonowski J, Miazgowski T, Homa K, Celewicz Z, Kuczynska M. low predictive value of traditional risk factors in identifying women at risk for gestational diabetes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007; **86**: 1165-1170.
- ⁶² Buongiorno AM, Botta RM, Pachì A, Fallucca F. Diabete e gravidanza : aspetti fisio - patogenetici ed epidemiologici. *Ann Ist Super Sanità* 1999; vol. 35, n. 2: 265-271.
- ⁶³ Chelius D, Conover CA, Baldwin MA, Spencer EM. Characterization of the enzymatic specificity of the IGF- dependent insulin- like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) protease. *Growth Horm IGF Res* 2000; **6**: 360-366.
- ⁶⁴ Konover CA. Key questions and answers about pregnancy associated plasma protein-A. *Trends Endocrinol Metab* 2012; **5**: 242-249.
- ⁶⁵ Yan X, Baxter RC, Firth SM. Involvement of pregnancy- associated plasma protein-A2 in insulin- like growth factor (IGF) binding protein- 5 proteolysis during pregnancy: a potential mechanism for increasing IGF bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; **3**: 1412- 1420.

⁶⁶ Cedergren MI. Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstet Gynecol* 2004; **103**: 219–224.

⁶⁷ Chu SY, Callaghan WM, Kim SY, Schmid CH, Lau J, England LJ, Dietz PM: Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007; **30**: 2070–2076.

⁶⁸ Mc Farland LV, Raskin M, Daling JR, Benedetti TJ. Erb/Duchenne's palsy: a consequence of fetal macrosomia and method of delivery. *Obstet Gynecol* 1986; **68**: 784-788.